

UNIVERSITE DE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE  
UFR SCIENCES MEDICALES ET PHARMACEUTIQUES  
**Ecole Doctorale Environnements-Santé**

**EXPLORATION DES FACTEURS IMPLIQUES  
DANS L'IMMUNOSENESCENCE ET L'INFLAMMATION CHRONIQUE  
APRES TRANSPLANTATION RENALE :**

**FOCUS SUR LE ROLE POTENTIEL DE LA TRANSLOCATION  
BACTERIENNE DIGESTIVE ET LES MODIFICATIONS DU MICROBIOTE  
INTESTINAL.**

**THÈSE**

Présentée et soutenue publiquement le 09 Février 2017

Par

**Clémence CARRON**

Pour l'obtention du diplôme de  
**Doctorat de l'Université de Bourgogne Franche-Comté**  
Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé

**Composition du Jury :**

<b>Rapporteurs :</b>	Pr Christophe LEGENDRE	Hôpital Necker, Paris
	Dr Hervé BLOTTIERE	INRA, Jouy-en-Josas
<b>Examineurs :</b>	Dr Laurent LAGROST	INSERM, Dijon
	Dr Béatrice GAUGLER	INSERM, Paris
<b>Directeurs de thèse :</b>	Pr Didier DUCLOUX	INSERM, CHRU, Besançon
	Dr Jamal BAMOULID	INSERM, CHRU, Besançon

## REMERCIEMENTS

### **A mes Directeurs de thèse :**

A Mr le Docteur Jamal BAMOULID, un immense merci pour ta bienveillance, ta disponibilité, ton soutien sans faille, ton investissement dans ce travail, et tes multiples connaissances en immunologie de la transplantation que tu m'as transmises chaque jour. Tes compétences professionnelles et qualités humaines rendent le travail à tes côtés plus simple et agréable. Tu as toujours les mots justes pour me faire avancer. Sois assuré de toute ma gratitude et de mon profond respect.

A Mr le Professeur Didier Ducloux, merci de m'avoir accueilli dans votre équipe. Vos compétences, votre accessibilité, votre investissement dans de nombreux projets scientifiques et votre rigueur forcent l'admiration. Merci de votre confiance pour m'avoir permis de travailler sur un sujet aussi passionnant. Soyez assuré de ma plus haute reconnaissance.

### **A tous les membres de mon jury, merci d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire l'honneur de votre présence :**

A Mr le Professeur Christophe Legendre, j'ai pu apprécier vos compétences lors d'enseignements ou au cours de congrès dans lesquels vous êtes intervenus. Soyez assuré de ma considération.

A Mr le Docteur Hervé Blottière, j'ai pu apprécier vos compétences au cours d'une formation que j'ai suivie au sein de votre équipe. Soyez assuré de toute la reconnaissance que j'ai pour vos travaux.

A Mme le Docteur Béatrice Gaugler, merci pour votre soutien et votre disponibilité à mon égard lors de mon arrivée au laboratoire. Vos compétences professionnelles nous ont permis d'initier au mieux ce travail. Soyez assurée de ma sincère reconnaissance.

A Mr le Docteur Laurent Lagrost, votre dynamisme et votre engouement m'ont appris à mieux travailler en collaboration et à rester motivée. Merci pour votre disponibilité, vos compétences et votre reconnaissance. Soyez assuré de ma considération.

### **A tous les membres de l'équipe UMR1098, merci pour votre gentillesse, votre disponibilité, vos précieuses connaissances, votre aide et la bonne ambiance de travail !!! Vous êtes tous géniaux et vous allez tous me manquer.**

A Mr le Professeur Philippe SAAS, j'ai pu apprécier vos qualités humaines et la justesse de votre rigueur scientifique. Je suis fière d'avoir compté parmi les étudiants de votre équipe. Merci pour votre investissement dans ce travail. Soyez assuré de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

Aux Docteurs Sylvain Perruche, Olivier Adotevi, Christophe Ferrand, Yann Godet et à tous les autres pour leurs remarques constructives et leurs aides pour ce travail.

A Caroline, merci pour ton soutien, ta bienveillance et ton aide dans la réalisation de ce travail. Sois assurée de tout mon respect et de mon amitié sincère.

Aux filles de la plateforme, et chouchou, merci pour votre aide en toutes circonstances (vacances, jambes cassées, petit moral...) et merci pour tous les bons souvenirs que vous me laissez.

A Emilie G et Pacou, pour votre dynamisme, votre aide et votre bienveillance envers moi.

A Anne Dup, merci de m'avoir soutenue pour mettre au point ces foutues manips et pour nos bons moments. A Sabeha, merci pour tous tes précieux conseils aussi bien professionnels que personnels.

A Adam, merci d'avoir été mon grand frère de thèse pendant toutes ces années et pour toutes les heures où on a refait le monde. Je te souhaite une bonne continuation ! A Lise (pour nos bons moments), Romain (Allllller !), Jérémy (pour toutes tes blagues), Jeanne (pour ta bonne humeur), Tristan (pour tes précieux conseils et ta gentillesse), Clémentine (pour m'avoir soutenue dans la « normalité » au bureau), Laurie S (pour ta gentillesse, petite walida), Mansi (pour nos bons moments), Omayra et Thierry (pour être deux personnes aussi géniales !), Matthieu L (pour ton humour), Fred, Clélia, Samy, Laure, et tous les autres. A Emilie, merci d'avoir partagé avec moi autant de bons et de mauvais moments pendant toutes ces années, à notre complicité et à ta gentillesse. Tu vas me manquer. A Francis, Mélanie, Anna, Baptiste, Adrien, Dom et François de m'avoir aidé à travailler avec ces petites souris... Et merci à tous les autres membres de l'unité !

A ma Taupin, pour ton rire et ta bonne humeur qui vont beaucoup me manquer ! Merci de tout ton soutien, ma binôme d'année de thèse, je te souhaite que le meilleur, tu le mérites laaaagement ! A ma Laura, pour ta gentillesse, ton humour et ton amitié si précieuse à mes yeux. Tu as toujours été notre exemple. Ne change pas ;).

### **A toutes les personnes avec qui j'ai pu travailler :**

A Thomas, à Cécile et Maria pour leur aide chaleureuse pour l'inclusion de nos patients.

Aux infirmières de néphro et à DSF, pour leur disponibilité et leur aide pour les prélèvements, en tout genre !

A toute l'équipe de JPPB et à Valérie, merci pour votre accueil chaleureux à Dijon et votre gentillesse.

A toute l'équipe de Didier Hocquet, merci pour votre accueil et votre aide. A Benoit V, merci de m'avoir aidé à rendre l'Illumina plus lumineux et pour le temps que tu m'as accordé.

### **A toute ma famille et mes amis :**

A mes parents, pour votre soutien et la liberté que vous m'avez toujours accordée. Guidée par vos bons conseils et votre amour, j'ai pu faire mes propres choix et arriver jusqu'ici. Vous m'avez apporté tout ce dont j'ai eu besoin, je vous dois tout. Je vous aime.

A Céline, pour ton grand cœur et ton sourire. Merci d'avoir pris soin de moi pendant toutes ces années, tu maîtrises ton rôle de grande sœur avec talent ! Je suis fier de la femme que tu es devenue mon mimou chéri.

A Marie, pour m'avoir accompagnée pendant toutes ces années. C'est un peu mon marathon à moi cette thèse, avec tout autant de dénivelé pour nous mais tu es toujours aussi importante pour moi et je serais toujours là si tu as besoin.

A « mes poufs », merci pour votre fraîcheur et votre spontanéité. D'années en années vous prenez un peu plus de place dans mon cœur, et vous savez toujours me rassurer. Vous me manquez énormément. Amour pour toujours !

A l'ensemble de ma famille et mon filleul pour tous les bons moments que l'on partage ensemble ; à ma Mamie pour les valeurs, les recettes et les histoires que tu m'as transmises.

A ma Marraine et mon Papi, je sais que vous êtes fiers de moi.

A Sandrine et Geoffrey, mes copains du FJC, pour tous les bons souvenirs qui me feront regretter cette thèse !

A Lucie, mon petit, pour ta douceur et nos discussions à refaire le monde.

A tous mes amis, vraiment tous, pour leur bonne humeur et leur aide, différente mais tout aussi indispensable, à la réalisation de cette thèse.

Enfin (virgule) à toi, mon Robin de l'amour, merci pour tous ces 'km' d'amour que tu m'as apportés. Je suis prête pour construire ma vie avec toi et enfin auprès de toi. Je t'aime.

Je voudrais aussi penser à toi Quenti, d'où tu es tu donnes encore beaucoup de bonheur à toutes ces personnes qui ont reçu une nouvelle part de vie grâce à toi. Je te dédie ce travail pour que tu apprécies tout ce qu'apportent la transplantation et la recherche !

## RÉSUMÉ

Notre équipe a précédemment rapporté que l'utilisation d'un traitement d'induction lympho-déplétant [les globulines anti-lymphocytaires polyclonales (GALP)], peut entraîner une lymphopénie T CD4 persistante chez certains transplantés rénaux. Celle-ci est associée à certaines anomalies biologiques telles que la présence d'un syndrome inflammatoire chronique. Ce travail de thèse s'intéresse aux facteurs impliqués dans l'induction de ces anomalies puisqu'elles sont associées à une augmentation de l'incidence d'infections, de maladies cardiovasculaires et de décès, habituellement retrouvés chez les personnes âgées.

Nous avons montré que les GALP entraînent une diminution de la fonction thymique et une expansion de lymphocytes T à un stade avancé de différenciation pouvant traduire une immunosénescence prématurée. Par ailleurs, une rupture de la barrière intestinale semble favoriser la translocation bactérienne digestive et l'activation d'une inflammation chronique observée en transplantation, *via* les lipopolysaccharides libérés dans la circulation périphérique. La composition du microbiote intestinal pourrait jouer un rôle dans l'initiation, le maintien et la sévérité de l'inflammation. Nous avons observé des modifications du microbiote après transplantation et après l'antibioprophylaxie utilisée en transplantation.

Les mécanismes à l'origine de toutes ces observations restent à élucider mais ce travail permet d'améliorer la compréhension des facteurs impliqués dans le développement de l'immunosénescence et de l'inflammation chronique en transplantation rénale, ouvrant potentiellement la voie à d'intéressantes perspectives thérapeutiques.

**Mots-clés :** Transplantation rénale, Immunosénescence, Inflammation chronique, Translocation bactérienne digestive, Lipopolysaccharides, Microbiote intestinal

## **ABSTRACT**

We have previously described that polyclonal anti-lymphocytic globulins (GALP) may contribute to prolonged CD4 T-cell lymphopenia in some renal transplant recipients, associated with some biological abnormalities, such as a chronic inflammatory syndrome. Our work focuses on the factors involved in the induction of these abnormalities and susceptible to increase the incidence of infections, cardiovascular diseases and death, comparable to the incidence observed in the elderly.

We showed that GALP are implicated in the decrease in thymic output and the expansion of T cells at an advanced stage of differentiation. Both are hallmarks of premature immune senescence. Moreover, the dysfunction of the gut epithelial barrier is responsible for gut bacterial translocation (GBT) and the activation of chronic inflammation observed in chronic kidney disease as well as in renal transplant recipients. The composition of the intestinal microbiota may play a role in the initiation, maintenance and severity of GBT and systemic inflammation. We reported the existence of a dysbiosis after transplantation.

The mechanisms involved remain to be elucidated, yet, this work contributes to the understanding of the potential factors involved in the progression of immune senescence and the persistence of chronic inflammation after kidney transplantation paving the way to new fields of therapeutic research in transplantation.

**Keywords:** Kidney transplantation, Immune senescence, Chronic inflammation, Gut bacterial translocation, Lipopolysaccharides, Gut microbiota

# Sommaire

RÉSUMÉ.....	7
Liste des figures.....	12
Liste des tableaux.....	15
Liste des abréviations.....	16
AVANT-PROPOS.....	19
INTRODUCTION.....	23
Partie 1 : Microbiote et translocation bactérienne digestive.....	25
1.    La barrière intestinale.....	25
1.1. Contrôle du passage paracellulaire.....	25
1.2. Immunité de la muqueuse intestinale.....	29
2.    Le Microbiote.....	31
2.1. Développement du microbiote intestinal.....	31
2.2. Composition du microbiote intestinal.....	32
2.3. Techniques utilisées pour étudier le microbiote.....	38
2.4. Fonctions du microbiote intestinal.....	43
3.    La translocation bactérienne digestive.....	51
3.1. Hyperperméabilité digestive.....	51
3.2. Altération des défenses immunitaires de la muqueuse intestinale.....	54
3.3. Dysbiose.....	54
3.4. Endotoxémie.....	55
4.    Lipopolysaccharides et inflammation chronique.....	57
4.1. Structure du lipopolysaccharide.....	57
4.2. Signalisation du LPS.....	59
4.3. Activation de l'immunité par le LPS.....	61
4.4. 'Reverse transport' du LPS.....	63
4.5. Méthodes d'analyses du LPS.....	64

Partie 2 : Immunosénescence, Transplantation rénale et atteinte digestive .....	66
1.    La transplantation rénale .....	66
2.    Immunosuppression en transplantation rénale .....	68
2.1. Stratégies immunosuppressives .....	68
2.2. Focus sur les GALP .....	70
3.    Statut biologique et clinique des transplantés rénaux.....	74
3.1. Conséquences cliniques de la lymphopénie T CD4.....	74
3.2. Inflammation chronique et immunosénescence .....	76
4.    Atteintes digestives en transplantation rénale .....	79
4.1. Age et atteinte digestive .....	80
4.2. Facteurs favorisant une atteinte digestive en IRC .....	81
4.3. Facteurs favorisant une atteinte digestive en transplantation rénale .....	83
OBJECTIFS .....	87
ETUDE DES TRAVAUX .....	91
Partie 1: Immunosénescence accélérée après GALP.....	93
1.    Etude des marqueurs d'immunosénescence après transplantation rénale et utilisation de GALP .....	93
1.    Discussion de l'article .....	115
Partie 2 : Translocation bactérienne digestive en transplantation rénale.....	125
1.    Impact de la transplantation rénale sur la translocation bactérienne digestive .....	125
2.    Discussion de l'article .....	151
2.1. Prise en charge du LPS circulant.....	151
2.2. Implication clinique de la translocation bactérienne digestive.....	152
2.3. Cinétique des biomarqueurs relatifs à la translocation bactérienne digestive au cours de la première année après transplantation.....	155
2.3. Effet des GALP sur la translocation bactérienne digestive .....	160

Partie 3 : Modifications du microbiote en transplantation rénale, en fonction du temps et des immunosuppresseurs .....	165
1. Matériels et méthodes .....	165
2. Etude de l'impact des traitements immunosuppresseurs d'induction sur le microbiote, à partir d'un modèle murin.....	168
2.1. Diversité bactérienne .....	170
2.2. Distribution phylogénétique .....	171
2.3. Représentation multidimensionnelle .....	172
2.4. Discussion.....	175
3. Modifications du microbiote après transplantation rénale .....	178
3.1. Description de la population étudiée .....	178
3.1. Diversité bactérienne .....	179
3.2. Distribution phylogénétique .....	180
3.3. Représentation multidimensionnelle .....	182
3.4. Discussion.....	186
3.5. Conclusion préliminaire : microbiote et inflammation chronique en transplantation rénale.....	189
CONCLUSION & PERSPECTIVES .....	191
ANNEXES .....	199
BIBLIOGRAPHIE.....	205

## Liste des figures

Figure 1 : Taux de mortalité cardiovasculaire en fonction de l'âge .....	19
Figure 2 : Jonctions intercellulaires des cellules épithéliales intestinales adjacentes. ....	27
Figure 3 : Structure de l'épithélium et de la muqueuse intestinale au niveau de l'intestin grêle et du colon.....	28
Figure 4 : Profil phylogénétique du microbiome intestinal humain sain .....	34
Figure 5 : Diversité bactérienne longitudinale et description du tractus digestif humain .....	37
Figure 6 : Illustration des régions variables du gène <i>ARNr 16S</i> d' <i>Escherichia coli</i> .....	39
Figure 7 : Structure 2D-3D du gène <i>ARNr 16S</i> .....	40
Figure 8 : Sites de l'organisme impactés par le microbiote intestinal. ....	44
Figure 9 : Immunomodulation de l'immunité intestinale par le microbiote.....	49
Figure 10 : Description de la translocation bactérienne digestive secondaire à une dysbiose, en comparaison avec un état d'équilibre intestinal .....	55
Figure 11 : Déséquilibre global à l'origine de la translocation bactérienne digestive.....	56
Figure 12 : Structure du LPS. ....	58
Figure 13 : Reconnaissance du LPS par le récepteur TLR-4 et voie de signalisation de l'inflammation.....	61
Figure 14 : Neutralisation du LPS par sa prise en charge par la voie de la PLTP .....	64
Figure 15 : Représentation de l'utilisation des traitements immunosuppresseurs d'entretien utilisés en transplantation rénale.....	69
Figure 16 : Présentation des deux voies de reconstitution du système immunitaire après GALP .....	73
Figure 17 : Survie des patients transplantés rénaux en fonction du taux de LT CD4 <sup>+</sup> à l'entrée dans l'étude .....	75
Figure 18 : Cercle vicieux de l'inflammation chronique et l'immunosénescence.....	78
Figure 19 : Facteurs influençant la rupture de l'homéostasie intestinale dans l'insuffisance rénale chronique (ESRD). ....	83
Figure 20 : Cellules progénitrices circulantes après transplantation rénale selon le traitement d'induction (ATG vs. Ac anti-CD25) .....	120
Figure 21 : LT circulants de phénotype sénescent après transplantation rénale selon le traitement d'induction (ATG vs. Ac anti-CD25) .....	121

Figure 22 : RTE et LT sénescents circulants après transplantation rénale selon le traitement d'induction (GRAFALON ou THYMOGLOBULINE vs. Ac anti-CD25).....	122
Figure 23: Exploration of gut epithelial barrier integrity by measurement of intestinal Fatty Acid Protein (iFABP).....	131
Figure 24: Total LPS quantity and LPS activity prior and 1-year after kidney transplantation.....	132
Figure 25: TLR-4 inflammation pathway and pro-inflammatory cytokines.....	133
Figure 26: Evolution of PLTP activity and cholesterol after transplantation.....	134
Figure 27: Description of the effect of GBT on inflammation before and after kidney transplantation.....	135
Figure 28 : Concentrations des biomarqueurs relatifs à la translocation bactérienne digestive avant et après transplantation rénale dans la cohorte GABII.....	156
Figure 29 : Concentrations des biomarqueurs relatifs à la translocation bactérienne digestive avant et après transplantation rénale dans la cohorte GABII (2). .....	157
Figure 30 : Stratégie d'analyse des LT activés en cytométrie en flux à partir de sang total .....	159
Figure 31 : LT circulants de phénotype activé après transplantation rénale.....	160
Figure 32 : Comparaison à un an des marqueurs de translocation bactérienne digestive selon le traitement d'induction reçu à J0 par les patients de l'étude ORLY-Est, Ac anti-CD25 vs. GALP (ATG).....	161
Figure 33 : Comparaison à J4 des marqueurs de translocation bactérienne digestive selon le traitement d'induction reçu à J0 par les patients de l'étude GABII, Ac anti-CD25 vs. GALP (ATG).....	163
Figure 34 : Migration de l'ADN amplifié et purifié après PCR par experion.....	167
Figure 35 : Traitements immunosuppresseurs et antibiotique (BACTRIM) utilisés dans le modèle de souris.....	169
Figure 36 : Dosage quantitatif du LPS .....	170
Figure 37 : Diversité bactérienne.....	170
Figure 38 : Représentation graphique de la proportion de phyla selon les groupes.....	171
Figure 39 : Comparaison des proportions de phyla bactériens entre les différents groupes.....	172
Figure 40 : Représentation en PCoA des échantillons selon les groupes de souris.....	174

Figure 41 : Variations de la diversité bactérienne au cours du temps pour chaque individu de l'étude.....	180
Figure 42 : Diversité bactérienne.....	180
Figure 43 : Représentation graphique de la proportion des principaux phyla selon le temps après transplantation rénale.....	181
Figure 44 : Comparaison des proportions des principaux phyla bactériens aux différents temps.....	182
Figure 45 : Représentation en PCoA des échantillons, comparaison entre les patients.	183
Figure 46 : Représentation en PCoA des échantillons, comparaison entre les temps après transplantation.....	184
Figure 47 : Représentation en PCoA des échantillons en fonction du traitement d'induction .....	185
Figure 48 : Représentation de la variation des moyennes de concentrations, en fonction du temps après transplantation rénale, des marqueurs dosés dans l'étude préliminaire de GABII (sur les 46 premiers patients de l'étude).....	190
Figure 49 : Modèle intégré des déterminants de l'inflammation chronique et de la reconstitution lymphocytaire après GALP potentiellement impliqués dans l'immunosénescence accélérée et de complications cliniques chez le transplanté rénal. ....	194

## **Liste des tableaux**

Tableau 1 : Caractéristiques principales des 4 principaux phyla bactériens du microbiote intestinal. D'après (Ley <i>et al.</i> 2006) et (Turpin <i>et al.</i> 2016).....	35
Tableau 2 : Description des techniques pour l'étude du microbiote.....	41
Tableau 3 : Marqueurs et techniques d'étude de la perméabilité digestive et de l'intégrité des cellules de l'épithélium. (Bischoff <i>et al.</i> 2014) .....	53
Tableau 4 : Techniques de dosage du LPS. ....	65
Tableau 5 : Description des caractéristiques des patients de la cohorte GABII.....	118
Tableau 6 : Caractéristiques de la population d'étude du microbiote. Seize patients ont été issus de la cohorte GABII.....	179

## Liste des abréviations

### **A**

Ac : Anticorps

Ac anti-CD25 : Anticorps monoclonal dirigé contre le CD25

ADCC : Cytotoxicité dépendante des anticorps

ADN : Acide désoxyribonucléique

AGCC : Acides gras à chaînes courtes

ARN : Acide ribonucléique

ARNr : Acide ribonucléique ribosomal

ATG : Antithymoglobulines

### **B**

BPI : *Bactericidal and permeability increasing protein*

### **C**

CDC : Cytotoxicité dépendante du complément

CEI : Cellules épithéliales intestinales

CETP : *Cholesteryl ester-transfer protein*

CMV : *Cytomégalovirus*

CPA : Cellules présentatrices des antigènes

CRP : Protéine C réactive

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

CTLA-4 : *Cytotoxic T lymphocyte antigen-4*

### **D**

DC : *Dendritic cells* (ou cellules dendritiques)

DFG : Débit de filtration glomérulaire

### **E**

E. coli : *Escherichia coli*

EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragique

EPEC : *Escherichia coli* entéro-pathogénique

### **G**

GALP : Globulines anti-lymphocytaires polyclonales

GALT : *Gut-associated lymphoid tissue* (ou tissu lymphoïde associé à l'intestin)

GPI : Glycosylphosphatidylinositol

### **H**

HAS : Haute autorité de santé

HDL : Lipoprotéine de haute densité

## **I**

IEL: *Intraepithelial lymphocyte* (ou lymphocyte T intraepithelial)

iFABP: *intestinal Fatty acid binding protein*

IFN: Interféron

Ig: Immunoglobuline

IL: *Interleukine*

ILC: *Innate lymphoid cells* (ou cellules innées lymphoïdes)

IR : Insuffisance rénale

IRC : Insuffisance rénale chronique

IRP : *Immune risk profile*

## **K**

KDIGO : *Kidney disease : Improving global outcomes*

## **L**

LAL : *Limulus Amoebocytes Lysat*

LB : Lymphocyte B

LBP : *Lipopolysaccharides binding protein*

LDL : Lipoprotéine de basse densité

LPS : Lipopolysaccharides

LT : Lymphocyte T

## **M**

MALT : *Mucosa-associated lymphoid tissue* (ou tissu lymphoïde associé aux muqueuses)

MD2 : *Myeloid differentiation factor 2*

MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

MMF : Mycophénolate mofétil

mTOR: *Mammalian target of rapamycin*

MyD88: *Myeloid differentiation primary response gene 88*

## **N**

NK: *Natural killer*

## **O**

OTU: Unités taxonomiques opérationnelles

## **P**

PAMP: *Pathogen-associated molecular patterns* (ou motifs moléculaires associés aux pathogènes)

Pb : Paires de bases

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique

PD1: *Programmed death-1*

PLTP: *Phospholipid-transfer protein*

PRR: *Pattern recognition receptors* (ou récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires)

## **R**

RA: Rejet aigu

RTE: *Recent thymic emigrant*

## **S**

SBF : *Segmented filamentous bacteria*

sCD14 : CD14 soluble

sIgA : Immunoglobuline A sécrétoire

## **T**

TBD : Translocation bactérienne digestive

TCR : Récepteur des cellules T

TGF : *Transforming growth factor*

Th : *T helper*

TJ : *Tight junctions* (ou jonction serrées)

TNF : *Tumor necrosis factor*

TLR : *Toll like receptors*

TREC : *T cell receptor excision circles*

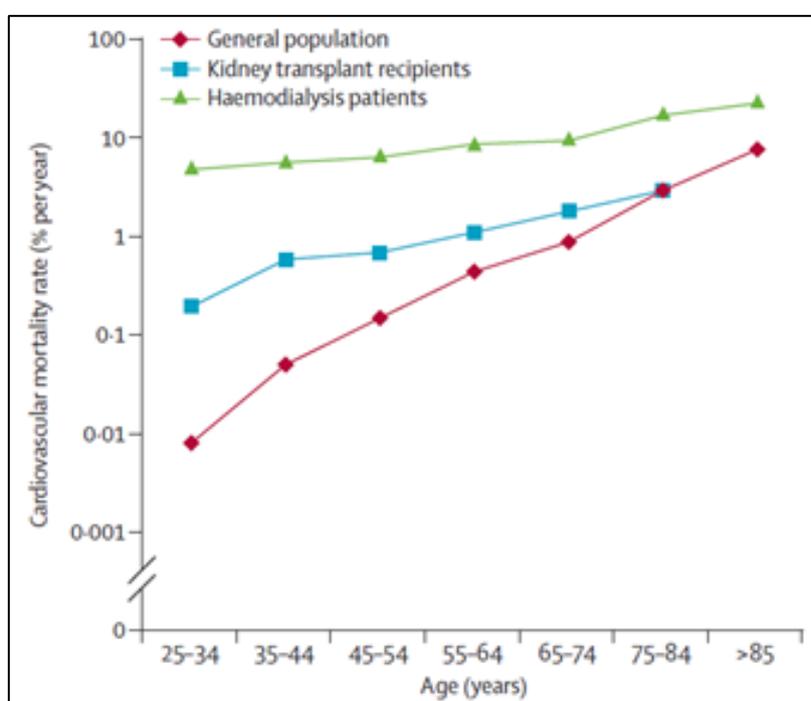
## **V**

VIH : *Virus de l'immunodéficience humaine*

VIH+ : Patients séropositifs pour le VIH

## AVANT-PROPOS

La transplantation d'organes solides est associée à un risque de rejet. En effet, les cellules immunitaires du receveur peuvent être activées par la présentation des allo-antigènes du donneur en contexte inflammatoire. Face à la pénurie de greffons, la perte des greffons devient un réel problème (Ojo *et al.* 2000) [revue, (Smith-Palmer *et al.* 2014)]. Le rejet reste donc une préoccupation majeure dans la prise en charge des transplantés ; cependant grâce à l'amélioration de l'immunosuppression, on observe une meilleure survie des greffons et des patients [revue, (Sayegh *et al.* 2004)]. Cependant, il persiste une mortalité plus importante après transplantation rénale par rapport à la population générale. Les maladies cardio-vasculaires constituent la première cause de mortalité. Bien que la transplantation rénale réduise le risque d'évènements cardio-vasculaires par rapport à celui des patients demeurant en dialyse, Sarnak *et al* ont démontré que le risque de mortalité cardiovasculaire est 50 fois plus élevé chez le transplanté rénal que dans la population générale (**figure 1**). Cette surmortalité persiste jusqu'à 65 ans, puis semble rejoindre celle de la population générale âgée (Sarnak *et al.* 2003).



**Figure 1 :** Taux de mortalité cardiovasculaire en fonction de l'âge chez les patients dialysés (courbe verte), transplantés (courbe bleue) et de la population générale (courbe rouge).

La forte prévalence des facteurs de risques cardiovasculaires traditionnels chez le transplanté (hypertension artérielle, diabète, obésité, tabagisme, hypercholestérolémie) peut expliquer la surmortalité d'origine cardiovasculaire. Ojo *et al* ont montré que la fréquence des facteurs de risques cardiovasculaires reste stable après transplantation rénale ; elle peut même être augmentée pour certains facteurs, en particulier le diabète, l'hypercholestérolémie et l'obésité [revue, (Ojo 2006)].

Notre équipe s'intéresse depuis plusieurs années à l'identification de marqueurs biologiques non traditionnels particuliers à la population des transplantés rénaux pouvant expliquer le sur-risque cardiovasculaire observé après transplantation. Un certain nombre de travaux ont été conduits afin de préciser l'importance des phénomènes immunologiques et d'évaluer le rôle de la polarisation fonctionnelle des lymphocytes T dans l'athérosclérose post-transplantation. Nous avons notamment rapporté que les globulines anti-lymphocytaires polyclonales (GALP) (utilisées en traitement d'induction de la transplantation et présentant un très fort pouvoir de déplétion sur le système immunitaire) pouvaient entraîner une lymphopénie T CD4 persistante ( $CD4 < 300/mm^3$ ) à 5 ans chez près de 20% des patients. Notre équipe a montré que ce marqueur immunologique était associé à une augmentation de l'incidence de cancers, de maladies cardiovasculaires et de décès (Ducloux *et al.* 1998, Ducloux *et al.* 2002, Ducloux *et al.* 2003, Ducloux *et al.* 2010). Par ailleurs, cette lymphopénie T CD4 est associée à certaines anomalies biologiques (syndrome inflammatoire chronique, lymphopénie B, gammopathie monoclonale) (Ducloux *et al.* 1999, Ducloux *et al.* 2010). Le rôle de l'inflammation et de l'orientation de la réponse lymphocytaire reste mal connu en transplantation rénale. Nous avons montré que l'élévation de la CRP augmentait le risque d'évènements coronariens (Ducloux *et al.* 2004), suggérant le rôle de la micro-inflammation dans l'athérogénèse après transplantation rénale. Ces anomalies immunologiques et inflammatoires, décrites habituellement chez les personnes âgées (Ferguson *et al.* 1995, Wikby *et al.* 1998), pourraient également traduire un vieillissement prématuré du système immunitaire ou immunosénescence après transplantation rénale. La présence d'un syndrome inflammatoire chronique semble en effet contribuer au développement de l'immunosénescence et participerait au développement de nombreuses pathologies métaboliques et neurologiques [revues, (Franceschi *et al.* 2000, Franceschi *et al.* 2014)].

Si l'on s'intéresse à la source de cette inflammation chronique, celle-ci a été le plus souvent associée à une stimulation permanente de l'immunité. Il a été décrit que cette stimulation pouvait notamment provenir de la présence de composants bactériens circulants et inflammatoires, comme les lipopolysaccharides (LPS) présents à la surface des bactéries à Gram négatif. Ces antigènes provoquent une réaction immunitaire de la part des cellules de l'immunité innée (monocytes/macrophages) qui reconnaissent le LPS et produisent alors des cytokines pro-inflammatoires [revue, (Nijland *et al.* 2014)]. La présence de LPS dans la circulation périphérique semble provenir majoritairement des bactéries à Gram négatif contenues dans la lumière intestinale (représentant le microbiote) (Kim *et al.* 2016). La translocation des bactéries dans le sang a lieu s'il y a une rupture de l'effet protecteur de la barrière intestinale [revue, (Bischoff *et al.* 2014)]. Le microbiote intestinal a un rôle dans le maintien de la santé et la causalité de certaines maladies. Une modification du microbiote peut apparaître sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux (Turpin *et al.* 2016) mais elle joue elle-même un rôle dans l'initiation, le maintien ou la sévérité de l'inflammation, engendrant un cercle vicieux (Brown *et al.* 2013).

Une atteinte digestive en transplantation rénale pourrait peut-être expliquer en partie l'origine de l'inflammation chronique, de l'immunosénescence et des complications cliniques associées à la transplantation telles que le rejet, les infections ou encore les maladies cardiovasculaires.

# INTRODUCTION

---

---

## **Partie 1 : Microbiote et translocation bactérienne digestive**

L'intestin est une portion du tube digestif comprise entre l'estomac et l'anus. Il est doué d'une motricité propre, en grande partie réflexe, qui va pousser le bol alimentaire au fur et à mesure de sa digestion. L'intestin grêle est formé d'un segment fixe, le duodénum, suivi de deux segments mobiles, le jéjunum puis l'iléon, mesurant environ 6 mètres chez l'homme. En raison des villosités qui le composent, il est le lieu principal d'absorption d'eau et de nutriments par l'organisme. Le gros intestin mesure 1 mètre à 1,5 mètres et comporte trois parties : le cæcum, le côlon et le rectum. Le gros intestin héberge des bactéries pouvant décomposer des molécules que le corps humain n'est pas capable d'assimiler [revue, (Bischoff *et al.* 2014)].

Le contenu du tractus digestif est formé de milliard de bactéries, formant le microbiote. Il est entouré de la muqueuse intestinale, soutenue par un épithélium et assurant un effet barrière.

### **1. La barrière intestinale**

L'épithélium et la muqueuse constituent ce qu'on appelle la barrière intestinale dont un des rôles est d'isoler les micro-organismes intestinaux du reste de l'individu. La surface de l'épithélium intestinal est d'environ 200m<sup>2</sup> reposant sur la muqueuse intestinale. L'effet barrière se fait par diminution du contact direct entre les bactéries intestinales et l'épithélium et en confinant et limitant la pénétration des bactéries dans l'organisme par passage paracellulaire (entre les cellules adjacentes) à travers la muqueuse. Pour cela, l'intestin consomme environ 40 % des dépenses énergétiques de l'organisme et la muqueuse contient plus de 60 % des cellules du système immunitaire [revue, (Bischoff *et al.* 2014)].

#### **1.1. Contrôle du passage paracellulaire**

##### **1.1.1. Les cellules de l'épithélium intestinal**

Au niveau de l'intestin grêle, l'épithélium présente une structure en cryptes et villosités. Les cryptes sont des invaginations dans le stroma composées de cellules souches intestinales et enrichies en cellules de Paneth. Les cellules souches donnent

naissance à des cellules progénitrices qui entament leur migration en tapis roulant jusqu'au sommet des villosités où les cellules épithéliales intestinales (CEI) différenciées se détachent par exfoliation (**figure 3**). Le tissu intestinal dispose du plus haut taux de renouvellement avec un cycle de 3 à 5 jours. Les villosités sont des protrusions dans la lumière intestinale composées de cellules différenciées exerçant des fonctions particulières [revue, (Quesada *et al.* 2016)]. La perméabilité intestinale est plus importante au niveau des cryptes qu'au sommet des villosités (Fihn *et al.* 2000).

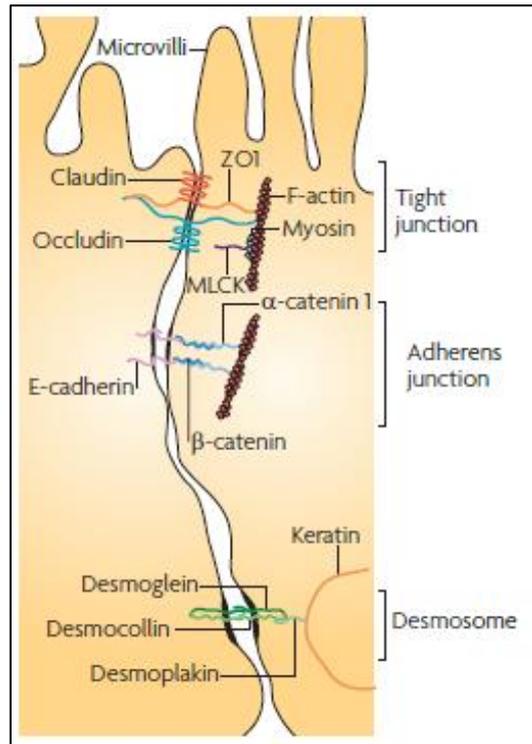
Classiquement, on décrit quatre types cellulaires (**figure 3**) (Grun *et al.* 2015) :

- Les entérocytes, majoritaires (absorption des nutriments)
- Les cellules de Paneth, au fond des cryptes (défense antimicrobienne)
- Les cellules caliciformes (sécrétion de mucus)
- Les cellules entéro-endocrines (régulation du métabolisme *via* hormones)

Contrairement à l'intestin grêle, le côlon est constitué d'un épithélium de surface sans villosités, et il est dépourvu de cellules de Paneth [revue, (Peterson *et al.* 2014)].

### 1.1.2. Barrière physique, les jonctions serrées

L'épithélium est semi-perméable aux solutés hydrophiles en l'absence de transporteurs spécifiques. Le passage paracellulaire est contrôlé au niveau des jonctions apicales, composées de jonctions serrées (TJ, pour *tight junctions*) et des jonctions adhérentes (**figure 2**). En descendant vers le pôle basal des CEI, des jonctions adhésives appelées desmosomes maintiennent également la proximité entre les cellules. Les TJ sont composées principalement de protéines transmembranaires de la famille des claudines (Furuse *et al.* 1998) interagissant avec l'actine pour limiter le passage de protéines ou de produits bactériens. Les jonctions adhérentes sont composées principalement de protéines transmembranaires de la famille des cadhérines capables de former des interactions avec les caténines des cellules adjacentes [revues, (Lievin-Le Moal *et al.* 2006, Turner 2009)]. Le renouvellement rapide des cellules épithéliales participe aussi au maintien physique de la barrière.

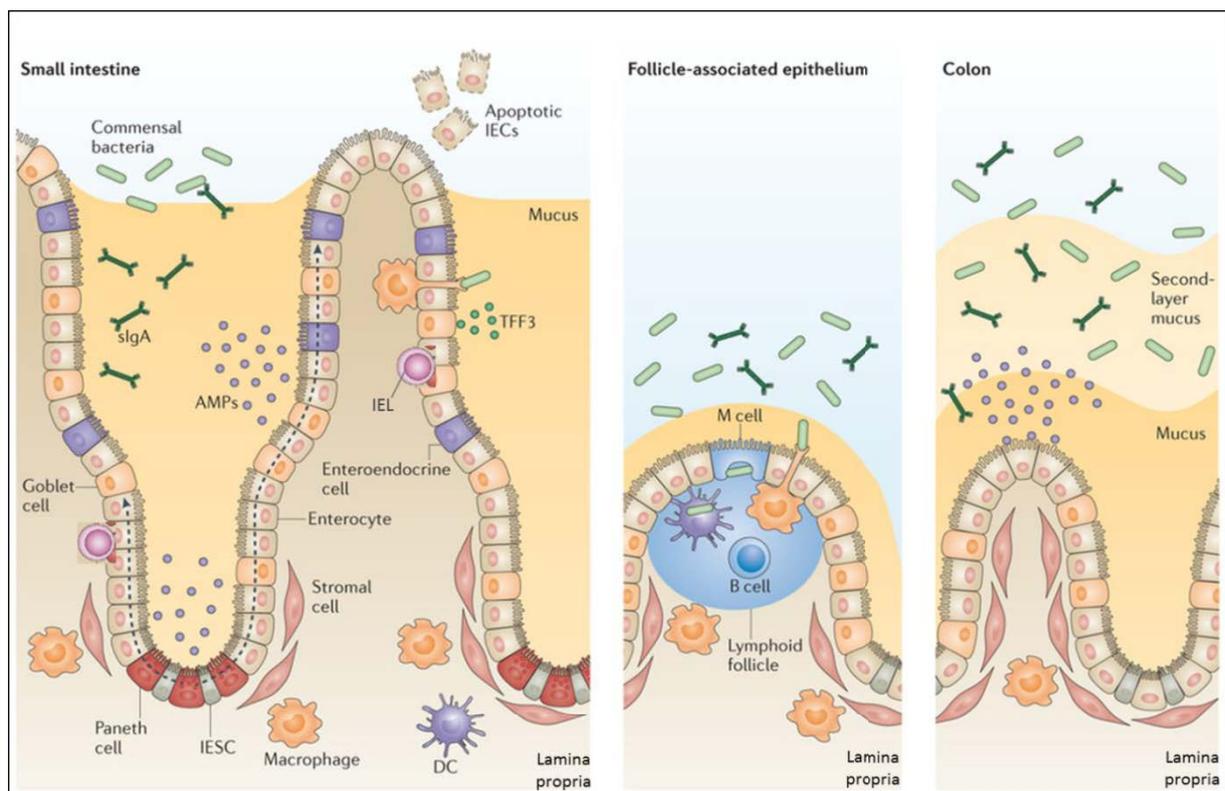


**Figure 2: Jonctions intercellulaires des cellules épithéliales intestinales adjacentes.** Du pôle apical jusqu'au pôle basal on retrouve les jonctions serrées ou *tight junctions*, les jonctions adhérentes (*adherens junctions*) et des desmosomes. D'après (Turner 2009).

### 1.1.3. Barrière chimique, le mucus

La surface de l'épithélium intestinal est recouverte d'un gel hydraté visqueux (mucus) formé de mucines. Les mucines sont des protéines synthétisées par les cellules caliciformes ayant des propriétés antimicrobiennes. Le mucus prévient le contact entre les bactéries intestinales et l'épithélium intestinal [revue, (Turner 2009)]. L'épaisseur de la couche de mucus varie le long du tube digestif ; elle est maximale dans l'iléon terminal et surtout le côlon. Le mucus est subdivisé en une couche extérieure contenant des bactéries commensales anaérobiques et une couche intérieure stérile (**figure 3**) [revue, (McGuckin *et al.* 2011)].

Le mucus est constitué de molécules antimicrobiennes synthétisées par les CEI et plus particulièrement par les cellules de Paneth. Ces molécules détruisent ou inhibent la croissance des micro-organismes. Certains de ces peptides antimicrobiens sont synthétisés de manière constitutive ( $\alpha$ -défensines, cathelicidines, lysozymes, et lectines comme REGIII $\gamma$ ) et d'autres sont inductibles principalement par des composés microbiens *via* certains récepteurs de l'immunité (immunoglobulines (Ig) A et IgG) (Ganz *et al.* 1985, Zanetti *et al.* 1995) [revues, (Lievin-Le Moal *et al.* 2006, McGuckin *et al.* 2011)].



**Figure 3 : Structure de l'épithélium et de la muqueuse intestinale au niveau de l'intestin grêle et du colon.** Au niveau de l'intestin grêle (small intestine), l'épithélium présente une structure en cryptes et villosités. Les cryptes sont composées de cellules souches intestinales (IESC). Les cellules épithéliales intestinales (CEI) différenciées se détachent par exfoliation (apoptotic IECs). Les entérocytes (enterocytes) ont pour fonction essentielle l'absorption des nutriments, les cellules de Paneth (Paneth cells) synthétisent des peptides antimicrobiens (AMPs), les cellules caliciformes (Goblet cells) sécrètent le mucus et les cellules entéro-endocrines (enteroendocrine cells) régulent le métabolisme. Le colon est formé d'une double couche de mucus. La muqueuse intestinale est composée de nombreuses cellules immunitaires : lymphocytes T et B (B cells), cellules dendritiques (DC), macrophages et LT intraépithéliaux (IEL). Les LB synthétisent des IgA sécrétoires (sIgA) dans le mucus. Les CEI dédifférenciées appelées cellules M sont présentes dans les plaques de Peyer et les nodules lymphoïdes isolés (Lymphoid follicle) ont un rôle de cellules présentatrices d'antigènes. Modifié d'après (Peterson *et al.* 2014, Piton *et al.* 2016).

Ne sont pas représentées sur ce schéma l'ensemble des cellules de l'immunité adaptative T (notamment Th17 et Treg) et les ILC participant à l'homéostasie intestinale.

## 1.2. Immunité de la muqueuse intestinale

Bien que la barrière épithéliale soit efficace pour l'exclusion des micro-organismes commensaux, les pathogènes et les parasites entériques sont capables de développer des stratégies pour contourner l'effet barrière [revue, (Konig *et al.* 2016)]. C'est pourquoi la présence d'un système immunitaire développé au sein de la muqueuse intestinale est nécessaire [revue, (McGuckin *et al.* 2011)]. Hooper *et al* parlent de système « *Inside-Out* » pour caractériser le contrôle des micro-organismes par le système immunitaire [revue, (Hooper *et al.* 2012)].

On peut schématiquement séparer l'immunité intestinale en une composante innée constituée de cellules épithéliales et de cellules présentatrices d'antigènes (CPA), et une composante adaptative constituée de lymphocytes. L'interaction entre ces différentes cellules se fait au niveau des organes lymphoïdes secondaires : les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT, pour *mucosa-associated lymphoid tissue*) et plus particulièrement des GALT, pour *gut-associated lymphoid tissue* composés principalement essentiellement de sites inducteurs de la réponse immunitaire tels que les plaques de Peyer et les follicules lymphoïdes isolés.

L'immunité innée intestinale se caractérise par la présence de CPA et de macrophages dans la lamina propria, capables de sélectionner les antigènes de la lumière intestinale via des dendrites étendues entre les cellules épithéliales. Les CEI dédifférenciées, appelées cellules M, sont présentes dans les plaques de Peyer et les nodules lymphoïdes isolés et jouent également le rôle de CPA. Elles font traverser l'information par leur cytoplasme sous forme de vésicules libérées dans le microenvironnement immunocompétent sur lequel elles reposent [revue, (Peterson *et al.* 2014)]. L'ensemble de ces cellules captent les antigènes par des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires tels que les récepteurs de type Toll (TLR, pour Toll like receptors). Les cellules innées lymphoïdes (ILC, pour *innate lymphoid cells*) forment une famille d'effecteurs de la réponse innée dépourvus de récepteurs spécifiques aux antigènes, dont la fonction est proche de celle des T *helper* (Th). Les ILC répondent, rapidement et sans activation préalable, à toute perturbation de l'environnement, qu'elle soit d'origine microbienne ou non, pathogène ou non. (Robinette *et al.* 2015). Plus particulièrement, les ILC-3 contribuent au confinement des

bactéries dans l'intestin par leur capacité de recruter des cellules dendritiques (DC, pour *dendritic cells*) et des lymphocytes B (LB) et T (LT), afin de compléter l'organisation anatomique des ganglions périphériques et mésentériques et des plaques de Peyer. Elles produisent des interleukines (IL)-17 et IL-22 ayant un rôle dans le maintien de la barrière épithéliale et la synthèse de peptides antimicrobiens [revue, (Gaugler *et al.* 2013)]. De plus, il a été montré, dans des souris pauvres en ILC et en Th17 par déficience en ROR $\gamma$ t, que ces cellules ont un rôle dans la synthèse et la commutation isotypique des IgA (Tsuji *et al.* 2008) [revue, (Brown *et al.* 2013)].

Après présentation antigénique par les CPA au niveau des GALT, les lymphocytes naïfs T et B spécifiques de l'antigène sont ainsi activés. Les LB activés terminent leur différenciation en plasmocytes produisant des IgA spécifiques. Les IgA sécrétoires (sIgA) résultent de la combinaison d'IgA dimériques (deux IgA et une pièce de jonction, pièce J) et de la pièce sécrétoire lors de la transcytose dans les CEI. Les IgA osponisent les bactéries et les maintiennent dans la lumière intestinale en vue de leur élimination [revues, (Cerf-Bensussan *et al.* 2010, Brown *et al.* 2013)]. Les LT résidents (principalement CD4<sup>+</sup>) de la lamina propria sont activés en fonction notamment de l'environnement cytokinique. Les LT activés sont orientés vers un phénotype pro-inflammatoire (ou effecteur) de type Th1, Th2 ou Th17 ou anti-inflammatoire (ou régulateur) de type T régulateurs (Treg) (Harrington *et al.* 2005). La lutte antibactérienne et l'homéostasie intestinale sont maintenues grâce à une balance entre Th17 et Treg (Chevalier *et al.* 2013) importants pour soutenir les LB dans la production d'IgA, et prévenir l'auto-immunité (Suri-Payer *et al.* 1998) et l'inflammation chronique (Read *et al.* 2000). On retrouve également des LT intraépithéliaux (**figure 3**) (IEL, pour *intraepithelial lymphocytes*), à raison d'environ un IEL pour 10 à 20 CEI dans l'intestin grêle. Les IEL expriment le CD8 et ont une activité cytotoxique. De plus, ils sont capables de produire des cytokines proinflammatoires comme l'IFN- $\gamma$  (Qiu *et al.* 2016).

## 2. Le Microbiote

### 2.1. Développement du microbiote intestinal

Il y a seulement quelques années, le terme « microbiote » était inconnu, on parlait anciennement de « flore ». Le microbiote est un écosystème complexe qui comprend l'ensemble des êtres non pathogènes d'un organisme, principalement des bactéries mais aussi des virus et des champignons. Il existe différents microbiotes : au niveau de la peau, de la bouche, ou encore du vagin [revue, (Cho *et al.* 2012)]. Le microbiote intestinal est le plus important d'entre eux. Au niveau du tractus intestinal, la communauté bactérienne est estimée à  $10^{14}$  bactéries et composée de plus de 1 000 espèces différentes [revues, (Eckburg *et al.* 2005, Ley *et al.* 2006)]. Le nombre de cellules procaryotes qui habitent notre intestin a longtemps été estimé à 10 fois supérieur au nombre total de cellules eucaryotes composant notre organisme (Qin *et al.* 2010). Sender *et al.* ont récemment montré que le nombre de cellules procaryotes et eucaryotes est équivalent dans l'organisme (Sender *et al.* 2016).

Le microbiote se constitue dès la naissance puis évolue qualitativement et quantitativement sous l'influence de l'environnement. Le nouveau-né naît stérile puis son tractus digestif est colonisé dès l'accouchement par la flore bactérienne de sa mère : vaginale (*Lactobacilles*) et fécale (*Enterobactéries* et *Bifidobactéries*). La prématurité et le mode de naissance ont un impact sur la composition du microbiote [revue, (Matamoros *et al.* 2013)] (Dominguez-Bello *et al.* 2010, Dominguez-Bello *et al.* 2016). Ensuite, sous l'influence de la diversification alimentaire, de la génétique, du niveau d'hygiène ou encore de l'environnement, la composition du microbiote intestinal va évoluer qualitativement et quantitativement pendant les premières années de vie (Backhed *et al.* 2015, Turpin *et al.* 2016) [revue, (Spor *et al.* 2011)]. Les bactéries sont détectables dans les fèces quelques heures après la naissance. Le niveau de colonisation de l'intestin du nouveau-né est estimé à  $10^8$  à  $10^{11}$  colonies/g de fèces, 48 heures après sa naissance [revue, (Campeotto *et al.* 2007)]. La colonisation bactérienne a lieu de façon progressive, dans un ordre bien précis : les premières bactéries intestinales sont les bactéries aérobies : *Entérocoques*, *Staphylocoques*. Les bactéries anaérobies (*Bacteroides*, *Clostridium*, *Bifidobacterium*...) se développeront ensuite, en dominance dans l'intestin,

une fois que les bactéries anaérobies facultatives auront consommé l'oxygène présent (Stark *et al.* 1982, Ley *et al.* 2006).

L'équivalent du microbiote adulte est atteint en moyenne à l'âge de deux ou trois ans (Yatsunenکو *et al.* 2012). Une fois établie, la composition du microbiote est spécifique à l'hôte et relativement stable dans des conditions normales (Vanhoutte *et al.* 2004) [revue, (Campeotto *et al.*, 2007)]. La stabilisation des souches au sein du tractus digestif est dépendante de paramètres liés à chaque souche bactérienne et est régulée par des interactions hôte-bactéries favorisant ou non la colonisation des surfaces épithéliales par les microorganismes. Parmi ces paramètres, on retrouve la capacité des bactéries à se multiplier afin de contrer leur élimination. Il existe des souches ayant développé des propriétés d'adhésion à l'épithélium, d'autres des biofilms, favorisant leur implantation (Lepage *et al.* 2005). La compétition entre les bactéries aboutit aussi à l'inhibition de certaines d'entre elles (Hooper *et al.* 1999). De plus, pour qu'une bactérie s'implante, il est nécessaire qu'elle trouve les facteurs appropriés au sein du tractus digestif de l'hôte. La survie des microorganismes dans l'environnement dépend du pH, des nutriments, de l'oxygène, etc. La présence de mucus au sein de la paroi digestive permettrait aux micro-organismes à croissance lente de coloniser le tractus [revue, (Dore *et al.* 2010)].

Divers événements peuvent modifier le microbiote, de façon plus ou moins durable tels que des traitements médicamenteux, des modifications de l'hygiène de vie ou une contamination par un pathogène. Par exemple, un traitement antibiotique réduit la qualité et la quantité du microbiote de plusieurs jours à plusieurs semaines. Néanmoins, il existe un phénomène de résilience, c'est-à-dire le retour à l'équilibre après un événement perturbateur, mais certaines différences peuvent subsister (De La Cochetiere *et al.* 2005).

## **2.2. Composition du microbiote intestinal**

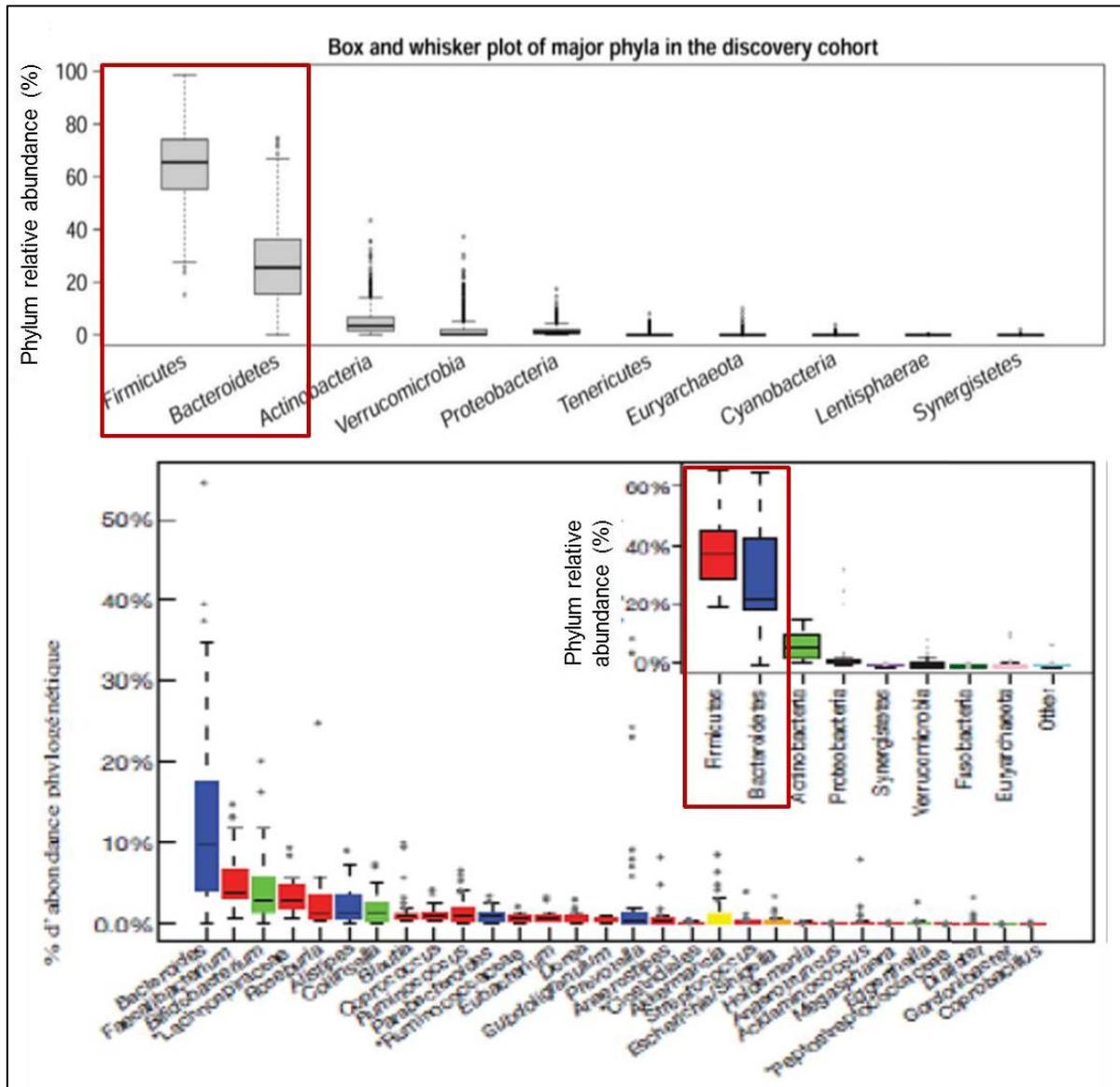
Le microbiote intestinal de chaque être humain est composé de plusieurs centaines d'espèces bactériennes différentes comprenant un nombre de gènes 100 à 150 fois supérieur à celui de l'homme (Turnbaugh *et al.* 2007). Récemment, les études *Human Microbiome Project* (HMP) et *Metagenomics of the Human Intestinal Tract* (MétaHIT) montrent qu'il pourrait y avoir plus de 10 millions de gènes non redondants

au sein du génome du microbiote humain, appelé microbiome [revue, (Jandhyala *et al.* 2015)].

Le microbiote intestinal présente une très grande diversité d'espèces bactériennes à l'origine :

- d'une variation de fonctions potentielles
- d'une variation interindividuelle : chaque individu a un microbiote intestinal différent en termes d'espèces bactériennes. Néanmoins, certaines espèces sont présentes chez la majorité des individus.
- d'une variation selon l'environnement tout au long du tractus intestinal. Le tractus intestinal possède une surface étendue de plus de 200 m<sup>2</sup> chez l'homme. Certaines espèces bactériennes colonisent une niche spécifique. La densité totale et la diversité microbienne augmentent le long du tractus intestinal depuis l'œsophage jusqu'au gros intestin.

Pour caractériser la composition du microbiote, la classification des procaryotes s'établit selon une taxonomie en domaines, embranchements (ou phyla), classes, ordres, familles, genres et espèces. Les principaux phyla représentés au sein du microbiote des mammifères non pathogènes : *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Cyanobacteria*, *Fusobacteria* et *Spirochètes* [revue, (Brown *et al.* 2013)]. Les deux phyla dominants sont *Firmicutes* et *Bacteroidetes* (**figure 4**) (Arumugam *et al.* 2011, Turpin *et al.* 2016). Les bactéries des différents phyla présentent des caractéristiques et des implications sur la santé différentes (**tableau 1**).



**Figure 4 : Profil phylogénétique du microbiome intestinal humain sain.** Prépondérance des phyla *Firmicutes* et *Bacteroidetes* (cadrans rouges). D'après (Arumugam *et al.* 2011, Turpin *et al.* 2016)

**Tableau 1 : Caractéristiques principales des 4 principaux phyla bactériens du microbiote intestinal.**  
D'après (Ley *et al.* 2006) et (Turpin *et al.* 2016)

Phylum	Densité	Grandes classes	Caractéristiques	Implications en santé	Autre
<b>Firmicutes</b>	Microbiote dominant Représente 40- 60% de la flore	Majoritairement bactéries Gram + (à G+C faible)  1. <i>Clostridia</i> 2. <i>Bacilli</i> 3. <i>Mollicutes</i>	Diversité très importante de formes (coccis, spirales...), de métabolismes (aérobie, anaérobie) ou de formes de résistances (présence ou absence de spores)	Les <i>Firmicutes</i> sont impliqués dans la régulation de l'énergie et dans l'obésité	Phylum majoritaire à la fois chez les souris et les hommes
<b>Bacteroidetes</b>	Microbiote dominant  Représente 30-40% de la flore	Bactéries Gram –  1. <i>Bacteroidetes</i> 2. <i>Flavobacteria</i> 3. <i>Sphingobacteria</i>	Bacilles anaérobies ++	Les membres du genre <i>Bacteroides</i> sont des agents pathogènes opportunistes (bactériémies, suppurations...)  Les Bacteroidetes auraient un effet bénéfique sur l'obésité, pour l'absorption des nutriments, et pour les cellules épithéliales	Largement répandues dans l'environnement (sol, sédiments, eau de mer)
<b>Actinobacteria</b>	Représente 5-10% de la flore	Majoritairement bactéries Gram + (à G+C élevé)  <i>Actinobacteria</i>	Diversité importante de formes (coccis, cocco-bacilles...)  Grande variété de compositions de la paroi cellulaire	La majorité des espèces sont saprophytes ou commensales  Quelques-unes ( <i>Mycobacterium</i> ) peuvent être pathogènes chez des individus à résistance affaiblie	
<b>Proteobacteria</b>	Représente -1% de la flore	Bactéries Gram –  1. <i>Alphaproteobacteria</i> 2. <i>Betaproteobacteria</i> 3. <i>Gammaproteobacteria</i> 4. <i>Deltaproteobacteria</i> 5. <i>Epsilonproteobacteria</i>	Diversité très importante de formes (coccis, bâtonnets...), de métabolismes (aérobie, anaérobie) ou de mobilité (présence ou absence de flagelle)	Ce groupe inclut des bactéries pathogènes telles <i>Escherichia</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Vibrio</i> et <i>Helicobacter</i> .	C'est le groupe le plus large mais phylogénétiquement le plus cohérent du domaine des <i>Bacteria</i>

### 2.2.1. Densité bactérienne le long du tractus intestinal

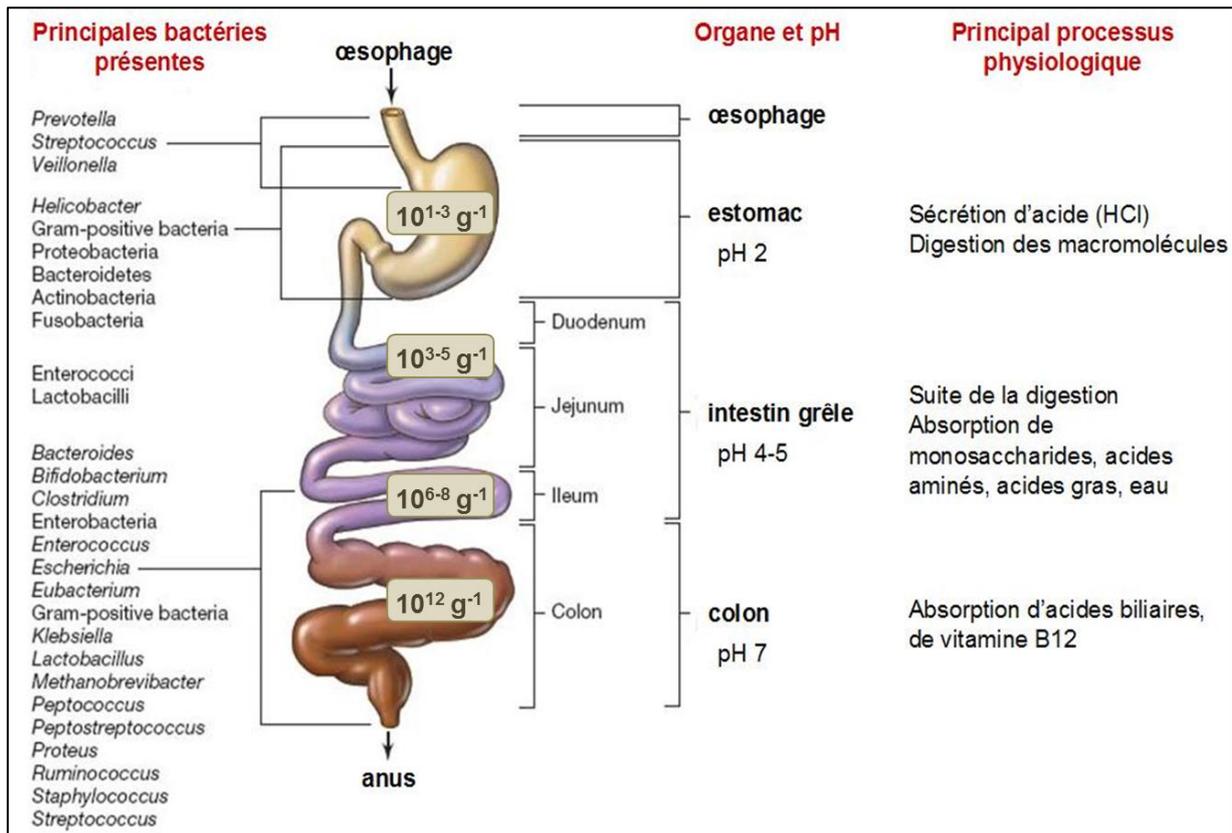
Le nombre de bactéries varie de  $10^1$  à  $10^3$  par gramme de contenu dans l'œsophage et l'estomac. Cette densité reste relativement faible tout le long du tractus intestinal proximal avec  $10^{3-4}$  bactéries par gramme dans le duodénum,  $10^{4-5}$  bactéries par gramme dans le jéjunum et  $10^{6-8}$  bactéries par gramme dans l'iléon. Cette faible densité peut-être expliquée par le faible pH gastrique, le flux luminal rapide qui limite la croissance bactérienne, les acides biliaires qui sont sécrétés dans le duodénum et qui possèdent un fort pouvoir bactéricide et la sécrétion d'IgA qui limitent la pénétration des bactéries dans le mucus et donc augmentent l'élimination des bactéries par péristaltisme. Enfin, de nombreux antimicrobiens synthétisés par les cellules épithéliales exercent leurs actions sélectivement sur différentes bactéries.

A l'inverse, au niveau du tractus intestinal distal, les propriétés du colon permettent la prolifération bactérienne (pH neutre, faible concentration d'acide biliaire, temps de rétention plus long...). Le microbiote atteint jusqu'à  $10^{12}$  bactéries par gramme de selles dans le gros intestin. [Revue, (Dore *et al.* 2010, Sekirov *et al.* 2010)]

### 2.2.2. Diversité bactérienne le long du tractus intestinal

Les différences de densité et de diversité observées le long du tractus intestinal sont appelées les différences longitudinales du microbiote (**figure 5**). Le genre *Streptococcus* est dominant au niveau de l'œsophage alors que le genre *Helicobacter* est dominant dans l'estomac. Dans l'intestin grêle, le microbiote est constitué de bactéries anaérobies facultatives, ainsi, les genres dominants sont les *Streptococcus*, *Lactobacillus* et *Enterobacteria*. La composition du gros intestin est plus discutée. Les bactéries anaérobies strictes représentent quasiment la totalité des bactéries présentes. Elles appartiennent au phyla prédominants des *Firmicutes* et *Bacteroidetes*. On retrouve principalement des bactéries des genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium* et *Clostridium*. Il existe également un microbiote sous-dominant, constitué de bactéries anaérobies facultatives telles que les bactéries des genres *Escherichia* ou *Enterobacteria*.

Un microbiote intestinal sain est généralement marqué par la dominance des genres *Bacteroides*, *Prevotella* et *Ruminococcus*, associée à une faible abondance de *Proteobacteria* et ses espèces bactériennes pathogènes telles que *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enterica*, *Vibrio cholera* et *Escherichia coli* (*E. coli*) [revue, (Jandhyala *et al.* 2015)].



**Figure 5: Diversité bactérienne longitudinale et description du tractus digestif humain.** Distribution des bactéries non pathogènes rencontrées chez l'adulte. Modifié d'après *Biology of microorganisms*, Brock, Pearson Eds (12<sup>ème</sup> édition, 2009), pp 817.

### 2.2.3. Diversité bactérienne transversale

Les différences de densité et de diversité observées de la muqueuse à la lumière intestinale sont appelées les différences transversales ou radiales. Certaines espèces résidentes sont étroitement liées à la couche du mucus, alors que les espèces transitoires sont localisées dans la lumière intestinale et se retrouvent au niveau des selles (Zoetendal *et al.* 2002). Chez l'Homme, l'intestin contient des plis qui peuvent fournir des niches pour les espèces résidentes (Nava *et al.* 2011). Plusieurs études ont montré que la communauté microbienne qui colonise la couche de mucus était stable dans le temps et remarquablement similaire de l'iléon au rectum pour un individu donné (Lepage *et al.* 2005, Wang *et al.* 2005).

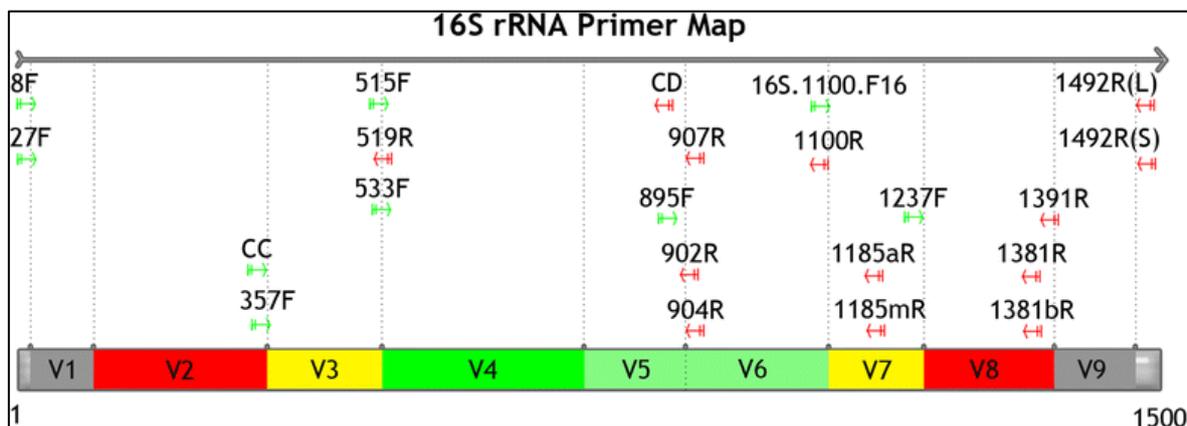
Chez la souris, il a été décrit qu'au niveau du mucus, les bactéries les plus abondantes sont les *Firmicutes*, principalement *Clostridium* (familles *Lachnospiraceae* et *Ruminococcaceae*), *Lactobacillus* et *Enterococcus*. Au niveau luminal, les *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Enterobacteriaceae* sont largement majoritaires (Nava *et al.* 2011). Les bactéries filamenteuses segmentées (SFB, pour *Segmented Filamentous Bacteria*) sont des bactéries Gram positif anaérobiques apparentées au genre *Clostridium* présentes dans l'intestin, en particulier dans la partie terminale de l'iléon. Les SFB développent des interactions privilégiées avec les plaques de Peyer et sont donc plutôt retrouvées dans le mucus que dans la lumière intestinale (Gaboriau-Routhiau *et al.* 2009). Ces différences semblent être aussi retrouvées chez l'homme (Willing *et al.* 2010), cependant l'étude de la distribution spatiale des bactéries reste difficile.

### **2.3. Techniques utilisées pour étudier le microbiote**

#### **2.3.1. De la culture bactérienne à la biologie moléculaire : étude de l' « ARNr 16S»**

La recherche sur la flore bactérienne intestinale a été initiée à la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. Les premières estimations de la composition de la flore microbienne ont été tirées des techniques traditionnelles de bactériologie telles que la culture, la microscopie et l'étude de la fermentation des sucres des bactéries isolées de selles humains [revue, (Moore *et al.* 1974). Cependant, ces techniques ne permettaient d'étudier que 10 à 25 % des germes intestinaux puisque la majorité des microorganismes intestinaux est non cultivable. L'avènement de la biologie moléculaire a permis d'étudier le microbiote dans sa globalité et de décrire sa grande diversité [revue, (Eckburg *et al.* 2005)]. A partir du milieu des années 1980, Carl Woese a révolutionné le domaine de la microbiologie grâce à des comparaisons phylogénétiques fondées sur les acides ribonucléiques (ARN) ribosomaux [revue, (Woese 1987)] (Lane *et al.* 1985). Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique (c'est-à-dire composé de protéines et d'ARN) permettant la synthèse des protéines. Chez les bactéries, le ribosome est composé d'une grande sous-unité (50S) et d'une petite sous-unité (30S) (Root-Bernstein *et al.* 2015). Des travaux préliminaires ont pu montrer que le gène *ARNr 16S* code pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16S de la petite sous-unité. Parce qu'il contient des régions hautement conservées (pour la conception d'amorces) et des régions hypervariables (pour identifier les

caractéristiques phylogénétiques des micro-organismes), le gène *ARNr 16S* est devenu le gène marqueur le plus largement utilisé pour le profilage des communautés bactériennes [revues, (Olsen *et al.* 1993, Petti 2007)]. Il est composé d'environ 1 500 nucléotides (**figure 6**) et constitué de neuf régions hypervariables qui sont séparées par neuf régions hautement conservées (Yang *et al.* 2016) (**figure 7**). Le terme de «PCR 16S» sera utilisé par abus de langage dans les décennies suivantes pour nommer l'amplification du gène codant pour l'*ARNr 16S*. Limitée par la technologie de séquençage, les séquences du gène de l'*ARNr 16S*, utilisées dans la plupart des études, sont des séquences partielles. Différentes techniques de séquençage sont disponibles et sont sélectionnées en fonction informations souhaitées pour l'étude (**tableau 2**). Par conséquent, la sélection d'amorces appropriées est indispensable pour étudier la phylogénie bactérienne dans divers environnements. La nomenclature des amorces reste non consensuelle ; souvent les auteurs nomment une amorce avec un nombre faisant référence à la position de la première base sur le gène *ARNr 16S* d'*E. coli*, suivi de F ou R pour *forward* ou *reverse* (**figure 6**). Les régions V4, V5 et V6 englobent les principaux éléments fonctionnels de l'*ARNr*. La boucle « 690 en épingle à cheveux » est une boucle hautement conservée située dans la région V4 (Yang *et al.* 2016).



**Figure 6 :** Illustration des régions variables du gène *ARNr 16S* d'*Escherichia coli*. Les régions en vert (V4, V5, V6) présentent les plus courtes distances entre deux points, elles ont donc un réel intérêt pour une analyse phylogénétique. D'après (Yang *et al.* 2016).

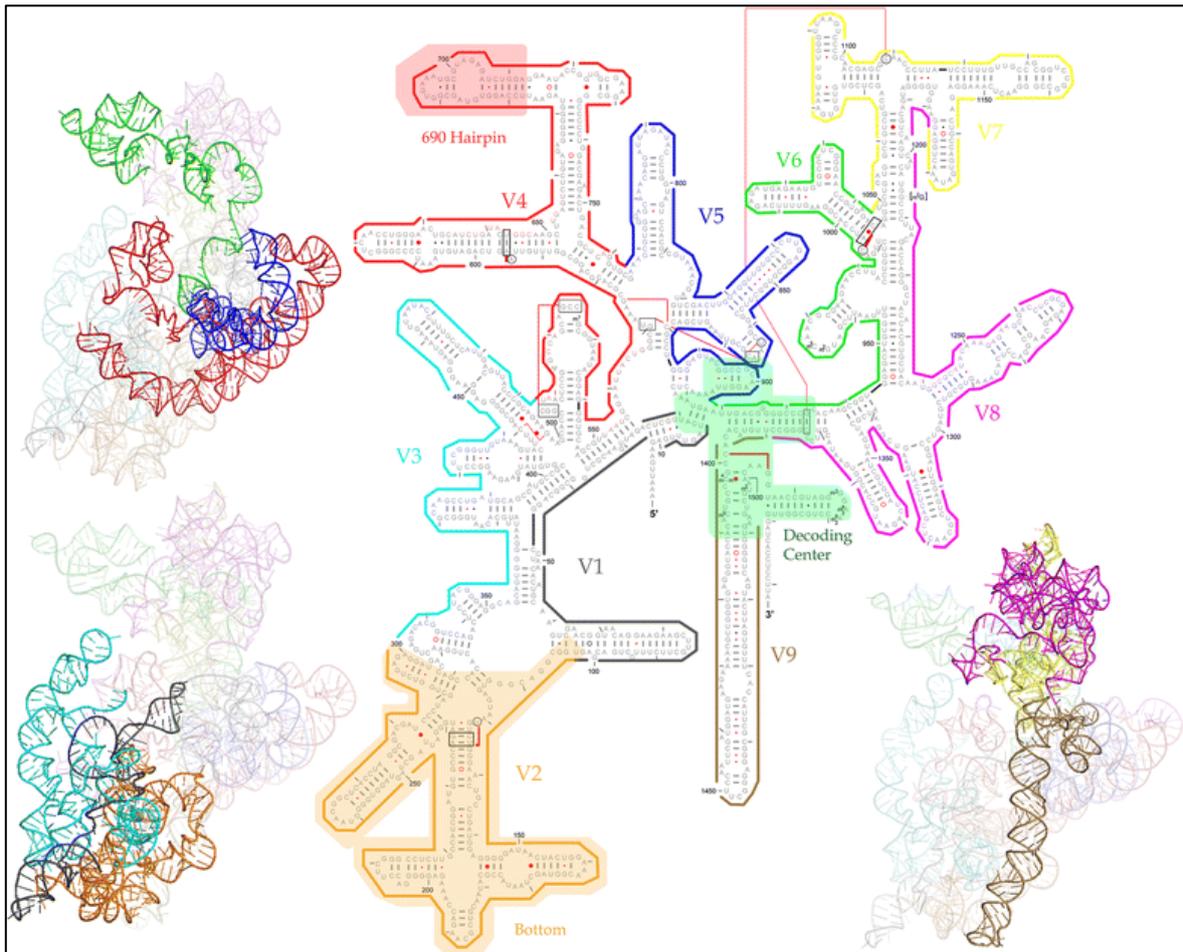


Figure 7 : Structure 2D-3D du gène *ARNr 16S*. Les régions sont représentées avec les mêmes couleurs en structure 2D et 3D. D'après (Yang *et al.* 2016).

### 2.3.2. Les « Méta » analyses

Un génome est la totalité de l'information génétique d'un organisme unique que l'on peut représenter comme une population statistique de gènes. Un métagénome est la totalité de l'information génétique d'une communauté d'organismes [revue, (Ghurye *et al.* 2016)]. Néanmoins, dans le cadre d'une étude d'un écosystème complexe, on ne peut avoir accès à la totalité d'un métagénome (**tableau 2**). Du fait de la dynamique et de la variation d'une communauté microbienne, il est difficile de mettre en place un référentiel absolu qui permettrait la mise en application d'études comparatives semblables à la post-génomique. Cependant, les études post-métagénomiques se développent (métatranscriptomique ; métaprotéomique et méta-métabolomique) pour déterminer les fonctions potentielles de l'écosystème microbien [revue, (Sekirov *et al.* 2010)].

### 2.3.3. Les analyses bio-informatiques

Les données obtenues du séquençage haut débit sont volumineuses, fragmentées, et souvent contaminées. Seules des analyses bio-informatiques permettent de filtrer les données pour les exploiter et surtout pour assigner les séquences [revue, (Thomas *et al.* 2012)]. La définition du concept d'espèce bactérienne est un point délicat. Face à l'ampleur des données, les séquences des sous-parties du gène *ARNr 16S* sont regroupées en unités taxonomiques opérationnelles (OTU) selon leurs pourcentages de similarité de séquences. Une OTU est un regroupement d'individus dont les séquences présentent une similitude de plus de 97 %. Cette standardisation internationale permet à des chercheurs d'une même discipline de comparer leurs résultats, mais elle n'a pas forcément une signification biologique. Des individus d'OTU différentes ne peuvent pas appartenir à une même espèce [revue, (Gevers *et al.* 2005)].

**Tableau 2 : Description des techniques pour l'étude du microbiote.**

Technique	Basée sur le 16S rRNA	Coût	Résolution taxonomique	Caractéristiques	Avantages	Inconvénients
Culture bactérienne	Non	+	Modérée	Développement contrôlé de micro-organismes, croissance <i>in vitro</i> , en principe d'une seule souche bactérienne	Reproductible Informations fonctionnelles possibles	Main d'œuvre ++ Trop de bactéries incultivables: ne permet d'étudier que 10 à 25% des bactéries intestinales
Séquençage complet / Shotgun	Non	++++	Très bonne	Le génome entier est réduit en fragments de petite taille qui sont séquencés puis alignés.	Séquençage de la totalité du gène 16S	Analyse bio-informatique ++
Pyrosequençage 454	Oui	+++	Bonne à très bonne	L'ADN provenant de l'échantillon biologique est fragmenté mécaniquement (fragmentation aléatoire).	Sensible + (lecture longue) Moindre quantité d'échantillons nécessaire Moins de biais de PCR car amplicons plus courts	Moins de résolution taxonomique qu'une lecture totale Erreurs d'homopolymères
Illumina	Oui	+++	Bonne	L'ADN provenant de l'échantillon biologique est fragmenté mécaniquement (fragmentation aléatoire).	Précis et fiable ++	Concentrations + élevées d'échantillon nécessaire
Métagénomique	Oui	++++	Très bonne	Cette approche, via le séquençage direct de l'ADN présent dans l'échantillon, permet une description génomique du contenu de l'échantillon, mais aussi un aperçu du potentiel fonctionnel d'un environnement.	Evaluation de la fonctionnalité des gènes Identification taxonomique	Dépend des génomes référencés/ disponibles Analyse bio-informatique ++

#### 2.3.4. Etude du microbiote à partir d'échantillons fécaux

La variabilité de la composition du microbiote et la longueur du tractus digestif rendent complexe l'étude du microbiote chez l'homme et les techniques de prélèvement sont très invasives. En effet, un prélèvement par biopsie nécessite une anesthésie. Par conséquent, l'étude des selles, beaucoup plus faciles d'accès, est devenue une pratique courante pour caractériser le microbiote. Bien qu'elle ne soit pas représentative de l'ensemble du tube digestif, elle peut permettre le développement de biomarqueurs pronostiques voire diagnostiques (Le Chatelier *et al.* 2013, Taur *et al.* 2014).

Les grands programmes d'analyses de la totalité du métagénome intestinal humain entrepris ces dernières années, notamment dans le cadre des projets HMP et MétaHIT, viennent conforter l'utilisation de prélèvements de selles pour analyser le microbiote puisqu'ils ont permis d'obtenir de grandes bases de données :

- L'analyse du métagénome en Illumina à partir d'échantillons de selles collectés auprès de 124 Européens (danois et espagnols) a permis de décrire plus de 1 000 espèces bactériennes différentes dans le microbiote intestinal (Qin *et al.* 2010).
- L'analyse de 396 échantillons de selles d'individus Européens (danois et espagnols) a permis de définir 741 groupes de co-abondance de gènes correspondant à des espèces bactériennes (appelées espèces métagénomiques) dont 85% d'entre elles constituaient des espèces bactériennes inconnues (soit ~630 espèces) (Nielsen *et al.* 2014).
- L'analyse du métagénome de 242 échantillons de selles d'individus sains en pyroséquençage 454 et Illumina permet de décrire la présence des espèces bactériennes dans les différents types de microbiote et apporte des données concernant les différences de microbiote selon les ethnies (HMP, (2012)).

Ces études apportent une vision inégalée et très détaillée des communautés microbiennes chez l'homme. Il est désormais possible d'étudier seulement quelques milliers d'éléments génétiques ou certaines d'espèces, au lieu des millions de gènes qui constituent le métagénome. Ceci améliore considérablement la force et la précision des analyses statistiques [revue, (Landman *et al.* 2016)].

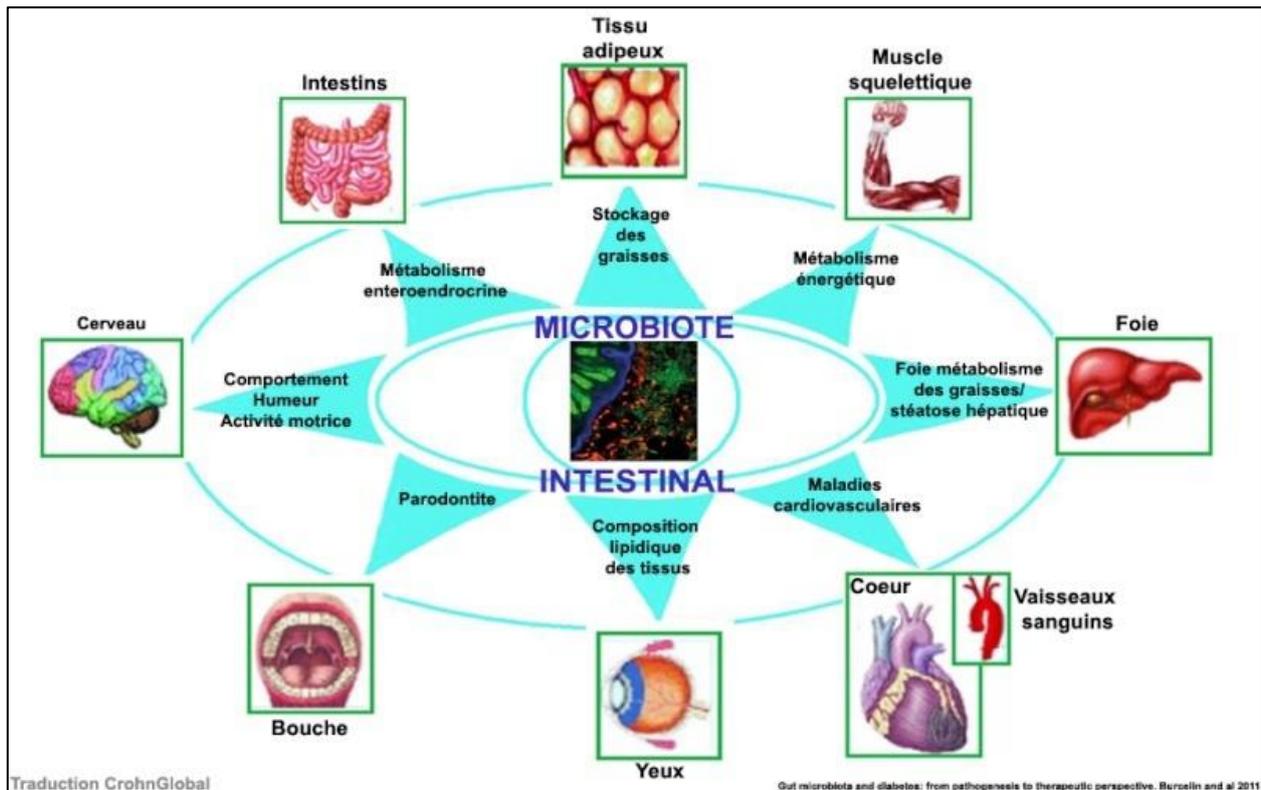
Cependant, l'étude du microbiote à partir des selles ne doit se faire que sur des échantillons de bonnes qualités prélevés et conservés dans des conditions optimales afin de préserver l'intégrité de l'ADN bactérien. Les meilleurs résultats seront obtenus si le travail est réalisé à partir de selles fraîches, mais cela est rarement possible lors des études cliniques. Il est donc préconisé d'homogénéiser puis de congeler les échantillons conservés à température ambiante (ou mieux à +4°C) à -80°C dans les 24 heures après défécation (Musser *et al.* 2011, Cardona *et al.* 2012). La technique de conservation en *RNAlater* donne des résultats similaires, c'est pourquoi cette technique peut être une alternative à la congélation si celle-ci n'est pas possible (Vlckova *et al.* 2012). (Carroll *et al.* 2012). Si les selles sont correctement congelées, le profil microbien semble préservé sur une très longue période (jusqu'à 10 ans) (Musser *et al.* 2011, Kia *et al.* 2016).

#### **2.4. Fonctions du microbiote intestinal**

Le microbiote intestinal représente une énorme biomasse possédant de très nombreuses fonctions utiles à l'hôte, ce qui le fait considérer maintenant comme un organe à part entière. Le microbiote est adapté à son environnement, et il existe une relation étroite mutuelle entre microbiote et hôte (**figure 8**) [revue, (Burcelin *et al.* 2011)].

Les fonctions du microbiote intestinal ont largement été étudiées à partir de modèles animaux dit axéniques ou « *germ-free* », c'est-à-dire n'hébergeant aucun micro-organisme décelable, donc dépourvu de microbiote. Ces animaux maintenus en isolateur peuvent être utilisés pour comprendre le rôle du microbiote intestinal sur les différentes structures et fonctions de l'hôte en comparant ces dernières avec celles retrouvées chez des animaux non stériles. Il est également intéressant de pouvoir contaminer expérimentalement ces animaux avec une flore bactérienne définie et spécifique (animaux gnotoxéniques) d'origine murine voire humaine (Kozakova *et al.* 2016). La place des modèles animaux et plus spécifiquement murins reste légitime puisque d'après des études comparatives de séquençage du microbiote, hommes et souris sont dominés par les mêmes espèces bactériennes (*Firmicutes* et *Bacteroidetes*) [revues, (Ducluzeau *et al.* 1980, Sekirov *et al.* 2010)]. Ainsi, il a pu être démontré l'importance du microbiote intestinal dans l'étiologie de certaines pathologies, notamment l'obésité (Backhed *et al.* 2007), les maladies chroniques de l'intestin (MICI) (Du *et al.* 2015), la

maladie du greffon contre l'hôte (GvH) [revue, (Laterza *et al.* 2016)] ou encore les allergies (Kozakova *et al.* 2016).



**Figure 8 : Sites de l'organisme impactés par le microbiote intestinal.** Le microbiote peut avoir un impact sur le tissu adipeux et le stockage des graisses, dans le métabolisme des graisses du foie, dans le métabolisme énergétique, dans le développement de l'athérosclérose et les maladies cardiovasculaires, dans la composition lipidique de la rétine, dans les parodontites, dans l'activité motrice et dans le métabolisme entéro-endocrine [revue, (Burcelin *et al.* 2011)].

#### 2.4.1. Digestion et métabolisme dans le gros intestin

La biotransformation de différents substrats d'origine alimentaire par le microbiote colique, d'une part, permet aux bactéries d'obtenir l'énergie nécessaire à leur croissance et, d'autre part, génère la production d'une diversité de métabolites qui sont pour la plupart absorbés et utilisés par l'hôte [revue, (Landman *et al.* 2016)].

#### Fermentation des glucides

Au niveau du colon, les bactéries des genres *Bacteroides*, *Roseburia*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* et *Enterobacteria* participent à la fermentation des hydrates de carbone qui ont échappé à la digestion proximale et des oligosaccharides non

digestibles, principalement issus de l'alimentation (fibres et sucres) [revue, (Louis *et al.* 2007)]. Ces processus engendrent la production de gaz intestinaux (H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>) et d'acides gras à chaînes courtes (AGCC) source d'énergie pour l'hôte, tels que le butyrate, le propionate et l'acétate (Cummings *et al.* 1987, Christl *et al.* 1992). Le butyrate est une source de nutriments pour les colonocytes, possède un effet anti-inflammatoire, possède un effet protecteur de l'intestin et prévient l'accumulation de métabolites intermédiaires toxiques pour l'intestin tels que le lactate [revue, (Berni Canani *et al.* 2012)](Sun *et al.* 2001, Bourriaud *et al.* 2005).

### **Hydrolyse des protéines et synthèse de vitamines**

Les bactéries intestinales possèdent des enzymes protéolytiques (type protéases) qui peuvent hydrolyser les protéines en acides aminés. L'activité protéolytique est supportée par un nombre important de bactéries coliques : *Bacteroides*, *Clostridium*, *Propionibacterium*, *Fusobacterium*, *Streptococcus* et *Lactobacillus* [revue, (Jandhyala *et al.* 2015)]. La production d'acides aminés par le microbiote intestinal servira pour la synthèse de protéines bactériennes et fait du microbiote une importante source de vitamines K et B pour l'organisme (Dror *et al.* 2008, Santos *et al.* 2008, Richardson *et al.* 2013). [revue, (Davila *et al.* 2013)].

### **Métabolisme des lipides**

Les lipides présents dans le côlon sont : les lipides issus du cycle entéro-hépatique (acides biliaires, hormones stéroïdes), les lipides alimentaires non absorbés par l'intestin grêle, les lipides issus de la desquamation des colonocytes et les lipides bactériens. Les acides gras sont transformés (hydrolyse, oxydation, réduction, hydroxylation...) par les bactéries du microbiote colique (Gerard *et al.* 2007). Les acides biliaires provenant essentiellement du cycle entéro-hépatique sont métabolisés en acides biliaires dits secondaires par certaines bactéries des genres *Bacteroides*, *Bifidobacterium* et *Clostridium* (Gustafsson *et al.* 1960). Le microbiote joue donc un rôle dans la régulation de la clairance et du stockage des graisses [revue, (Landman *et al.* 2016)].

## **Axe intestin-cerveau**

Il existe une communication bidirectionnelle entre l'intestin et le cerveau *via* des neurotransmetteurs et des neuropeptides libérés par certaines bactéries [revue, (Holzer *et al.* 2014)].

## **Métabolisme des médicaments**

Le microbiote est impliqué dans le métabolisme de certains médicaments. Il peut améliorer ou diminuer l'action des médicaments mais également accroître les effets indésirables (Wallace *et al.* 2010). Cela peut avoir une influence sur l'utilisation des traitements dans l'avenir [revue, (Jandhyala *et al.* 2015)]. Par exemple, en cancérologie, Zitvogel et son équipe ont montré que le cyclophosphamide entraînait une modification du microbiote à l'origine d'une translocation de bactéries stimulant la réponse immunitaire anti-tumorale (Viaud *et al.* 2013).

### 2.4.2. Protection contre la colonisation d'agents pathogènes

L'homéostasie physiologique n'est possible que s'il existe une coévolution entre le système immunitaire de l'hôte et son microbiote. Les interactions entre les agents antimicrobiens et le microbiote sont donc bidirectionnelles. Les agents antimicrobiens endogènes permettent le contrôle de la composition et du nombre de bactéries intestinales. Cependant, certaines espèces bactériennes et les produits du métabolisme microbien sont capables d'activer la synthèse de ces agents antimicrobiens [revue, (Jandhyala *et al.* 2015)]. Les bactéries commensales du microbiote sont en effet capables de prévenir la colonisation du tractus digestif et de l'organisme par des agents potentiellement pathogènes (micro-organismes extérieurs ou micro-organismes délétères minoritaires qui le composent, par exemple *Clostridium difficile*). D'une part, il existe une compétition pour la consommation des nutriments et la colonisation des niches de la muqueuse intestinale en faveur d'un développement des bactéries commensales et de l'exclusion des bactéries pathogènes (Hooper *et al.* 1999). Par exemple, *E. coli* est capable de synthétiser des bactériocines inhibant la croissance de *E. coli* entérohémorragique (*EHEC*) [revue, (Kamada *et al.* 2013)]. Les bactéries anaérobies à Gram positif, isolées d'un prélèvement fécal, ont montré un pouvoir inhibiteur de la croissance des pathogènes *in vitro* plus important que celui des bactéries anaérobies à

Gram négatif [revue, (Sekirov *et al.* 2010)]. De plus, le microbiote participe à la synthèse des agents antibactériens contenus dans le mucus. Notre système immunitaire reconnaît les composants de notre microbiote comme un signal activateur (de danger) *via* les récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (PRR, pour *pattern recognition receptors*). Cette reconnaissance par les cellules intestinales portant des PRR, notamment les CEI et les CPA, résulte en l'activation de voies de signalisation essentielles pour la synthèse de mucines, de peptides antimicrobiens et d'IgA. Il a été décrit que les espèces bactériennes *Bacteroides thetaiotaomicron* et *Lactobacillus innocua* induisent la production de peptides antimicrobiens et de défensines par les cellules de Paneth (Hooper *et al.* 1999, Duerkop *et al.* 2009). Les *Lactobacillus* produisent de l'acide lactique qui potentialise l'activité des lysozymes antibactériens en perméabilisant la membrane externe de la paroi des bactéries (Alakomi *et al.* 2000). Les sIgA sont également importants pour la protection antimicrobienne. En effet, les bactéries intestinales, plus particulièrement les bactéries à Gram négatif comme les *Bacteroides*, sont capables d'activer les DC intestinales qui favorisent une production d'IgA par le système immunitaire adaptatif (Yanagibashi *et al.* 2013). Ces mécanismes tendent à diminuer le développement d'espèces pathogènes et à les maintenir au sein de la lumière intestinale, empêchant le contact avec le système immunitaire systémique de l'hôte.

#### 2.4.3. Immunomodulation

Des études montrent que le système immunitaire de souris axéniques est immature et incomplet par rapport à celui de souris élevées normalement. Dans l'épithélium intestinal des souris axéniques, les plaques de Peyer (inducteurs de l'immunité au niveau intestinal) sont immatures, et les lymphocytes (effecteurs des réactions immunitaires) sont en nombre réduit. La rate et les ganglions lymphatiques, qui sont des organes immunitaires importants pour l'immunité générale de l'organisme, présentent aussi des anomalies structurelles et fonctionnelles. L'ensemble de ces anomalies peuvent être « réparées » en quelques semaines en inoculant un microbiote de souris conventionnelles à ces souris axéniques [revue, (Sekirov *et al.* 2010)].

## **Equilibre entre Th17 et Treg (figure X)**

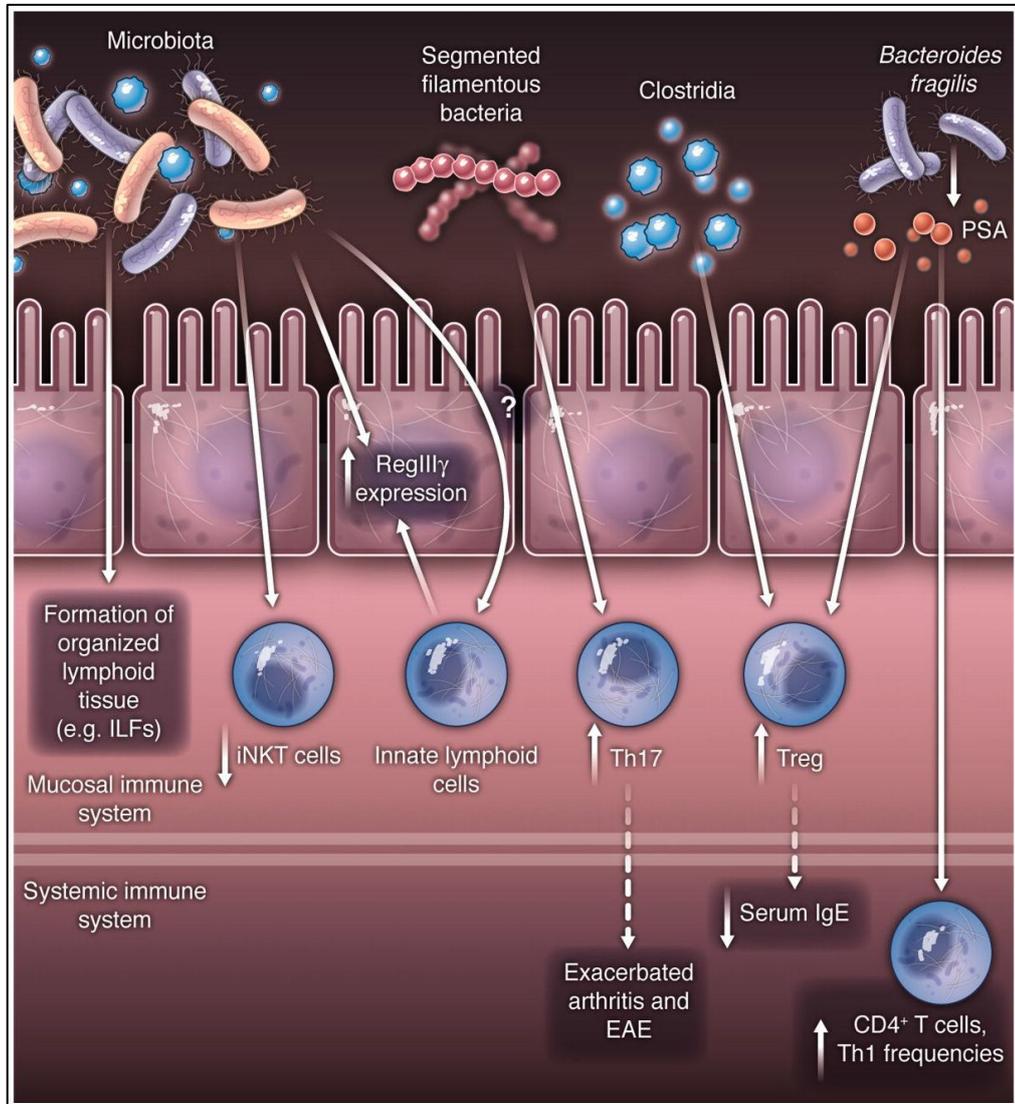
*Bacillus fragilis* peut induire la production de Treg par stimulation de TLR-2 par son polysaccharide A. De plus, son polysaccharide A inhibe les lymphocytes Th17 et augmente la production d'IL-10 (Round *et al.* 2010). Les *Clostridia* peuvent également induire la production des Treg. En effet, la colonisation par un ensemble de 46 espèces de *Clostridium* restaure le nombre de Treg au même niveau que chez les souris conventionnellement colonisées (Atarashi *et al.* 2013). La colonisation de souris axéniques par des SFB mène à l'augmentation des Th17 et des cytokines IL-17 et IL-22 [revue, (Cerf-Bensussan *et al.* 2010)]. De plus, cette colonisation entraîne une production d'IgA et des IEL (Ivanov *et al.* 2009, Lecuyer *et al.* 2014). *Bifidobacterium infantis* et *Faecalibacterium prausnitzii* ont montré une capacité à induire la production de Treg et d'IL-10 dans l'intestin (O'Mahony *et al.* 2008, Qiu *et al.* 2013). Par ailleurs, il a été montré *in vivo*, dans un modèle de rats, et *in vitro*, sur des cellules humaines, que le butyrate synthétisé par la fermentation des glucides joue un rôle dans la régulation de la balance Treg/Th17 en faveur d'une augmentation des Treg favorisant la protection de l'intestin (Zhang *et al.* 2016).

## **Impact sur le tissu lymphoïde et les cellules épithéliales (figure X)**

*Bacteroides fragilis* induit une expansion des LT CD4<sup>+</sup> et des lymphocytes Th1, une production de cytokines et un rééquilibrage de la balance Th1/Th2 qui était altérée chez la souris axénique (Mazmanian *et al.* 2005). Les *Bacteroides* sont également capables d'activer les DC intestinales qui signalent une production d'IgA par le système immunitaire adaptatif (Yanagibashi *et al.* 2013). Les bactéries à Gram négatif libèrent des lipopolysaccharides (LPS) capables d'activer la protéine MyD88 (pour *Myeloid differentiation primary response gene 88*) favorisant la prolifération des CEI et de protéines antimicrobiennes (REGIII $\gamma$ ) [revue, (Hooper *et al.* 2012)].

Le microbiote entraîne une inflammation physiologique contrôlée. L'homéostasie intestinale est maintenue avec un équilibre entre les cellules potentiellement pro-inflammatoires (Th1, Th17 et Th22, ILC) et les cellules anti-inflammatoires (Treg). De nombreuses espèces bactériennes ainsi que des produits issus du microbiote sont capables d'interagir avec les TLR et les cellules épithéliales et de moduler la réponse

immunitaire, d'abord au niveau des GALT, puis les cellules pourront ensuite rejoindre la circulation lymphatique puis systémique et avoir un effet adjuvant sur l'immunité systémique (**figure 9**).



**Figure 9 :** Immunomodulation de l'immunité intestinale par le microbiote. Interactions microbiote-immunité dans le sens « *Outside-in* » décrit par Hooper, (Hooper *et al.* 2012).

#### 2.4.4. Intégrité de la structure et de la fonctionnalité de l'épithélium intestinal

Les études sur les souris axéniques ont montré que l'absence de microbiote est associée à une diminution de la motricité du tube digestif, du renouvellement cellulaire, de la vascularisation au niveau de l'épithélium intestinal et de l'activité des enzymes digestives [revue (Sekirov *et al.* 2010)].

Le microbiote permet de maintenir la structure et la fonctionnalité de l'épithélium intestinal. *Bacteroides thetaiotaomicron* est une des bactéries les plus importantes et les plus étudiées pour caractériser le rôle du microbiote sur l'épithélium. En effet, elle induit l'expression de la protéine SPRR2A nécessaire au maintien des desmosomes au niveau des villosités intestinales [revue, (Hooper *et al.* 2001)]. Cette bactérie peut également favoriser l'angiogenèse par un signal au niveau des cellules de Paneth (Stappenbeck *et al.* 2002). De plus, *Bacteroides thetaiotaomicron* pourrait influencer le système nerveux intestinal et donc moduler le péristaltisme [revue, (Hooper *et al.* 2001)]. Elle peut aussi augmenter la différenciation des cellules caliciformes et favoriser la sécrétion de mucus (Wrzosek *et al.* 2013). D'autre part, les *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* stimulent l'expression des gènes impliqués dans le développement épithélial, respectivement dans l'intestin grêle et le colon (Shima *et al.* 2008). De façon plus générale, une stimulation de la voie TLR2/MyD88 par le microbiote maintient l'intégrité des TJ et diminue l'apoptose des CEI (Cario *et al.* 2007).

### **3. La translocation bactérienne digestive**

En considérant le rôle fondamental de la barrière intestinale et du microbiote intestinal sur le contrôle de la perméabilité et les fonctions essentielles de l'hôte, on mesure facilement les conséquences d'un déséquilibre de l'homéostasie intestinale. Les conséquences d'un tel déséquilibre peuvent entraîner des pathologies intra-intestinales mais également extra-intestinales en cas de translocation bactérienne digestive (TBD). La TBD se définit par le passage de bactéries ou de produits bactériens d'origine digestive, à travers la muqueuse intestinale, entre les CEI, vers les ganglions mésentériques puis vers les organes à distance *via* la circulation sanguine. Au niveau systémique, les bactéries sont au contact des cellules immunitaires de l'hôte et peuvent participer au développement de différentes pathologies immunitaires et métaboliques. Ce phénomène de TBD a été décrit par Berg et Garlington en 1979 (Berg *et al.* 1979) et a largement été étudié depuis [revues, (Brenchley *et al.* 2012, Bischoff *et al.* 2014)]. Les mécanismes pouvant conduire à la TBD sont multiples et souvent intriqués.

#### **3.1. Hyperperméabilité digestive**

La perméabilité digestive se différencie de la barrière intestinale par la définition qu'on lui attribue. La perméabilité digestive est le processus par lequel la barrière intestinale laisse circuler plus ou moins les macromolécules nécessaires à sa survie (les aliments issus de la digestion, l'eau, les minéraux), ou indésirables (bactéries). Ce passage est contrôlé par les TJ qui bloquent le passage de macromolécules insuffisamment digérées. Une perméabilité digestive normale est donc stable et non associée à des signes d'infections ou d'inflammation [revue, (Bischoff *et al.* 2014)].

Une altération des entérocytes et des TJ ouvre un passage à travers l'épithélium et entraîne une augmentation de la perméabilité intestinale pour des protéines, voire des micro-organismes ; on parle d'hyperperméabilité digestive. Cette hyperperméabilité peut survenir suite à des lésions directes des entérocytes consécutives à une irradiation (Shukla *et al.* 2016). Les entérotoxines relarguées par les bactéries pathogènes ciblent les TJ à l'origine d'une fragilité du contrôle du passage paracellulaire. Par exemple, les toxines des *E. coli* entéropathogéniques (*EPEC*) ont un fort pouvoir d'altération de la barrière intestinale, elles sont capables de dissocier les microtubules des TJ et d'induire l'internalisation de l'occludine (Glotfelty *et al.* 2014). D'autre part, les cytokines

présentes en cas d'inflammation peuvent avoir un impact sur la barrière intestinale. Par exemple, l'IFN- $\gamma$  augmente l'endocytose des claudines (Chiba *et al.* 2006) et le TNF- $\alpha$  diminue l'expression des claudines et induit l'apoptose des CEI (Ruemmele *et al.* 2002). Enfin, une ischémie intestinale, en général consécutive à une hypoperfusion générale ou régionale, aboutit à des lésions de l'épithélium (van Wijck *et al.* 2011, Jin *et al.* 2016).

Il existe différentes techniques et marqueurs pour évaluer la perméabilité digestive, i) de manière directe par dosage de différents marqueurs circulants ou urinaires quelques heures après les avoir ingérés, ii) de manière indirecte par dosage de marqueurs libérés en cas de perte de l'intégrité des entérocytes (**tableau 3**).

**Tableau 3 : Marqueurs et techniques d'étude de la perméabilité digestive et de l'intégrité des cellules de l'épithélium. (Bischoff *et al.* 2014)**

Nom	Perméabilité ou intégrité?	Matériel	Description	Limites
Chambre d'Ussing	Perméabilité digestive	biopsie	La méthode d'investigation consiste à annuler la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane (récupérée par biopsie), de manière à supprimer le transport passif des ions pour observer uniquement le flux net actif	Invasif ++  In vitro
Tests d'ingestion d'oligosaccharides	Perméabilité digestive	urine	Administration orale d'un oligosaccharide de grande taille (lactulose ou PEG de 4000 kD) avec un de petite taille (mannitol, L-rhamnose ou PEG de 400 kD). Les petites molécules passeront systématiquement la barrière intestinale et seront retrouvées dans les urines (témoins). Les grosses molécules ne seront retrouvées dans les urines qu'en cas d'hyperperméabilité digestive. Calcul du ratio de concentrations 4 à 6h après ingestion	Attention à la fonction rénale  Durée ++  Certains sucres sont dégradés au cours de la digestion: reflètent la perméabilité à des endroits précis de l'intestin
FITC-Dextran	Perméabilité digestive	sérum	Administration orale d'un polymère de dextrose associé à un fluorochrome. Lecture de la fluorescence dans le sang 4h après ingestion relative à la perméabilité digestive	Perméabilité de l'intestin grêle évaluée uniquement  Peu utilisable chez l'homme, chez animaux ++
Citrulline	Intégrité CEI	sérum	Dosage de cet acide aminé produit par les entérocytes à partir de la glutamine. L'hyperperméabilité digestive est associée à une perte des CEI et ainsi une diminution de la citrulline circulante	Marqueur de la masse entérocytaire et non de la perméabilité  Perméabilité de l'intestin grêle évaluée uniquement
FABP/iFABP	Intégrité CEI	sérum ou urine	Dosage de cette petite protéine cytosolique de 15 kDa présente dans les entérocytes matures de l'intestin grêle et du colon. iFABP spécifique des cellules intestinales et n'est pas retrouvé dans urines ou plasmas de sujets sains, par contre sa concentration augmente en cas de lyse cellulaire	iFABP dominant dans jéjunum (moins dans colon)  N'est présent qu'en phase aigue ?
Claudine-3	Perméabilité digestive	urine	Dosage de cette protéine retrouvée dans les tigh junctions	Peu de données
Histologie	Perméabilité digestive	biopsie	Quantification par microscopie confocale de l'occludine marquée sur une section perpendiculaire à la surface cellulaire de l'épithélium. La fluorescence est proportionnelle à l'intégrité des tigh junctions	Invasif ++

### 3.2. Altération des défenses immunitaires de la muqueuse intestinale

Une immunosuppression ou une perturbation de l'équilibre immunitaire peut diminuer la défense antimicrobienne et participer à la TBD. Le déficit en IgA est la forme la plus répandue des immunodéficiences primaires. Les individus déficients en IgA ont une plus forte tendance à développer des infections et des désordres intestinaux. En effet, le déficit en IgA au niveau de la lamina propria et du mucus peut favoriser la prolifération des micro-organismes pathogènes et la TBD [revue, (Brenchley *et al.* 2012)].

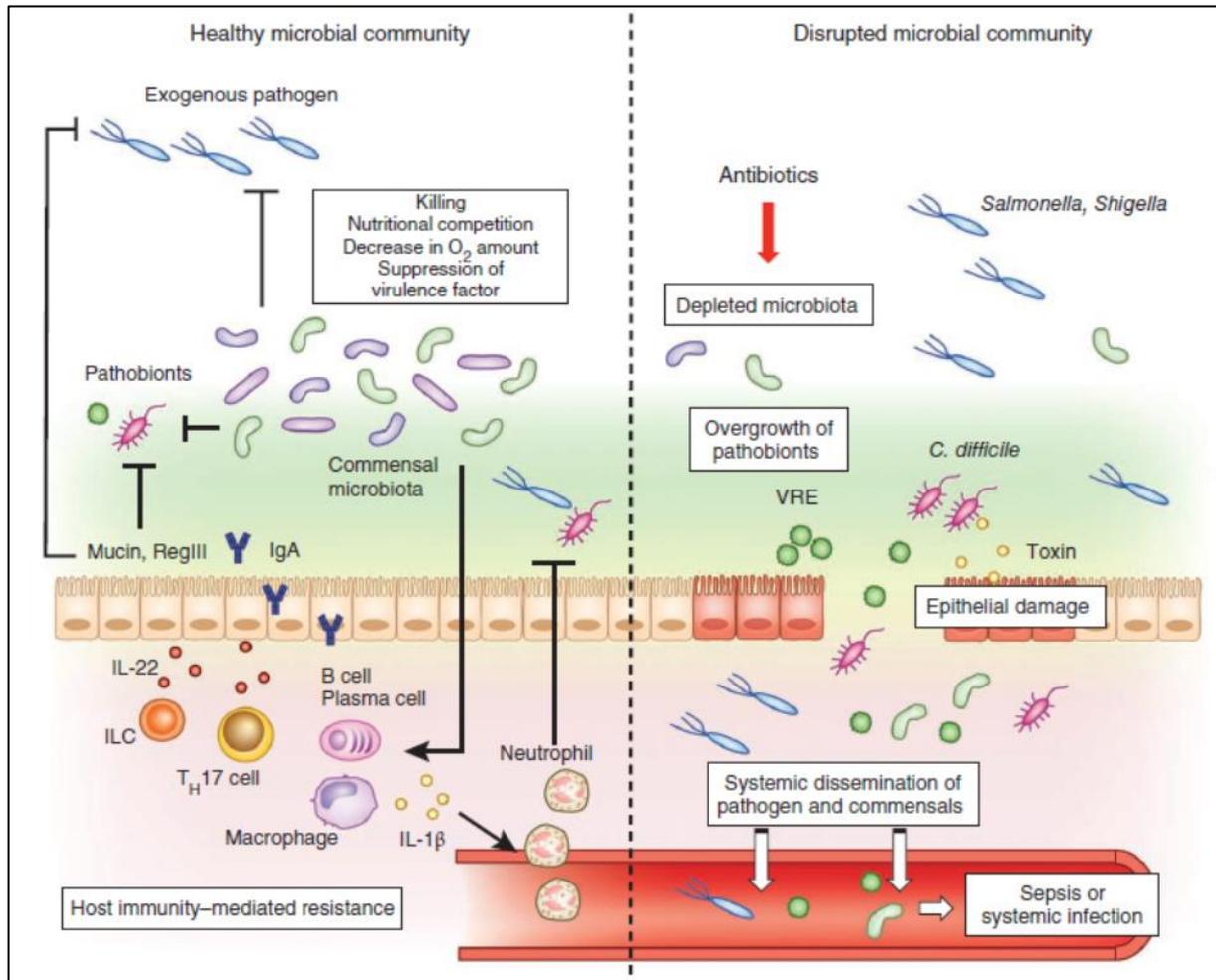
L'infection virale par le *virus de l'immunodéficience humaine* (VIH) mais également la stéatose hépatique non alcoolique entraînent une immunodéficience acquise. Une diminution des LT CD4<sup>+</sup> et LT CD8<sup>+</sup> dans la muqueuse intestinale est délétère pour la lutte antimicrobienne. Elle est associée à une augmentation des cytokines pro-inflammatoires délétères pour la barrière intestinale (Jiang *et al.* 2015, Dillon *et al.* 2016).

### 3.3. Dysbiose

Les traitements médicamenteux, les modifications de l'hygiène de vie ou encore la contamination par un pathogène peuvent modifier le microbiote, de façon plus ou moins durable. La dysbiose est un déséquilibre du microbiote associé à des conséquences néfastes pour l'hôte. Une dysbiose peut résulter de l'excès de micro-organismes délétères et/ou de l'insuffisance relative de micro-organismes bénéfiques à l'hôte [revue, (Dore *et al.* 2010)].

Les *Firmicutes* ont un rôle important dans la fermentation des carbohydrates à l'origine de la synthèse de butyrate qui est un facteur de croissance des entérocytes. En cas de pathologies inflammatoires telles que les maladies chroniques de l'intestin (MICI) et le diabète de type 2, on retrouve une diminution des *Firmicutes* à l'origine d'une diminution de l'intégrité de l'épithélium favorisant la TBD [revue, (Brenchley *et al.* 2012)]. Plus généralement, c'est la prise d'un traitement antibiotique qui entraîne la perte des bactéries saprophytes anaérobies majoritaires, ce qui facilite la croissance et la translocation des bactéries pathogènes facultatives possédant des capacités d'adhésion et de migration à travers l'épithélium plus importantes. Le développement de communautés

bactériennes de types *Salmonella enterica*, *EPEC* ou encore *Clostridium difficile* entraîne des diarrhées, une inflammation sévère intestinale et la synthèse de toxines. Réunis, ces facteurs entraînent des dommages de l'épithélium intestinal favorisant la TBD (**figure 10**) (Knoop *et al.* 2016)[revue, (Kamada *et al.* 2013)].



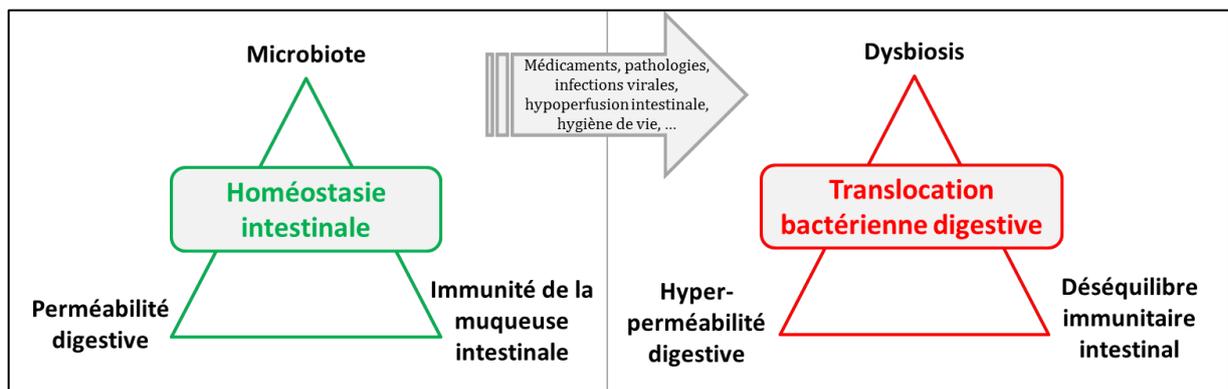
**Figure 10:** Description de la translocation bactérienne digestive secondaire à une dysbiose, en comparaison avec un état d'équilibre intestinal. La dysbiose entraîne une rupture du contrôle des bactéries pathogènes par les bactéries commensales, à l'origine d'une hyperperméabilité digestive et d'une colonisation systémique des bactéries par translocation bactérienne digestive. (Kamada *et al.* 2013)

### 3.4. Endotoxémie

Le déséquilibre est généralement global et une boucle d'activation entre l'hyperperméabilité digestive, l'altération de l'immunité intestinale et la dysbiose est généralement observée (**figure 11**). Il est difficile à l'heure actuelle de pouvoir clairement définir si ces événements sont les causes ou les conséquences de la TBD.

Cette TBD est suivie de la présence de bactéries dans la circulation systémique [revue, (Wiest *et al.* 2005)]. La concentration bactérienne est plus importante au niveau du colon, cependant la TBD a lieu essentiellement au niveau de l'intestin grêle (Fukushima *et al.* 1994, Koh *et al.* 1996, Zuo *et al.* 2014). Les bactéries vivantes passent plus facilement dans le sang que les mortes (Redan *et al.* 1990). D'autre part, la plupart des espèces bactériennes sont capables de traverser la muqueuse digestive mais il semblerait que les bactéries anaérobies facultatives à Gram négatif traversent plus facilement que les bactéries anaérobies à Gram positif. Des études murines ont montré que certaines bactéries à tropisme cellulaire comme les *Salmonella* et *Listeria monocytogenes* traversent facilement la barrière digestive (Steffen *et al.* 1988).

Lors de la lyse ou de la multiplication de la bactérie, sa membrane libère des toxines, appelées endotoxines, c'est pourquoi on parle d'endotoxémie. Les toxines sont des molécules synthétisées par un organisme et capables de perturber le fonctionnement de certaines cellules, à distance du foyer d'infection. Les toxines sont également plus ou moins immunogènes : elles sont capables d'induire une réponse immunitaire. Cette réponse est de type inflammatoire, elle est à l'origine d'un syndrome inflammatoire systémique chronique voire d'un choc septique [revue, (Plantefève *et al.* 2001)].



**Figure 11 :** Déséquilibre global à l'origine de la translocation bactérienne digestive.

## **4. Lipopolysaccharides et inflammation chronique**

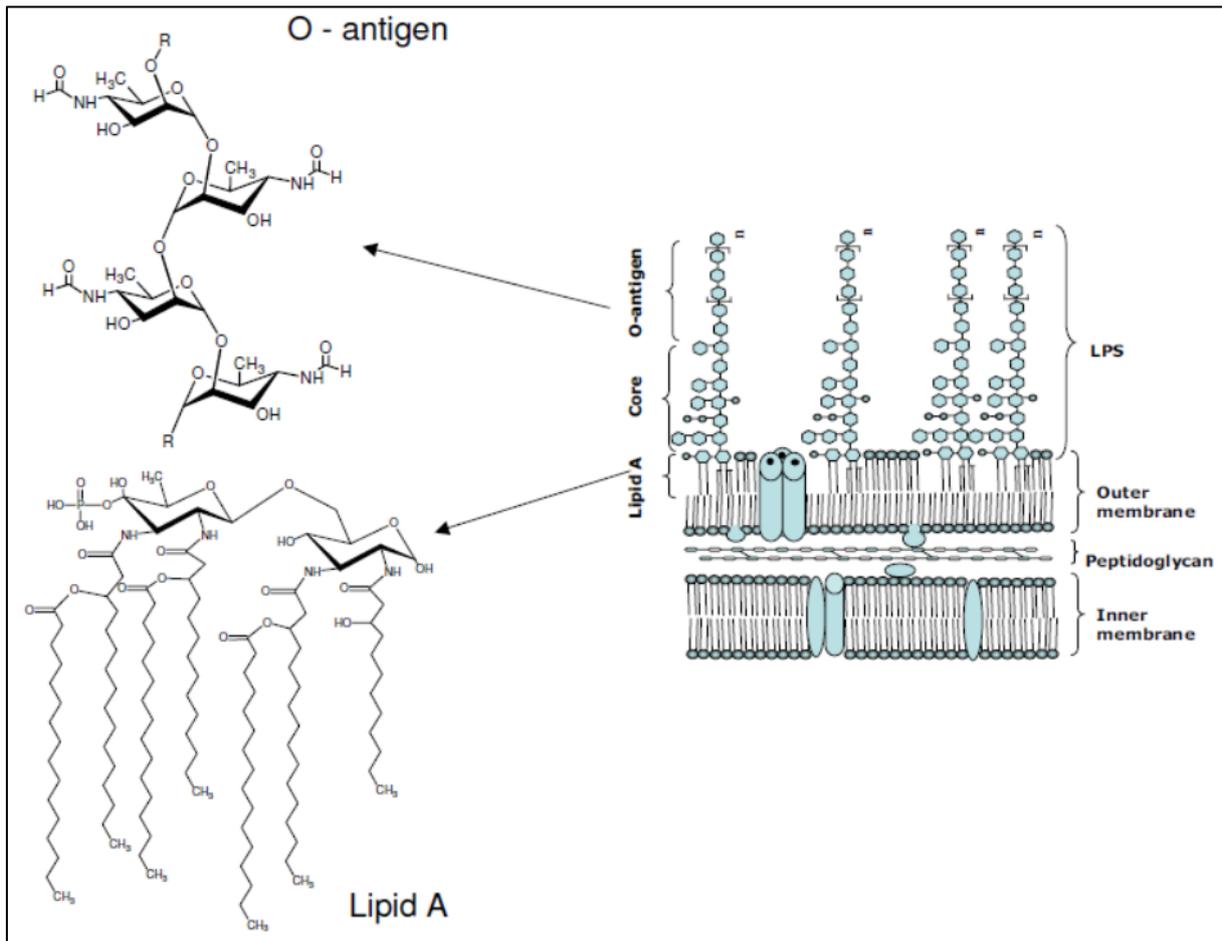
### **4.1. Structure du lipopolysaccharide**

Les lipopolysaccharides (LPS) sont des constituants de la membrane externe de la paroi des bactéries à Gram négatif. Le LPS est à la fois vital pour la structure et la fonctionnalité des bactéries à Gram négatif. Les LPS sont des glycolipides composés de trois parties : i) le lipide A, situé à l'intérieur de la bicouche lipidique, possède un caractère hydrophobe ; ii) l'antigène O débordant de la membrane externe, de nature polysaccharidique, possède un caractère hydrophile ; iii) le noyau (ou « *core* ») de nature polysaccharidique représente le pont entre les deux autres parties lui-même divisé en deux parties : le noyau interne plutôt hydrophobe et le noyau externe plutôt hydrophile (**figure 12**).

Le lipide A est constitué de deux sucres aminés phosphorylés liés par liaison beta 1-6 et phosphorylés en position 1' et 4'. Cependant, la nature des sucres aminés (glucosamines ou parfois 3-aminoglucosamine) ainsi que la nature et le nombre des acides gras sont variables selon les espèces bactériennes. Le lipide A porte l'activité biologique de la molécule LPS, il est reconnu comme une endotoxine. Libéré uniquement lors de la lyse des bactéries, il peut initier un syndrome inflammatoire systémique, pouvant entraîner la mort (Galanos *et al.* 1985). Le lipide A est fortement conservé, le noyau est très peu variable, et l'antigène O est la région hypervariable. L'antigène O est constitué de chaînes répétitives comprenant chacune de 4 à 7 sucres et dont le nombre est variable en fonction des espèces [revues, (Szalo *et al.* 2006, Park *et al.* 2013)].

L'hydrolyse des chaînes carbohydrates ne modifie que très peu l'activité inflammatoire du LPS. L'antigénicité du LPS est donc portée par le lipide A dans son intégralité [revues, (Szalo *et al.* 2006, Park *et al.* 2013)]. Des variations de l'antigénicité du LPS dépendent de la composition et du nombre des acides gras du lipide A. La structure du LPS est optimale lorsque le fragment du lipide A possède 6 chaînes acyle (chaînes à 12 ou 14 carbones) et 2 phosphates. Cette structure est retrouvée dans les LPS de la plupart des *Enterobacteria* telles qu'*E. coli* et *Pseudomonas aeruginosa* possèdent un LPS à 5 chaînes acyle ayant une bonne capacité à stimuler les cellules de l'hôte [revue, (Wang *et al.* 2010)]. Il en est de même avec les bactéries telles que *Yersinia*

*pestis* (Montminy *et al.* 2006) ou *Francisella tularensis* (Ancuta *et al.* 1996) possédant 4 chaînes acyle. Certaines bactéries anaérobies à Gram négatif, dont principalement les *Bacteroides*, ne présentent pas le phosphate en 4' dans leur lipide A et ne possèdent que 5 chaînes acyle; elles sont donc de faibles agonistes des récepteurs au LPS (Magnuson *et al.* 1989). A l'inverse, *Brucella* est une bactérie très virulente par son LPS composé de 7 longues chaînes acyle (chaînes à 16 ou 18 carbones) (Cardoso *et al.* 2006).



**Figure 12 : Structure du LPS.** Le LPS est un composant de la membrane externe (outer membrane) des bactéries à Gram négatif (représentée sur le schéma de droite). Exemple du LPS de *Brucella* ssp. (Cardoso *et al.* 2006). Le LPS de *E. coli* possède un deuxième phosphate et 6 chaînes acyle.

## 4.2. Signalisation du LPS

### 4.2.1. Le LPS, un signal de danger

Les motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP, pour *pathogen-associated molecular patterns*) sont des motifs moléculaires propres aux micro-organismes et conservés à l'intérieur d'une classe microbienne. Ils sont assimilés à un signal de danger pour l'hôte. Les récepteurs PRR constituent les récepteurs de l'immunité innée exprimés par les CPA et pour certains, dans d'autres cellules immunitaires et dans les cellules épithéliales. L'activation des PRR induit une cascade de signalisation intracellulaire conduisant à l'activation et/ou la modulation de la réponse immunitaire. Il en existe différents types, les TLR étant les mieux caractérisés. Les récepteurs TLR représentent une famille de protéines jouant un rôle essentiel dans la reconnaissance de structures pathogènes. Chez les mammifères, cette famille est composée de dix membres. Ce sont des récepteurs transmembranaires présents à la surface de la cellule (reconnaissance des PAMP extracellulaires, par TLR-1, 2, 4, 5, 6 et 8) ou des endosomes (reconnaissance des PAMP intracellulaires, par TLR-3, 7 et 9). Chacun des membres de la famille a une spécificité pour une certaine structure pathogène. La réponse de l'hôte résulte de l'action combinée d'un grand nombre de produits bactériens reconnus comme des PAMP : le LPS, le peptidoglycane, les porines, les protéines associées au lipide A ou encore les flagellines [revues, (Heumann *et al.* 2002, Forchielli *et al.* 2005)]. Le LPS est le plus puissant d'entre eux. Le récepteur TLR-4 a été identifié comme étant le récepteur spécifique pour le LPS (Poltorak *et al.* 1998).

### 4.2.2. Activation du complexe CD14/TLR-4/MD2

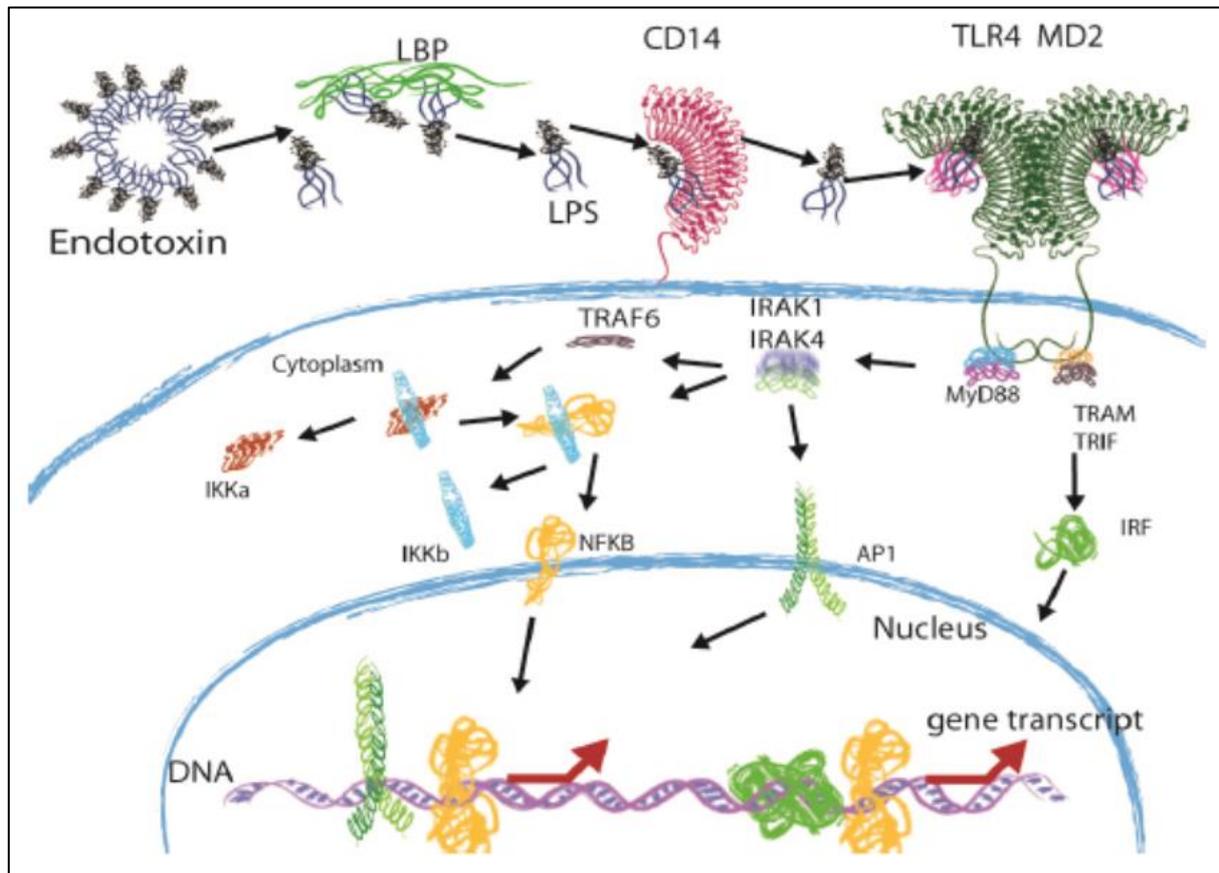
Les molécules de LPS forment des agrégats dans la circulation sanguine, qui ne circulent pas librement. Le LPS libéré se lie, par l'intermédiaire du lipide A, à la protéine plasmatique *Lipopolysaccharides Binding Protein* (LBP) (Wurfel *et al.* 1994, Wurfel *et al.* 1997) (**figure 13**). La LBP est une protéine plasmatique aiguë induite qui a une grande avidité pour le LPS appartenant à la famille des « *lipid transfer* » comme les *bactericidal and permeability increasing protein* (BPI) [revues, (Heumann *et al.* 2002, Park *et al.* 2013)].

Le récepteur TLR-4 est associé à la protéine MD2 (*myeloid differentiation factor 2*) et au corécepteur CD14 à la surface des cellules myéломonocytaires. Le CD14 reconnaît essentiellement les complexes LPS/LBP (Jack *et al.* 1997). Le récepteur CD14 membranaire est une glycoprotéine de 53 kDa ancrée à la membrane par un glycosylphosphatidylinositol. Cependant, le CD14 ne possédant pas de domaines transmembranaires ou intracellulaires, il ne peut pas être considéré, à lui seul, comme l'initiateur de l'activation de la réponse immunitaire. Le CD14 divise le LPS en monomères à l'aide de la LBP et le présente ensuite au complexe TLR4-MD2 (**figure 13**) [revue, (Park *et al.* 2013)]. Le récepteur TLR-4 possède deux polymorphismes : Asp299Gly et Thr399Ile, pouvant influencer la réponse du récepteur au LPS (Long *et al.* 2014).

La fixation du LPS entraîne l'agrégation de 2 complexes TLR4-MD2-LPS (**figure 13**). Le LPS possédant 6 chaînes acyle et 2 phosphates confère une meilleure stabilité au complexe LPS-récepteur et facilite la dimérisation (Paramo *et al.* 2015). Le rapprochement de 2 complexes est à l'origine d'une juxtaposition des domaines intracellulaires du TLR-4 déclenchant une cascade d'activation intracellulaire incluant l'activation de MyD88 jusqu'aux facteurs de transcription NF- $\kappa$ B (voie MyD88 dépendante) et IRF3 (voie MyD88 indépendante, TRAM-TRIF dépendante) (**figure 13**). Finalement, ces facteurs de transcription codent pour la synthèse de cytokines proinflammatoires comme l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, le TNF- $\alpha$  (*Tumor necrosis factor-alpha*) [revues, (Heumann *et al.* 2002, Park *et al.* 2013)]. Les cytokines ainsi sécrétées activent d'autres cellules inflammatoires (notamment monocytes et PNN), les cellules endothéliales, la voie du complément et les voies de la coagulation.

Le CD14 existe également sous forme soluble (sCD14), résultant soit de la sécrétion du CD14 membranaire dans la circulation après fixation du LPS, soit de la production de molécules CD14 sans glycosylphosphatidylinositol. Le sCD14 est également capable de reconnaître le LPS mais la LBP potentialise cette reconnaissance (Yu *et al.* 1996). Le complexe LPS/LBP peut se lier sur des cellules n'exprimant pas le CD14 comme les cellules endothéliales et induire la synthèse de cytokines proinflammatoires. En cas de forte présence de sCD14 dans la circulation, ce dernier peut également entrer en compétition avec le CD14 membranaire pour la

reconnaissance du LPS et diminuer son impact sur la voie de l'inflammation [revue, (Heumann *et al.* 2002)]. Le sCD14 peut ainsi être utilisé comme marqueur indirect de la présence de LPS, et représente sa capacité à activer la voie de l'inflammation.



**Figure 13:** Reconnaissance du LPS par le récepteur TLR-4 et voie de signalisation de l'inflammation. (Nijland *et al.* 2014)

### 4.3. Activation de l'immunité par le LPS

#### 4.3.1. Inflammation chronique

Le passage naturel des bactéries dans le sang se fait par voie lymphatique. En cas d'infection, la réponse inflammatoire déclenchée peut être bénéfique pour l'hôte car elle favorise l'élimination du pathogène. Cependant, en cas de perturbation chronique, la TBD délivre dans le sang une faible quantité de bactéries, par intermittence, à l'origine d'une inflammation chronique (« *low-grade inflammation* » ou micro-inflammation) délétère pour l'organisme. En effet, il a été montré dans des modèles animaux qu'une

exposition prolongée au LPS est associée au développement d'une inflammation chronique favorisant la progression de pathologies chroniques [revue, (Molteni *et al.* 2016)]. Vernooy *et al* ont montré qu'une exposition prolongée au LPS au niveau de la trachée des souris (par inhalation) est associée au développement et à la progression de pathologies inflammatoires chroniques telles que l'asthme et les bronchites chroniques. Les auteurs ont pu observer une accumulation de macrophages et une altération de la balance cytokinique (Vernooy *et al.* 2002). Qin *et al* ont montré qu'une seule injection intrapéritonéale de LPS à des souris suffisait à initier une hyperproduction de TNF- $\alpha$  à long terme favorisant une neuro-inflammation chronique (Qin *et al.* 2007).

#### 4.3.2. Activation de l'immunité adaptative

La coopération entre les cellules du système immunitaire inné et celles du système immunitaire adaptatif est essentielle pour développer une réponse adéquate contre un antigène. La stimulation des LT requiert un signal généré par la reconnaissance d'un antigène présenté par une CPA (macrophage, DC ou LB). La TBD est associée à la persistance du signal de danger, c'est pourquoi les différents produits bactériens seront présentés par les CPA aux LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> (LT cytotoxiques). Les macrophages activés après la reconnaissance du LPS vont donc être capables d'engendrer une réponse adaptative (Kwong Chung *et al.* 2016). Des molécules apparaissent à la surface des LT après activation : CD45RO, CD25, CD38 et HLA-DR.

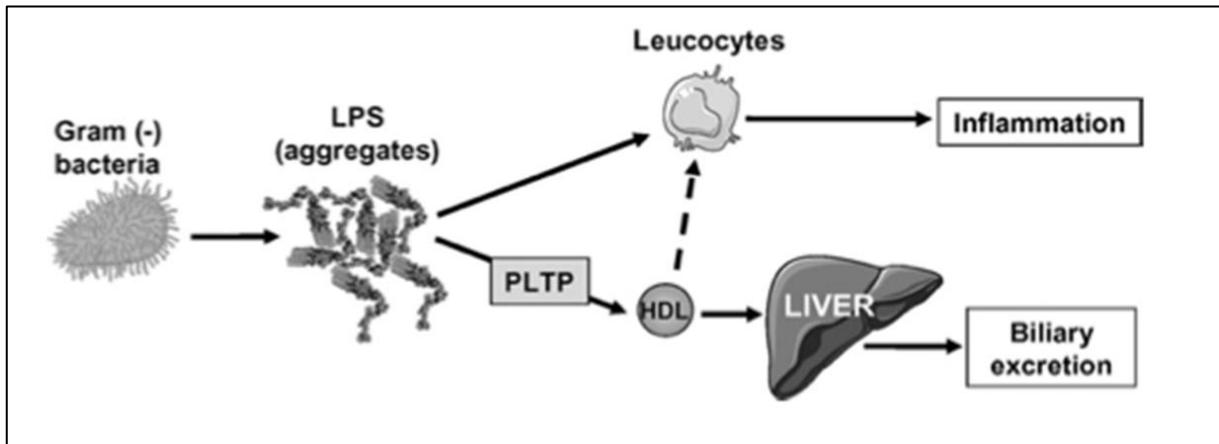
Le ratio LT naïfs/LT mémoires-LT activés des patients séropositifs pour le VIH (VIH+) traités par antirétroviraux est similaire à celui observé chez les sujets non infectés les plus âgés, en faveur d'une augmentation des LT activés. Les patients VIH+ présentent un endommagement de la muqueuse intestinale associée à une TBD et des concentrations de cytokines proinflammatoires anormalement élevées. De nombreuses études (Brenchley *et al.* 2006, Tincati *et al.* 2012, Dillon *et al.* 2014, Bi *et al.* 2016) dans cette population de patients ont montré que la TBD est associée à une activation immunitaire traduite notamment par l'augmentation des LT HLA-DR<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>. Ce paramètre est non négligeable puisque le degré d'activation immunitaire apporte finalement un meilleur pronostic de la progression de la maladie que la mesure de la charge virale plasmatique (Brenchley *et al.* 2006, Abad-Fernandez *et al.* 2013) [revue, (Tincati *et al.* 2016)].

#### 4.4. 'Reverse transport' du LPS

Le cholestérol est transporté dans le sang en s'associant à des apolipoprotéines pour former une lipoprotéine soluble dans le sang. On retrouve 2 grands types : les LDL (lipoprotéines de basse densité) ou les HDL (lipoprotéines de haute densité). Sous la forme LDL, le cholestérol est acheminé depuis le foie vers les organes. De leur côté, les HDL font le chemin inverse : elles récupèrent le cholestérol en excès dans l'organisme et l'éliminent, en le ramenant vers le foie ou par d'autres mécanismes. Les phospholipides à la surface de ces lipoprotéines sont capables de lier le LPS. Des études cinétiques ont montré que les complexes LPS/LBP se lient à CD14 avant que le LPS soit transféré aux HDL (Yu *et al.* 1996).

Les lipoprotéines ne constituent pas des entités stables. Pendant leur transport intravasculaire, elles sont modifiées sous l'action de facteurs spécifiques, y compris les protéines de transfert de lipides plasmatiques : CETP (*cholesteryl ester-transfer protein*) et PLTP (*phospholipid-transfer protein*). Ces deux protéines font partie de la famille des « *lipid transfer* » comme la LBP. Il a été décrit que la PLTP est impliquée dans la prise en charge du LPS favorisant sa liaison aux HDL en vue de son élimination vers le foie (**figure 14**) (Gautier *et al.* 2010). En effet, il a été démontré que l'incubation de LPS et de HDL en présence de quantités croissantes de PLTP recombinante purifiée conduit au déplacement du LPS d'une forme non liée vers une forme liée au HDL (Hailman *et al.* 1996). On parle de 'reverse transport' du LPS à l'instar du 'reverse transport' du cholestérol par les HDL. L'activité de la PLTP se traduit par une neutralisation du LPS par les HDL et d'une diminution de sa toxicité et de sa capacité à induire l'inflammation [revue, (Gautier *et al.* 2011)]. En effet, une fois transféré aux HDL, le LPS n'est plus reconnu par la voie TLR-4. Dans ce sens, il a été observé que la liaison du LPS avec les lipoprotéines prévient partiellement l'activation des monocytes/macrophages et la sécrétion de cytokines inflammatoires en réponse à une endotoxémie. *In vivo*, il a été observé chez la souris, qu'un déficit en HDL est associé à une hyper-inflammation secondaire à l'administration de LPS (Petropoulou *et al.* 2015). Il a également été montré que le déficit en PLTP chez la souris était associé à l'accumulation de LPS circulant, une diminution du LPS biliaire, une augmentation des cytokines proinflammatoires et une augmentation de la mortalité induite par LPS (Gautier *et al.* 2008). Enfin, des souris transgéniques pour de la CETP humaine présentent une

meilleure survie et moins d'expression de TLR-4 et d'inflammation après stimulation par LPS (Venancio *et al.* 2016).



**Figure 14 :** Neutralisation du LPS par sa prise en charge par la voie de la PLTP. D'après (Gautier *et al.* 2011).

#### 4.5. Méthodes d'analyses du LPS

Le dosage du LPS peut se faire selon plusieurs techniques, avec des résultats parfois disparates et controversés. Il n'existe aucun dosage du LPS qui associe une détection du LPS et sa capacité à activer les monocytes et qui soit standardisé et reproductible [revues, (Wong *et al.* 2015, Munford 2016)]. Il faut alors adapter le choix de la technique de dosage à l'étude selon les avantages et les inconvénients de chacune des méthodes disponibles (**tableau 4**). La technique la plus largement utilisée est la technique du test *Limulus Amoebocytes Lysat* (LAL). Wong *et al* ont particulièrement travaillé sur le dosage des endotoxines chez les patients dialysés et ils ont montré que le test cinétique LAL turbidimétrique avec utilisation de Tween 80 comme diluant au lieu de l'eau est plus performant que les autres types de tests LAL (Wong *et al.* 2015, Wong *et al.* 2016). Des études ont montré que le LPS peut être piégé dans des caillots sanguins, par conséquent un dosage plasmatique sera préféré à un dosage sérique [revue, (Munford 2016)].

**Tableau 4 : Techniques de dosage du LPS.**

Nom de la technique	Principe du dosage	Avantages	Inconvénients
<b>Test LAL</b> ( <i>Limulus amoebocytes Lysat</i> )	Le LPS catalyse l'activation d'une proenzyme. Le taux initial d'activation est déterminé par la concentration en LPS. L'enzyme ainsi activée catalyse la libération de la p-nitroaniline à partir d'un substrat synthétique, produisant une couleur jaune. La pNa libre est mesurée par photométrie, de façon continue tout au long de la période d'incubation.	Test de référence Dosage cinétique Rapide	Utilisation de matériel pyrogen-free Dosage de l'activité du LPS et non de la réelle quantité du LPS Non représentatif de l'activité du LPS <i>in vivo</i> Peu reproductible
<b>Immunolimulus</b>	Coating d'un anticorps anti-LPS dans une plaque. Ensuite, ajout du plasma pour que le LPS viennent de fixer. Après lavage, réalisation du test LAL	Spécificité augmentée	Pas de détection si manque de lipide A
<b>Dosage de l'antigène-O</b>	Utilisation d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux anti-antigène-O dans des tests ELISA	Facilité	Peu de corrélation avec test LAL
<b>EAA</b> ( <i>Endotoxin activity assay</i> )	Quantification du LPS en utilisant la réponse biologique des neutrophiles à une stimulation par le zymosan (antigène de levure). La réponse est potentialisée par un complexe immun formé après incubation de sang avec un anticorps monoclonal IgM vient lier le LPS. Ensuite, la capacité du complexe LPS-anticorps à produire des espèces réactives de l'oxygène par les neutrophiles est mesurée par chimioluminescence révélée par du luminol.	Rapide Faisable sur faible quantité de sang total	Peu de spécificité Réponse dépendante des neutrophiles
<b>Mesure du 3hydroxy-myristate</b>	Le 3hydroxy-myristate (3 $\beta$ -OHC14) est un acide gras issu de l'hydrolyse acide du lipide A. Dosage quantitatif du 3 $\beta$ -OHC14 dans le sérum par chromatographie liquide ultra haute performance couplée à la spectrométrie de masse (UHPLC SM/SM).	Dosage quantitatif	Peu sensible Non représentatif de l'activité du LPS <i>in vivo</i>
<b>EndoCab</b>	Le sérum ou le plasma contient des anticorps naturels IgM ou IgG anti-LPS. Le dosage par test ELISA de ces anticorps permet de doser la capacité de neutralisation du LPS	Facilité	Mesure indirecte et non exacte de la quantité de LPS

## Partie 2 : Immunosénescence, Transplantation rénale et atteinte digestive

### 1. La transplantation rénale

L'insuffisance rénale (IR) correspond à l'altération des fonctions des deux reins. Elle se traduit notamment par une perte de la capacité de filtration sanguine avec pour conséquences une accumulation sanguine de toxines urémiques et l'apparition de troubles hydro-électrolytiques [revue, (Ellis *et al.* 2016)]. La maladie se définit par une diminution du débit de filtration glomérulaire (DFG) concomitante de l'augmentation de la créatininémie. La maladie est dite « aiguë » si le dysfonctionnement est transitoire (et dans ce cas le plus souvent réversible), et « chronique » si la destruction est lente. L'IR chronique (IRC) conduit à la destruction progressive et irréversible des différentes structures rénales (glomérulosclérose et fibrose interstitielle). L'IRC est associée à un excès de morbidité et de mortalité par rapport à la population générale (Lozano *et al.* 2012). Les complications de cette maladie peuvent être une augmentation de la mortalité générale et de la mortalité cardiovasculaire, une progression de l'IRC vers l'IRC terminale, une apparition d'IR aiguë, un déclin des fonctions cognitives, une anémie, des troubles minéraux, osseux et des fractures [revues, (Jha *et al.* 2013, Fraser *et al.* 2016)].

Selon les recommandations de la haute autorité de santé (HAS) et de l'organisation *Kidney Disease: Improving Global Outcomes* (KDIGO), le diagnostic de l'IRC est posé pour un DFG inférieur à 60 ml/min/1.73m<sup>2</sup> et un rapport albumine-créatinine urinaire supérieur ou égal à 30 mg/g, depuis plus de trois mois. Il existe cinq stades de la maladie, jusqu'au stade terminal où la capacité de filtration est inférieure à 15 ml/min/1.73m<sup>2</sup> (Stevens *et al.* 2013). Il est nécessaire d'envisager des techniques de remplacement de la fonction rénale chez les patients en IRC terminale. La dialyse (traitement de substitution) et la transplantation rénale (traitement de remplacement) sont les deux options possibles pour la prise en charge de l'IRC terminale [revue, (Fraser *et al.* 2016)].

L'hémodialyse permet de remplacer la fonction d'épuration des reins via une membrane d'échanges entre un circuit extracorporel et un liquide de dialyse. La dialyse péritonéale permet de filtrer le sang au niveau du péritoine qui sert de membrane semi-perméable.

La transplantation rénale consiste à substituer les reins déficients par l'ajout d'un rein sain greffé, au niveau de la fosse iliaque dans la majorité des cas. Cette thérapeutique permet au patient de recouvrer une fonction rénale normale ou quasi-normale et de vivre sans dialyse. C'est la plus fréquente des transplantations en France et ce traitement permet l'amélioration de la qualité de vie des patients. D'après le rapport annuel de 2014 du registre REIN (Réseau Epidémiologie et Information en Néphrologie), 79 355 patients (contre 70 700 en 2011) sont traités pour une IRC terminale (prévalence de la maladie de 1 194 par million d'habitants) dont 44 419 sont dialysés (56 %) et 34 936 sont transplantés (44 %). L'âge médian des patients à l'initiation de la dialyse est de 70,4 ans alors qu'il est de 57 ans chez les patients bénéficiant d'une transplantation rénale. L'incidence de la maladie ne cesse d'augmenter ; en 2011 elle était de 149 par million d'habitants contre 163 en 2014. Cependant, la prévalence de la transplantation progresse plus que celle de la dialyse (+ 4 % versus + 3 %) du fait de l'augmentation du nombre de transplantations et de l'amélioration de la survie des transplantés. En 2014, 3 241 greffes rénales ont été réalisées en France, dont 16 % à partir d'un donneur vivant. Malgré l'augmentation de l'activité de greffe, la pénurie de greffons s'est aggravée : fin 2014, 15 470 personnes restaient en attente d'un greffon. Un patient transplanté âgé de 30 ans a une espérance de vie de 41 ans contre 23 ans pour un patient dialysé. *Voir rapport annuel REIN 2014 de l'agence de la biomédecine et (Kramer et al. 2013)*

L'amélioration de la qualité de vie et la meilleure survie des patients transplantés rénaux, additionnées à un coût de prise en charge plus faible, font de la TR le traitement de choix de l'IRC terminale (Tomasz *et al.* 2003, Overbeck *et al.* 2005, Griva *et al.* 2013, Jesky *et al.* 2016). Le rejet de greffe est de mieux en mieux contrôlé. Après 10 ans, environ 70 % des greffons sont encore fonctionnels. C'est le manque de greffon qui est l'obstacle majeur à l'accès d'un plus grand nombre de patients à cette option thérapeutique.

## **2. Immunosuppression en transplantation rénale**

### **2.1. Stratégies immunosuppressives**

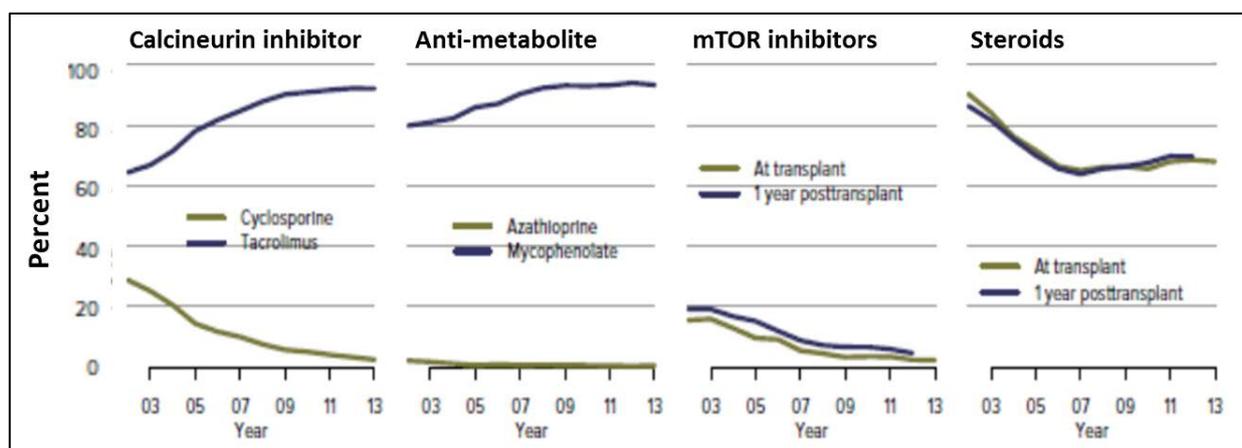
L'un des problèmes majeurs rencontrés lors de la transplantation rénale est celui de la réaction immunologique de rejet. Cette réaction est dirigée contre des antigènes d'histocompatibilité qui sont portés par les cellules du greffon. Chez l'homme, à la fois les LT et les anticorps (Ac) du receveur sont des effecteurs qui participent aux mécanismes immunologiques de rejet.

L'immunosuppression nécessaire au succès des transplantations d'organe repose sur un schéma séquentiel associant une phase d'induction (au moment de la greffe) et une phase d'entretien (à vie).

Les globulines anti-lymphocytaires polyclonales (GALP) entraînent une lymphodéplétion brutale et profonde. Elles peuvent être utilisées en transplantation rénale comme traitement d'induction ou du rejet cortico-résistant [revue, (Mourad *et al.* 2012, Bamoulid *et al.* 2016)]. L'IL-2 joue un rôle considérable dans la prolifération lymphocytaire responsable du rejet cellulaire. C'est pourquoi le basiliximab (SIMULECT®), Ac monoclonal chimérique anti-CD25 dirigé contre la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (Ac anti-CD25) peut aussi être utilisé en tant que traitement d'induction. Le basiliximab épargne les cellules T naïves et n'entraîne pas de lymphodéplétion. Ces traitements permettent une amélioration de la survie des transplants rénaux et une réduction de la survenue d'épisodes de rejets aigus (RA) résistants aux bolus de corticoïdes. Le choix du traitement d'induction se fait généralement selon le risque immunologique des patients. Un haut risque immunologique se définit selon les facteurs de risque liés au donneur (ischémie froide prolongée ; donneurs de plus de 50 ans ; donneurs avec nécrose tubulaire aiguë ou donneurs à cœur non battant) et selon ceux liés au receveur (greffes antérieures, présence d'Ac anti-donneur). Il est difficile de déterminer précisément la contribution relative de chacun des facteurs de risque, mais globalement les patients à risque reçoivent une induction par GALP [revue, (Lebranchu *et al.* 2014)].

Le traitement d'entretien de première intention utilisé est une trithérapie comprenant un anti-inflammatoire stéroïdien (3 mois puis  $\pm$  arrêt) type prednisone, un

inhibiteur de la calcineurine type tacrolimus ou ciclosporine, et un inhibiteur de l'inosine 5' monophosphate déshydrogénase type mycophénolate mofétil (MMF) (**figure 15**) (Matas *et al.* 2015). La stratégie actuelle consiste à associer différents immunosuppresseurs de façon à diminuer les doses de chacun de ces médicaments qui tous ont des effets indésirables parfois extrêmement graves. La minimisation des immunosuppresseurs est un enjeu majeur en transplantation d'organes pour prévenir les complications à long terme liées aux stéroïdes telles que l'hypertension artérielle, les évènements cardiovasculaires, le diabète, la dyslipidémie et l'ostéoporose et celles liées aux inhibiteurs de la calcineurine (notamment la ciclosporine) telles que la néphrotoxicité, l'hypertension artérielle, la neurotoxicité, l'hypertrichose et le cancer (Dharnidharka *et al.* 2016) [revue, (Mourad *et al.* 2012)]. C'est pourquoi, des études sont menées pour revoir la stratégie d'immunosuppression en utilisant d'autres traitements moins toxiques tels que les inhibiteurs de mTOR (*mammalian target of rapamycin*) ou les inhibiteurs de la costimulation (CTLA-4-Ig, anti-CD40) [revue, (Diekmann 2015, Fantus *et al.* 2016)]. Cependant, les anticalcineurines constituent encore, par leur efficacité dans la prévention du rejet aigu, la pierre angulaire du traitement immunosuppresseur d'entretien en transplantation malgré leurs nombreux effets indésirables (Ekberg *et al.* 2007).



**Figure 15 :** Représentation de l'utilisation des traitements immunosuppresseurs d'entretien utilisés en transplantation rénale. Données de 2013, à un an après la transplantation rénale, chez les patients américains vivants avec un greffon fonctionnel. D'après (Matas *et al.* 2015)

## 2.2. Focus sur les GALP

### 2.2.1. Mécanismes d'action des GALP

Les GALP utilisées actuellement sont des fractions d'IgG purifiées issues principalement de sérum de lapins ou de chevaux préalablement immunisés avec des antigènes humains. Les GALP issues de chevaux comme la LYMPHOGLOBULINE® (Genzyme, USA) et l'ATGAM®, (Pharmacie-upjohn, USA) ne sont quasiment plus utilisées en transplantation rénale en raison d'une meilleure efficacité des GALP issues de lapins comme la THYMOGLOBULINE® (Genzyme, USA) et l'ATG-Fresenius GRAFAFLON® (Fresenius-Biotech-GMBH, Allemagne) contre le rejet (Brennan *et al.* 1999). Les antigènes utilisés proviennent de populations lymphocytaires comprenant des lymphocytes de rate, du sang périphérique, du thymus ou de cultures de lymphoblastes humains. On obtient des Ac cytotoxiques polyclonaux dirigés contre de nombreux antigènes de surface des cellules immunitaires (CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD18, CD25, CD44, CD45, HLA-DR, HLA Classe I etc.) [revue, (Mohty *et al.* 2008, Bamoulid *et al.* 2016)] assurant la déplétion de ces populations cibles par divers mécanismes (Genestier *et al.* 1998, Preville *et al.* 2001, Haudebourg *et al.* 2009):

- La cytotoxicité cellulaire dépendante des Ac (ADCC) par les cellules *Natural Killer* (NK) et les macrophages. C'est le mécanisme d'action principal. La partie variable Fab des IgG est dirigée contre des épitopes de surface de la cellule ce qui assure la spécificité. L'induction du processus de lyse cellulaire est initiée par la reconnaissance de la partie constante Fc des Ac par les récepteurs, en particulier par le CD16 qui est un récepteur Fc $\gamma$  de faible affinité exprimé par les cellules NK et les macrophages ;
- La cytotoxicité dépendante du complément (CDC) qui est dose dépendante. Certains types d'Ac peuvent activer la voie du complément quand ils se lient à un antigène. L'activation du complément a pour conséquence la libération de plusieurs molécules biologiquement actives formant le complexe d'attaque membranaire (mC5b9) entraînant la destruction ou la lyse de la membrane de la cellule cible;
- Le processus d'opsonisation par lequel les lymphocytes recouverts d'Ac sont captés par le système réticulo-endothélial puis éliminés par phagocytose;

- L'induction d'apoptose des LT par l'activation de récepteurs de mort comme Fas par Fas ligand.

Après injection de GALP, la déplétion T est quasi-totale (98%), il existe une déplétion plus marquée des LT naïfs par rapport aux autres types de LT (Treg et mémoires) (Ruzek *et al.* 2009). *In vitro*, les GALP sont capables de convertir des LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en LT CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> et induisent l'expression de FoxP3 et CTLA-4 (Lopez *et al.* 2006). *In vivo*, les GALP ne semblent pas épargner les Treg périphériques, mais après régénération ils conservent leur activité suppressive (Sewgobind *et al.* 2009).

Les effets des GALP sur les autres acteurs du système immunitaire sont moins étudiés. Il a été observé *in vitro* que les GALP entraînent une apoptose des LB naïfs et activés et des plasmocytes (Zand *et al.* 2005). *In vivo*, il n'a pas été décrit de déplétion des LB après GALP (Louis *et al.* 2007). Les GALP induisent une phase de déplétion des NK immédiatement après transplantation suivi d'une phase de reconstitution concomitante à celle des LT (Louis *et al.* 2007). L'analyse du répertoire NK avant et après GALP révèle une modification de la balance entre les récepteurs activateurs et inhibiteurs au profit des récepteurs inhibiteurs. Néanmoins, les fonctions globales des NK (cytotoxicité et production d'IFN- $\gamma$ ) restent préservées (Hadaya *et al.* 2010). *In vitro* et *in vivo*, les GALP entraînent une réduction de 80 à 85 % des DC (DC myéloïdes et plasmacytoïdes) et *in vitro* les GALP semblent induire la maturation de DC dérivées de monocytes en DC tolérogènes (Gillet-Hladky *et al.* 2006, Haidinger *et al.* 2007). Enfin, l'adhésion des leucocytes à l'épithélium semble diminuée après GALP suite à une diminution de l'expression des intégrines et des molécules d'adhésion à la surface des cellules (Michallet *et al.* 2003, Chappell *et al.* 2006, Beiras-Fernandez *et al.* 2009).

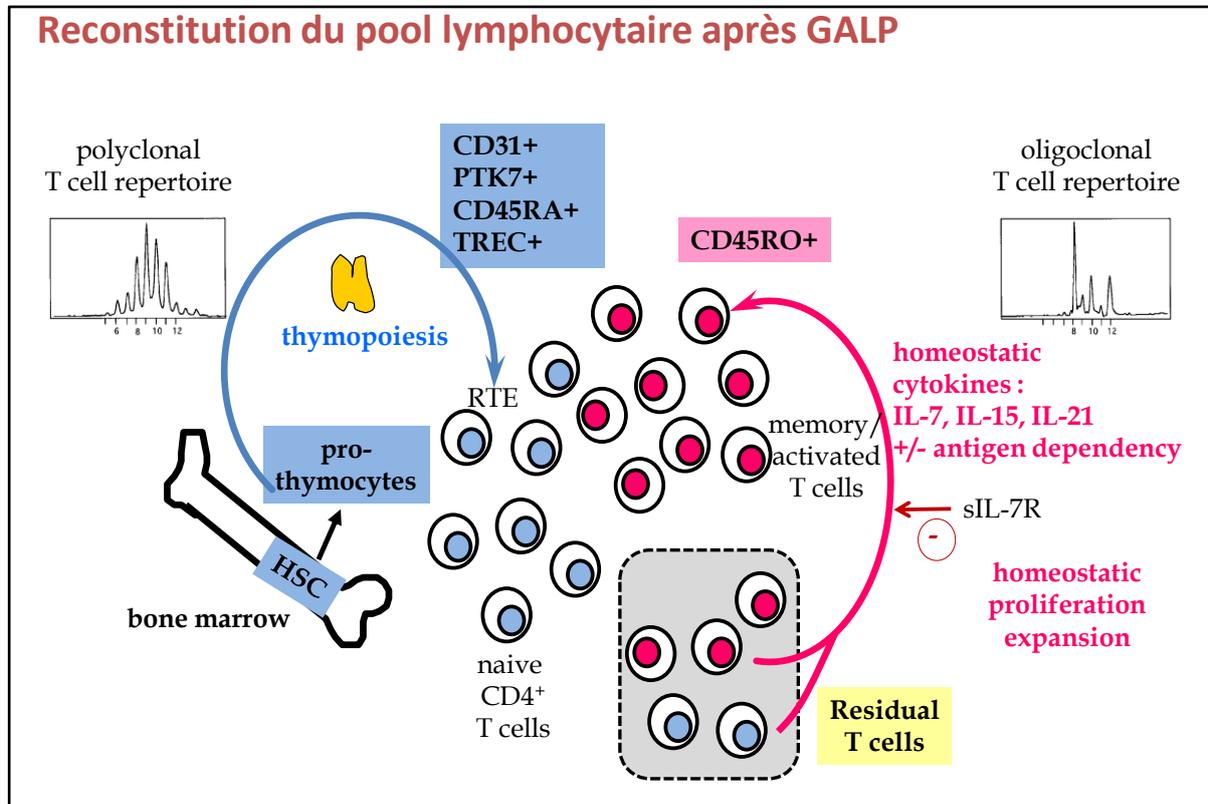
Toutes ces données reflètent l'impact des GALP sur les cellules immunitaires circulantes. Cependant, peu de travaux existent sur les effets des GALP sur la moelle osseuse, la rate, le thymus et les ganglions lymphatiques. Dans un modèle animal de primates non humains, Preville *et al.* ont analysé ces organes et ont montré que les GALP induisent une déplétion des LT dans le sang ainsi qu'à fortes doses dans la rate et les ganglions lymphatiques mais pas dans le thymus (Preville *et al.* 2001). Dans un modèle murin, Ruzek *et al.* n'ont pas trouvé de déplétion des LT CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> dans le thymus y

compris avec l'usage de fortes doses de GALP, bien que les GALP soient mises en évidence dans les tissus (Ruzek *et al.* 2009).

A notre connaissance, aucune étude n'a encore été réalisée sur l'impact des GALP sur les cellules hématopoïétiques progénitrices de l'immunité T, issues de la moelle osseuse. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont définies par leur capacité d'auto-renouvellement [revue, (Anthony *et al.* 2014)] et leur possibilité de se différencier en n'importe quel type cellulaire de la lignée hématopoïétique (Farlik *et al.* 2016). Les cellules de l'immunité innée et celles de l'immunité acquise sont toutes issues des CSH. Les CSH se caractérisent par l'expression du marqueur CD34 à leur surface. Les CSH peuvent se différencier en progéniteurs de la lignée myéloïdes exprimant les marqueurs CD117<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD10<sup>-</sup> ou en progéniteurs de la lignée lymphoïdes exprimant les marqueurs CD117<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup> (Sauce *et al.* 2011). Le système lymphoïde est composé de cellules à courte durée de vie et nécessite un renouvellement constant. Ce renouvellement se fait à partir des CSH, et plus précisément à partir des progéniteurs lymphoïdes, issu de la moelle osseuse [revue, (Zlotoff *et al.* 2008)]. Durant la thymopoïèse, les progéniteurs lymphoïdes d'origine médullaire traversent le thymus, acquièrent le phénotype T, prolifèrent et subissent une maturation dans le thymus. L'étude de ces sous-populations progénitrices pourrait permettre d'améliorer la compréhension des cibles des GALP

## 2.2.2. Reconstitution immunitaire et lymphopénie TCD4 prolongée

Après déplétion, les LT peuvent être générés selon deux mécanismes décrits dans la **figure 16**.



**Figure 16 :** Présentation des deux voies de reconstitution du système immunitaire après GALP. Les LT peuvent être générés selon deux mécanismes. Une production accrue par le thymus (thymopoïèse) (en bleu). Les thymocytes d'origine médullaire traversent le thymus, acquièrent le phénotype T, prolifèrent et subissent une maturation dans le thymus. Cette voie est retardée, et passe par la génération de nouveaux LT naïfs appelés *Recent Thymic Emigrants* (RTE). Les LT peuvent également être régénérés suite à une expansion clonale périphérique en rapport avec une prolifération homéostatique des LT résiduels ayant résistés à la déplétion thérapeutique (en rose). Cette prolifération est sous la dépendance de cytokines homéostatiques telles que l'IL-7, l'IL-15 et l'IL-21 ou sous la dépendance d'une activation antigénique. Elle donne naissance à un pool de LT mémoires/activés présentant un répertoire TCR (*T Cell Receptor*) oligoclonal, moins apte à répondre à de nouvelles rencontres antigéniques. D'après (Saas *et al.* 2011)

Des points restent à élucider concernant la reconstitution immunitaire après GALP. Muller *et al* ont comparé les sous-populations lymphocytaires T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> de transplantés rénaux ayant reçu un traitement d'induction par GALP. Sur un suivi de 5 ans, les patients ayant reçu les GALP ont à 6 mois une déplétion portant sur les lymphocytes totaux, les LT CD4<sup>+</sup> et les LT CD8<sup>+</sup>, suivie d'une régénération progressive de

l'ensemble des sous-populations, avec un retour au niveau antérieur après 36 mois pour les lymphocytes totaux, et 18 mois pour les LT CD8<sup>+</sup>. La lymphopénie T CD4 reste plus profonde et plus prolongée chez les patients ayant reçu de l'ATG-fresenius (Muller *et al.* 1997). Longuet *et al* ont montré des résultats similaires chez des patients traités par THYMOGLOBULINE (Longuet *et al.* 2014).

Après GALP, près de 60 % des patients présentent une lymphopénie T CD4 à un an et on dénombre encore 20 % de patients lymphopéniques à 5 ans de greffe, c'est-à-dire présentant moins de 300 LT CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup> (Ducloux *et al.* 1998). Avec une caractérisation de la lymphopénie T CD4 à 200 LT CD4<sup>+</sup>/mm<sup>3</sup>, Longuet *et al* ont dénombré 48.5%, 9.2%, 6.7%, 2.0%, et 0% de patients lymphopéniques après THYMOGLOBULINE à 1, 3, 5, 10 et 20 ans respectivement (Longuet *et al.* 2014). Cette variabilité de la reconstitution et la persistance à long terme de la lymphopénie T CD4 chez certains individus peut en partie être expliquée par la dose cumulée de GALP administrée. En effet, Muller *et al* ont montré une corrélation forte entre la dose cumulée de GALP et le degré de lymphopénie T CD4 (Muller *et al.* 1997). Néanmoins cette dose cumulée n'explique pas l'absence de reconstitution du pool lymphocytaire T CD4 chez certains patients à long terme et d'autres facteurs sont probablement impliqués.

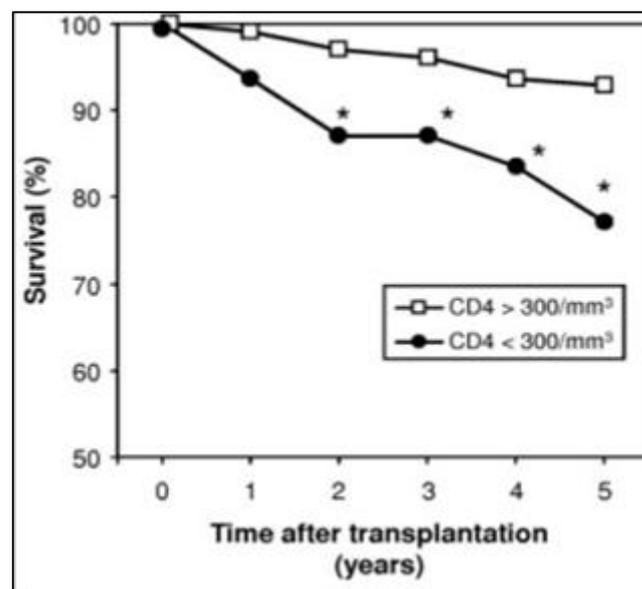
### **3. Statut biologique et clinique des transplantés rénaux**

#### **3.1. Conséquences cliniques de la lymphopénie T CD4**

L'utilisation de GALP est associée à une diminution significative du nombre de rejets aigus et de l'incidence de reprise retardée de la fonction du greffon rénal [revue, (Mourad *et al.* 2012)]. Cependant, les GALP entraînent un « *rash* » cytokinique activant les cellules inflammatoires, et une lymphopénie T CD4 prolongée. Notre équipe a précédemment rapporté que la persistance d'une lymphopénie T CD4 après déplétion lymphocytaire par GALP est un facteur de risque indépendant de développer des cancers incluant les cancers cutanés (Ducloux *et al.* 1998), les gammopathies monoclonales (Ducloux *et al.* 1999), les cancers solides et les lymphomes (Ducloux *et al.* 2002). Cette lymphopénie est également corrélée à l'augmentation de l'incidence des infections opportunistes et des événements athéromateux (Ducloux *et al.* 2003). Les deux conséquences majeures récemment définies sont les cancers (Luque *et al.* 2016) et

les maladies cardio-vasculaires (Ducloux *et al.* 2014). Les mêmes données ont été observées chez les transplantés du foie ayant reçu des GALP (Vrochides *et al.* 2012). La lymphopénie T CD4 est un marqueur quantitatif du degré d'immunosuppression et se présente comme un biomarqueur intéressant pour prédire la survenue de complications après GALP.

Le développement de ces multiples complications entraîne une augmentation de la morbidité ainsi qu'une surmortalité de la population transplantée rénale présentant une lymphopénie T CD4 persistante (**figure 17**) (Ducloux *et al.* 2010). Cette surmortalité est liée à des complications dont la fréquence est proche de celle observée dans la population âgée, population susceptible aux maladies métaboliques, néoplasiques et infectieuses. En effet, pour une tranche d'âge donnée de la population transplantée rénale, le risque de mortalité cardiovasculaire correspond à celui d'une tranche d'âge supérieure de 20 ans dans la population générale (Sarnak *et al.* 2003). Cette surmortalité pourrait en partie être expliquée par l'inflammation chronique caractérisant la population transplantée, mais également par les modifications des sous-populations lymphocytaires induites notamment par l'utilisation de GALP (Ducloux *et al.* 2011).



**Figure 17 :** Survie des patients transplantés rénaux en fonction du taux de LT CD4<sup>+</sup> à l'entrée dans l'étude. Les patients ayant une lymphopénie T CD4 ont une mortalité significativement (\*  $p < 0,05$ ) accrue dès la seconde année de suivi et tout au long de l'étude après cette date. D'après (Ducloux *et al.* 2010).

## 3.2. Inflammation chronique et immunosénescence

L'inflammation chronique et les modifications des sous-populations lymphocytaires sont deux pierres angulaires de la notion d'immunosénescence ou vieillissement du système immunitaire lié à l'âge.

### 3.2.1. Immunosénescence

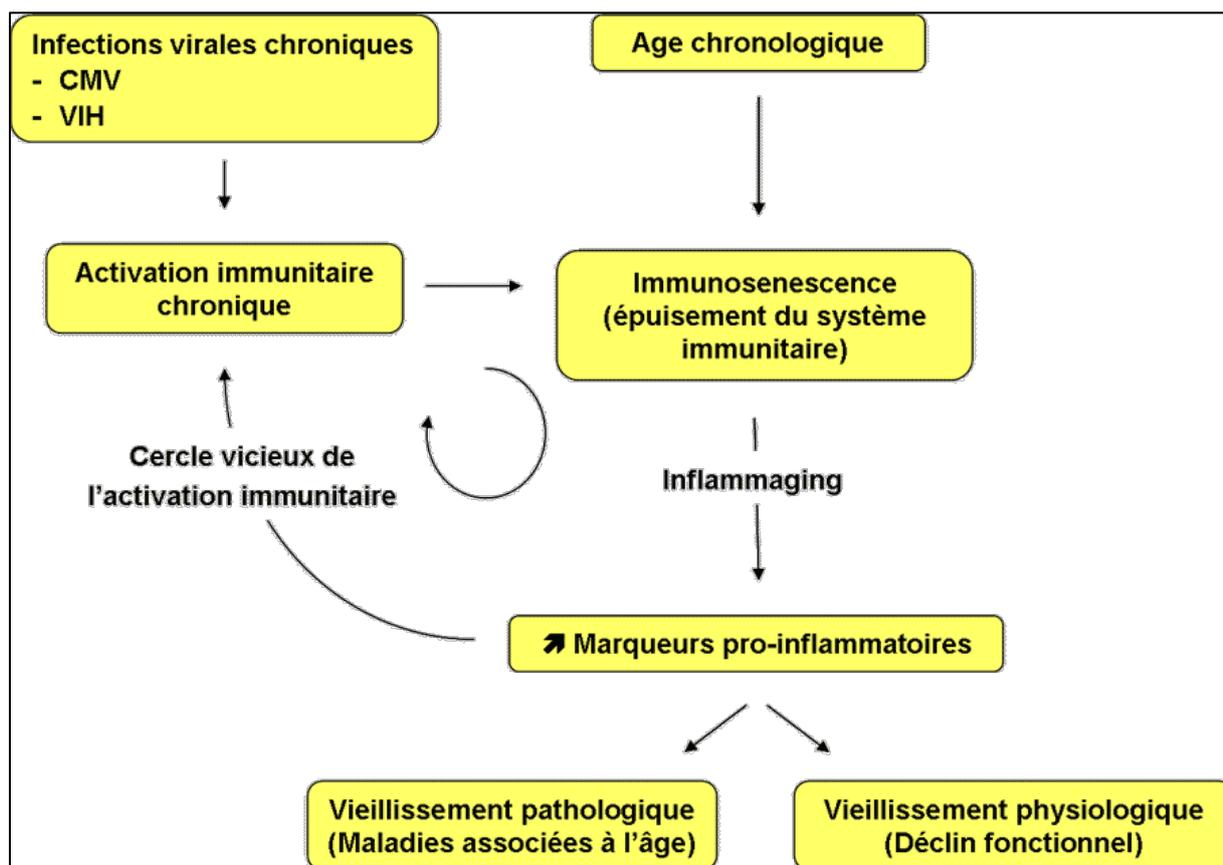
L'immunosénescence (ou « vieillissement du système immunitaire ») est un remodelage complexe et profond du système immunitaire. Il est principalement dû à l'involution thymique et à la répétition des stimulations antigéniques au cours de la vie. Les modifications induites par l'immunosénescence se caractérisent par une diminution du nombre et de la fonction des cellules souches hématopoïétiques (CSH), une involution thymique, une diminution des LT naïfs, une augmentation de la proportion de LT mémoires à un stade avancé de différenciation avec une capacité de prolifération limitée (phénotype LT CD57<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>), une inversion du rapport CD4/CD8, une augmentation des Treg et une augmentation des concentrations de cytokines pro-inflammatoires incluant l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  [revue, (Deeks 2011)].

Le déclin de l'expression du CD28 et l'augmentation de l'expression du CD57 à la surface des LT sont caractéristiques de la sénescence de ces cellules. Le CD28 est un récepteur impliqué dans la costimulation des LT. Le CD57 quant à lui est associé à un état de cytotoxicité avancé et d'inflammation [revue, (Seyda *et al.* 2015)].

### 3.2.2. Inflammaging

L'inflammation chronique est un processus contrôlé, à bas bruit, systémique et chronique. Elle est associée à une augmentation des facteurs pro-inflammatoires et favorise l'immunosénescence. L'inflammation chronique s'oppose à l'inflammation aiguë symptomatique, locale et résolutive [revue, (Franceschi *et al.* 2014)]. L'inflammation chronique est asymptomatique en elle-même mais accentue l'*inflammaging* (signifiant inflammation liée à l'âge) à l'origine du développement d'un vieillissement pathologique s'additionnant au vieillissement physiologique. La conséquence de ce processus en cercle vicieux entre inflammation chronique et immunosénescence est l'augmentation de la morbi-mortalité, notamment cardio-vasculaire (**figure 18**).

Les infections virales chroniques participent au développement de l'inflammation chronique et de l'immunosénescence (**figure 18**). La lymphopénie retrouvée chez les patients VIH+ affecte particulièrement les LT naïfs. Yang *et al* ont montré une diminution du taux de LT naïfs circulants chez les patients VIH+ en progression et chez ceux présentant une lymphopénie malgré une réplication virale indétectable (Yang *et al.* 2012). Divers travaux ont permis de voir une diminution des CSH CD34+ circulantes chez les patients VIH+ surtout chez les personnes fortement lymphopéniques et chez les personnes les plus âgées (Sauce *et al.* 2011). Aussi, le VIH est capable d'entraîner une perte des fonctions médullaires et thymiques pouvant favoriser l'inflammation chronique et l'apparition de maladies non liées au virus mais liées à l'âge et à l'immunosénescence [revues, (Douek *et al.* 2009, Appay *et al.* 2016)]. L'implication du *cytomégalo*virus (CMV) a également été démontrée [revue, (Solana *et al.* 2012)]. Derhovanessian *et al* ont montré que l'expansion de LT à un stade avancé de différenciation chez les personnes âgées était étroitement liée à la séropositivité pour le CMV (Derhovanessian *et al.* 2011). De plus, l'infection à CMV semble associée de façon chronique un profil cytokinique pro-inflammatoire (Trzonkowski *et al.* 2003).



**Figure 18 :** Cercle vicieux de l'inflammation chronique et l'immunosénescence. Les infections virales chroniques participent au développement de l'inflammation chronique et de l'immunosénescence. D'après (Desquilbet 2009).

### 3.2.3. Implication en transplantation rénale

La transplantation, par elle-même, est à la source d'un stress oxydatif (Turkmen *et al.* 2012) et de stimulations antigéniques répétées avec un risque élevé de réactivation ou d'infection par le CMV (Puttarajappa *et al.* 2016) pouvant favoriser l'immunosénescence et l'inflammation chronique qui en découle.

Notre équipe a précédemment évalué la fonction thymique chez les transplantés rénaux par la mesure des *T Cell Receptor Excision Circles* (TREC). Les TREC correspondent aux cercles d'ADN épisomal générés pendant le réarrangement des gènes lors de la formation du récepteur des cellules T (TCR). Le taux de TREC reflète la production thymique de nouveaux LT naïfs appelés *Recent Thymic Emigrants* (RTE) (Douek *et al.* 1998). Nous avons pu montrer que les GALP entraînaient une

immunosénescence accélérée. En effet, en plus de l'inversion du rapport CD4/CD8 après GALP, nous avons montré qu'il existe une relation entre la lymphopénie persistante après GALP et le taux de TREC avant la transplantation. Un nombre de TREC inférieur à 2 000 pour 150 000 LT CD3<sup>+</sup> avant transplantation est un facteur prédictif de la lymphopénie persistante post-GALP. De plus, le taux de TREC avant la transplantation est inversement corrélé avec l'âge des patients ainsi qu'avec la morbidité et mortalité due aux cancers et aux maladies cardiovasculaires (Ducloux *et al.* 2011).

En 1998, Wikby *et al* utilisent cette inversion du rapport CD4/CD8 pour définir une notion de profil de risque immunologique ou « *Immune Risk Profile* » (IRP) caractérisant les personnes âgées à haut risque de mortalité (Wikby *et al.* 1998). Ce profil est étroitement lié à l'infection par le CMV et à l'expansion de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> (Wikby *et al.* 2002). L'utilisation de l'IRP en transplantation présente un intérêt afin d'améliorer la prise en charge nos patients. Crepin *et al* ont pu définir un IRP selon une sérologie positive pour le CMV avec au moins un des critères suivants: rapport CD4/CD8 inférieur à 1 et/ou nombre de LT CD8<sup>+</sup> >700/ $\mu$ l. L'IRP avant la transplantation est associée à un risque accru d'infections post-transplantation (Crepin *et al.* 2016).

#### **4. Atteintes digestives en transplantation rénale**

Des troubles digestifs (notamment la diarrhée) sont extrêmement fréquents les premiers temps suivant la transplantation. Ils pourraient être dus aux effets indésirables des différents traitements utilisés, à la fréquence des infections bactériennes ou encore à l'utilisation de l'antibioprophylaxie. Ces troubles digestifs pourraient être accompagnés de modifications de la composition du microbiote et d'une hyperperméabilité digestive. Récemment, la dysbiose et la TBD ont été décrites comme facteurs associés à l'inflammation chronique (Brenchley *et al.* 2006). Chez les patients VIH<sup>+</sup>, Steele *et al* ont décrit qu'une nouvelle définition d'un phénotype *inflammaging*, c'est à dire un IRP, prenant en compte des marqueurs associés à la TBD et à l'inflammation (*intestinal fatty acid binding protein* (iFABP), sCD14, sCD27, and protéine C réactive (CRP)) permet d'identifier des patients à haut risque cardiovasculaire (Steele *et al.* 2014). Ces phénomènes restent peu décrits en transplantation rénale, alors que de nombreux paramètres pourraient favoriser une hyperperméabilité digestive.

#### 4.1. Age et atteinte digestive

La dégénération progressive et le déclin fonctionnel des organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse et thymus) et des cellules immunitaires (LT et CSH) associés à l'âge favorisent l'immunosénescence (Sun *et al.* 2012) [revue, (Akunuru *et al.* 2016)]. L'âge est donc un facteur physiologique de la sénescence mais il est important de savoir si l'âge influe uniquement sur l'immunité ou s'il entraîne également des atteintes digestives favorisant l'inflammation chronique.

L'épaisseur de la muqueuse, le nombre de GALT et de plaques de Peyer seraient diminués chez les personnes les plus âgées. De plus les sécrétions de mucus diminuent. La motricité intestinale semble quant à elle inchangée. Ces modifications entraînent une dysbiose et une hyperperméabilité digestive. Le nombre et la diversité des bactéries des genres *Bifidobacteria* et *Bacteroides* sont diminués chez les sujets plus âgés. Cette diminution des bifidobactéries peut avoir un impact sur la santé du sujet âgé car ces bactéries sont impliquées dans la stimulation du système immunitaire et dans les processus métaboliques, ce qui pourrait en partie expliquer les problèmes de malnutrition des personnes âgées. Cette diminution est parallèle à l'augmentation de bactéries anaérobies facultatives telles que *Enterobacteria* (Merchant *et al.* 2016)[revues, (Guigoz *et al.* 2008, O'Toole *et al.* 2015)]. Dans ce sens, Kim *et al* ont décrit une augmentation du rapport *Firmicutes/Bacteroides* dans un modèle de souris âgées. De plus, ils suggèrent que l'âge peut accélérer l'*inflammaging* puisqu'ils retrouvent plus de LPS dans le sang et les selles des souris âgées associé à une plus forte expression de NF-kB (Kim *et al.* 2016). Les données sur l'hyperperméabilité digestive restent controversées. Bien que Steele *et al* trouvent une forte corrélation entre les marqueurs iFABP et LPS sanguin et l'âge (Steele *et al.* 2014), les tests de perméabilité ne montrent pas de différence selon l'âge (Valentini *et al.* 2014). Ces modifications semblent toutefois liées à l'alimentation et à la fragilité liée à l'âge. Ces données suggèrent que le vieillissement affecte les propriétés de la barrière intestinale susceptibles d'avoir une incidence sur les troubles associés à l'âge, localement et systémiquement (Man *et al.* 2015).

## 4.2. Facteurs favorisant une atteinte digestive en IRC

Des concentrations plasmatiques élevées de cytokines pro-inflammatoires et de leucocytes activés sont retrouvées en cas d'IRC terminale (Honda *et al.* 2006, Heine *et al.* 2012). Cet état d'inflammation chronique joue un rôle majeur dans la progression de la maladie rénale et a été reconnu comme un facteur de risque non conventionnel des maladies cardiovasculaires en IRC (Carrero *et al.* 2009, Gansevoort *et al.* 2013). Cette inflammation chronique résulte de l'effet persistant d'un stimulus provenant de plusieurs facteurs liés à la dialyse comme la bioincompatibilité membranaire, et non liés à la dialyse comme les infections, le stress oxydatif, l'accumulation de toxines urémiques, les comorbidités, les facteurs génétiques, l'alimentation ou plus récemment décrit, la TBD [revues, (Vaziri 2012, Anders *et al.* 2013)].

Des études ont montré que l'endotoxémie mesurée chez des patients atteints d'IRC est associée à une inflammation systémique, à des caractéristiques de malnutrition, à des lésions cardiaques, à une progression de la maladie et à une survie réduite (McIntyre *et al.* 2011, Poesen *et al.* 2015, Szeto *et al.* 2015) [revue, (Felizardo *et al.* 2016)]. La présence de bactéries dans le sang périphérique de patients atteints d'IRC a été décrite par séquençage de l'ARNr 16S (Bossola *et al.* 2009, Kwan *et al.* 2013). Wang *et al.* ont suggéré que toute bactérie intestinale détectée dans le sang périphérique pourrait révéler une TBD (Wang *et al.* 2012).

En IRC, la TBD est principalement attribuée à l'accumulation de toxines urémiques et à l'hypoperfusion intestinale.

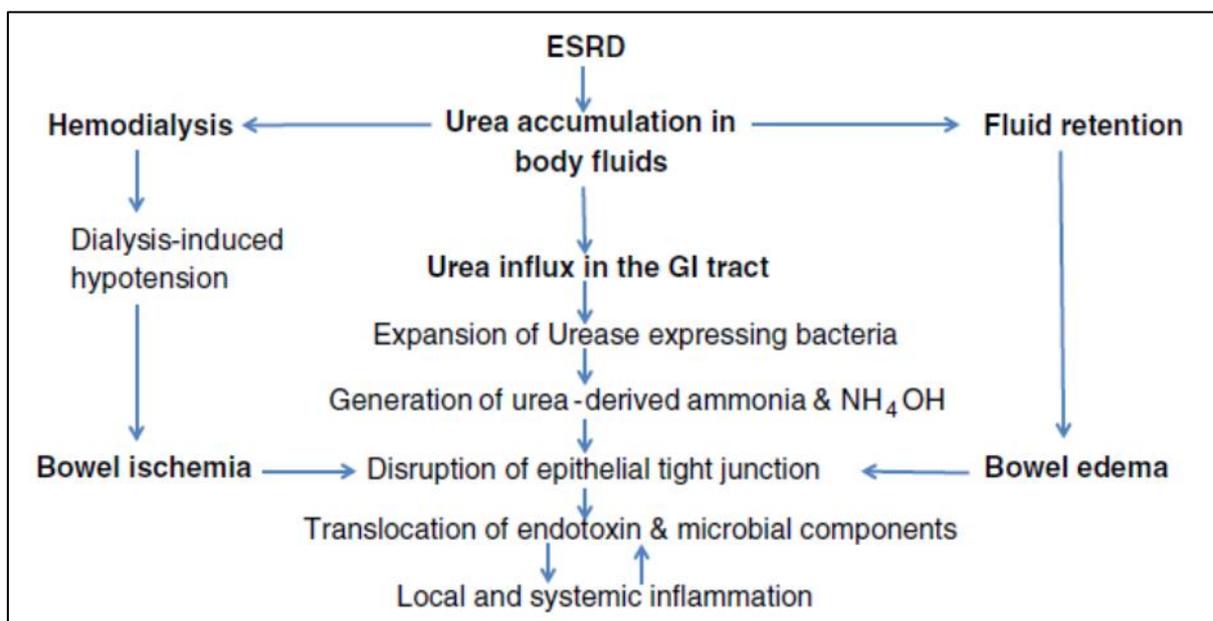
### 4.2.1. Toxines urémiques

La diminution du DFG entraîne une diminution de l'élimination de l'urée et sa concentration dans les fluides augmente. On retrouve alors un influx de l'urée et d'acide urique dans l'intestin. L'urée est hydrolysée par l'uréase, protéine synthétisée par les bactéries intestinales. L'urée est alors transformée en ammoniac ( $\text{NH}_3$ ) et en hydroxyde d'ammonium ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). L'ammoniac suit 2 voies distinctes : une partie est absorbée par l'intestin puis transformée en urée par le foie pour être éliminée dans les urines, l'autre partie est utilisée par les bactéries avec des hydrates de carbones pour former des acides aminés pour la synthèse de protéines bactériennes. Ces métabolites élève le pH et

modifie le microenvironnement intestinal favorisant la dysbiose. Globalement on retrouve une augmentation globale de l'abondance de certaines bactéries, à la fois de bactéries aérobies et anaérobies. La dysbiose est associée à une augmentation de la proportion de bactéries possédant de l'uréase et d'autres enzymes permettant la synthèse de toxines urémiques (p-cresol sulfate, indoxyle sulfate principalement), normalement éliminées par le rein [revues, (Nallu *et al.* 2016, Sampaio-Maia *et al.* 2016)]. L'accumulation de ces molécules toxiques favorise la dysbiose. Vaziri *et al* ont décrit chez l'homme et dans un modèle de rats en IRC une augmentation globale des phyla *Actinobacteria*, *Firmicutes* et *Proteobacteria* ainsi qu'une diminution des familles *Lactobacillaceae* et *Prevotellaceae* (Vaziri *et al.* 2013). La dysbiose est également associée à une synthèse d'acide urique et de cristaux d'oxalate par l'épithélium du colon. De plus, l'urée est capable d'affecter les TJ. En effet, Vaziri *et al* ont montré une association entre l'urémie et la diminution des protéines claudines, occludines et zonula occludens dans un modèle de rats en IRC (Vaziri *et al.* 2012). Ces résultats ont été confirmés *in vitro* sur des entérocytes humains (Vaziri *et al.* 2013). Magnusson *et al* ont montré une hyperperméabilité digestive des grosses molécules (PEG) chez les patients et les souris urémiques par rapport aux contrôles (Magnusson *et al.* 1991). La dysbiose et l'hyperperméabilité digestive participe à l'inflammation chronique par la TBD d'endotoxines et de toxines urémiques (**figure 19**). Ces dernières sont normalement éliminées dans les urines et leur accumulation en cas d'IRC est toxique (dysfonction endothéliale, neurotoxique, néphrotoxique) [revues, (Tanaka *et al.* 2015, Ellis *et al.* 2016)].

#### 4.2.2. Hypoperfusion intestinale

La surcharge de liquide et l'œdème généralisé sont des complications courantes de l'IRC. En outre, l'utilisation excessive de diurétiques chez les patients atteints d'IRC et l'ultrafiltration agressive par hémodialyse entraînent fréquemment des épisodes d'hypotension qui peuvent conduire à une ischémie intestinale dans cette population. Ainsi, le dysfonctionnement de la barrière intestinale est intensifié en présence d'un œdème intestinal ou d'une ischémie (**figure 19**) (Shi *et al.* 2014) [revue (Vaziri *et al.* 2016)].



**Figure 19 :** Facteurs influençant la rupture de l'homéostasie intestinale dans l'insuffisance rénale chronique (ESRD). L'accumulation de l'urée, la rétention des fluides et la dialyse participent à une hyperperméabilité et à l'inflammation chronique. D'après (Vaziri 2014).

#### 4.2.3. Alimentation

La diminution du DFG entraîne une diminution de l'élimination du potassium et du phosphate et une augmentation de l'élimination des protéines. En cas d'IRC, on conseille aux patients d'adapter leur alimentation en faveur d'une restriction en fruits et légumes riches en potassium et parfois en protéines. Ces aliments sont la principale source de carbohydrates pour le microbiote. Leur limitation modifie le microenvironnement intestinal favorisant la dysbiose (Krishnamurthy *et al.* 2012) [revue, (Mafra *et al.* 2013)].

#### 4.3. Facteurs favorisant une atteinte digestive en transplantation rénale

Après transplantation rénale, l'inflammation chronique reste présente et largement responsable de la mortalité cardiovasculaire, première cause de mortalité chez les transplantés (Turkmen *et al.* 2012). L'hypothèse de la persistance d'un stimulus immunitaire dû à la TBD reste présente puisque l'immunosuppression et l'utilisation généralisée d'agents antimicrobiens prophylactiques et thérapeutiques peuvent créer des perturbations au niveau de l'équilibre intestinal. Cependant, ces effets sont très peu étudiés en transplantation rénale alors qu'ils promettent des stratégies thérapeutiques intéressantes [revues, (Alegre *et al.* 2014, Alegre *et al.* 2014)]. Actuellement seules les

études pilotes de Fricke *et al* (Fricke *et al.* 2014) et Lee *et al* (Lee *et al.* 2014, Lee *et al.* 2015) ont été publiées. Globalement, ils ont trouvé une diminution de la diversité bactérienne après transplantation, mais après transplantation, la diversité observée reste stable jusqu'à 6 mois (durée pendant laquelle les patients sont sous antibioprofylaxie).

#### 4.3.1. Immunosuppresseurs utilisés en transplantation rénale

Aucune donnée n'est disponible à ce jour sur l'impact des traitements immunosuppresseurs d'induction utilisés en transplantation rénale, à savoir les GALP ou l'Ac anti-CD25, sur l'équilibre intestinal. Lee *et al* évoque une abondance supérieure des *Actinobacteria* et des *Bifidobacteriales* chez 15 patients ayant reçu des GALP en comparaison à 3 patients traités par Ac anti-CD25, mais la différence observée n'est pas significative (Lee *et al.* 2014).

L'impact des immunosuppresseurs d'entretien utilisés en transplantation rénale sur l'équilibre intestinal reste également très peu étudié. Lee *et al* ont montré une association entre l'abondance de *Faecalibacterium prausnitzii* et la dose nécessaire de tacrolimus à administrer (Lee *et al.* 2015). Kubler *et al* ont montré, à partir de biopsies intestinales, que l'administration par voie orale de corticoïdes ou d'azathioprine dans le cadre du traitement de la maladie de Crohn n'a pas d'impact majeur sur la synthèse de défensines antimicrobiennes au niveau de l'iléon et du colon (Kubler *et al.* 2009). Malinowski *et al* ont voulu testé l'impact de la ciclosporine A, du tacrolimus, du MMF, de l'acide mycophénolique (MPA), du sirolimus, et de l'évérolimus sur l'intestin grêle et le colon et la barrière intestinale par la méthode de la chambre d'Ussing. Ils ont testé des faibles et des fortes doses de ces traitements dans un modèle de transplantation chez des rats. Seuls l'évérolimus, le tacrolimus et le MPA à fortes doses entraînent une altération de la barrière intestinale, uniquement au niveau de l'intestin grêle (Malinowski *et al.* 2011).

#### 4.3.2. Antibiothérapie

Pour contrecarrer le risque d'infections opportunistes et bactériennes secondaires à l'immunosuppression, les patients transplantés rénaux suivent une antibiothérapie prophylactique *per os* par Sulfaméthoxazole/Triméthoprime (BACTRIM®) pendant les 3 à 6 premiers mois suivant la transplantation.

La prise d'antibiotique a un impact direct sur le microbiote. L'antibiotique détruit les bactéries du microbiote dominant qui lui sont sensibles, rompant ainsi l'effet de barrière et favorisant la pullulation de germes pathogènes. Globalement, on observe une diminution de la diversité bactérienne mais pas de la quantité de bactéries. Dans un certain nombre de cas, les *Bacteroides* sont diminuées après antibiothérapie (Jin *et al.* 2016) alors que certaines bactéries pathogènes telles que *Clostridium difficile* ou *Salmonella typhimurium* se développent [revue, (Modi *et al.* 2014)]. Ce déséquilibre peut provoquer des diarrhées dont la fréquence augmente aux âges extrêmes de la vie ou lors d'une antibiothérapie à spectre large.

Knoop *et al* ont montré que l'administration par voie orale d'une combinaison de certains antibiotiques (ampicilline, métronidazole, néomycine et vancomycine), induit une TBD accompagnée d'une augmentation des cytokines inflammatoires. Les auteurs supposent que cette TBD pourrait expliquer l'augmentation des pathologies inflammatoires retrouvées chez les patients recevant une antibiothérapie (Knoop *et al.* 2016).

Cependant, la prise d'antibiotique peut également jouer un rôle protecteur. Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant l'impact exact de l'antibiothérapie par Sulfaméthoxazole/Triméthoprime mais une étude chez les patients VIH<sup>+</sup> a montré que les patients recevant cet antibiotique en plus de leur trithérapie conventionnelle présentaient un taux plus bas de LPS circulant (Vesterbacka *et al.* 2015). On pourrait suggérer que la dysbiose post-antibiotique favorise la TBD mais son impact sur l'inflammation dépend des types de bactéries affectées par le médicament.



# OBJECTIFS

---

---



Nous avons émis l'hypothèse d'une immunosénescence induite par les GALP (Ducloux *et al.* 2014). L'objectif de notre travail est de caractériser la présence d'une immunosénescence après GALP et d'améliorer la compréhension des mécanismes impliqués dans l'induction d'une immunosénescence. Nous avons principalement étudié l'impact des GALP sur la fonction thymique en évaluant à la fois, l'effet des GALP sur le potentiel de production thymique des LT naïfs, et sur la capacité de la moelle osseuse à produire des cellules progénitrices de l'immunité T. Ces travaux ont fait l'objet d'une publication, présentée dans la partie 1 de l'étude des travaux.

L'immunosénescence est étroitement associée à la présence d'une inflammation chronique, contrôlée, à bas bruit [revue, (Franceschi *et al.* 2014)]. Une stimulation antigénique persistante par les produits bactériens serait un facteur impliqué dans l'induction de l'inflammation chronique et de l'immunosénescence. La contribution du LPS, issu de la TBD, dans le développement de l'inflammation chronique est largement décrite dans des pathologies telles que les maladies neuro-dégénératives, les maladies métaboliques et les infections par le VIH [revue, (Brenchley *et al.* 2012)]. Il existe une TBD chez les patients insuffisants rénaux (Wang *et al.* 2012, Kwan *et al.* 2013, Vaziri *et al.* 2016), mais l'évolution de ce phénomène après transplantation rénale n'a jamais été rapportée. L'objectif est de décrire l'histoire naturelle de la TBD après transplantation rénale. Nous avons également voulu décrire l'implication de la TBD i) dans le développement de l'inflammation chronique, ii) dans le développement des complications associées à la transplantation rénale, et iii) en fonction du traitement d'induction. Les GALP pourraient jouer un rôle dans la mesure où elles entraînent une lyse des cellules immunitaires et la muqueuse intestinale ne compte pas moins de 60 % de nos cellules immunitaire [revue, (Bischoff *et al.* 2014)]. Une publication des résultats de ces travaux est en cours de soumission, elle est présentée dans la partie 2 de l'étude des travaux.

La dysbiose est un facteur favorisant la TBD et l'inflammation chronique intra et extra-intestinale non contrôlée [revue, (Sekirov *et al.* 2010)]. Un déséquilibre des populations bactériennes, au sein de la lumière intestinale et aux abords de l'épithélium, en faveur de populations pathogènes est largement décrit à la fois comme cause et conséquences de nombreuses pathologies telles que les MICI, les maladies métaboliques et les allergies [revue, (Sekirov *et al.* 2010)]. L'objectif de ce travail est d'améliorer les

connaissances sur le rôle du microbiote en transplantation rénale, et de ses modifications par les traitements couramment utilisés en transplantation et par la transplantation rénale elle-même. Pour tester nos hypothèses, nous avons travaillé sur un modèle murin et également sur des patients transplantés rénaux. Les résultats de ces travaux sont préliminaires et sont présentés dans la partie 3 de l'étude des travaux.

# **ETUDE DES TRAVAUX**

---



## **Partie 1: Immunosénescence accélérée après GALP**

### **1. Etude des marqueurs d'immunosénescence après transplantation rénale et utilisation de GALP**

Les enjeux de la compréhension des mécanismes de reconstitution immunitaire après GALP sont importants au regard de la morbi-mortalité des transplantés rénaux présentant une lymphopénie T CD4 prolongée (Ducloux *et al.* 2003). Les travaux antérieurs ont montré que les transplantés rénaux traités par GALP présentent plus fréquemment une inversion du rapport CD4/CD8 (Muller *et al.* 1997). Les GALP pourraient induire un phénotype biologique d'immunosénescence prématurée.

Dans ce travail, nous avons évalué les marqueurs de la sénescence immunitaire dans une cohorte prospective de transplantés rénaux en fonction du type de traitement d'induction utilisé : lympho-déplétant (GALP) ou non lympho-déplétant (Ac anti-CD25). Les marqueurs de sénescence ont d'abord été évalués le jour de la transplantation, et les dosages ont été répétés un an après la transplantation rénale. Nous avons également analysé l'influence de ces biomarqueurs sur le devenir des patients après la transplantation rénale.

Nous nous sommes appuyés sur une cohorte multicentrique de transplantés rénaux : la cohorte ORLY-Est. L'étude ORLY-Est (Influence de l'ORientation de la réponse LYmphocytaire sur la survenue de complications athéromateuses après transplantation rénale) est une étude prospective observationnelle initiée en 2008 et conçue pour évaluer les facteurs immunologiques prédictifs des événements athéromateux post-transplantation. Sept centres français de transplantation (Besançon, Dijon, Nancy, Kremlin-Bicêtre, Clermont-Ferrand, Reims et Strasbourg) participent à cette étude. A ce jour, 1100 patients ont été inclus. Les prélèvements biologiques et une analyse des sous-populations lymphocytaires ont été réalisés le jour de la transplantation (J0) et un an après (J365). Le recueil des événements cliniques porte sur une période de 10 ans. Une banque de prélèvements biologiques est conservée (cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) et sérum) au Centre de Ressources Biologiques de Dijon pour les éventuelles analyses complémentaires.

# ATG-Induced Accelerated Immune Senescence: Clinical Implications in Renal Transplant Recipients

T. Crepin<sup>1,2,3,4,†</sup>, C. Carron<sup>1,2,3,†</sup>,  
C. Roubiou<sup>1,2,3,4,†</sup>, B. Gaugler<sup>1,2,3,5</sup>, E. Gaiffe<sup>1,2,3</sup>,  
D. Simula-Faivre<sup>6</sup>, C. Ferrand<sup>1,2,3,5</sup>,  
P. Tiberghien<sup>1,2,3,5</sup>, J.-M. Chalopin<sup>1,2,3,4,6</sup>,  
B. Moulin<sup>7</sup>, L. Frimat<sup>8</sup>, P. Rieu<sup>9</sup>, P. Saas<sup>1,2,3,5,6</sup>,  
D. Ducloux<sup>1,2,3,4,6</sup> and J. Bamoulid<sup>1,2,3,4,\*</sup>

<sup>1</sup>INSERM, UMR1098, Federation Hospitalo-Universitaire INCREASE, Besançon, France

<sup>2</sup>Université de Franche-Comté, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Besançon, France

<sup>3</sup>Structure Fédérative de Recherche, SFR FED4234, Besançon, France

<sup>4</sup>CHU Besançon, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, Besançon, France

<sup>5</sup>EFS Bourgogne Franche-Comté, Plateforme de Biomonitoring, CIC 1431/UMR1098, Besançon, France

<sup>6</sup>CHU Besançon, CIC Biothérapie, INSERM CIC1431, Besançon, France

<sup>7</sup>CHU Strasbourg, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, Strasbourg, France

<sup>8</sup>CHU Nancy, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, Nancy, France

<sup>9</sup>CHU Reims, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, Reims, France

\*Corresponding author: Jamal Bamoulid, jbamoulid@chu-besancon.fr

†These authors contributed equally to this work.

**Persistent ATG-induced CD4<sup>+</sup> T cell lymphopenia is associated with serious clinical complications. We tested the hypothesis that ATG induces accelerated immune senescence in renal transplant recipients (RTR). Immune senescence biomarkers were analyzed at transplant and one-year later in 97 incident RTR –62 patients receiving ATG and 35 receiving anti-CD25 mAb (α-CD25). This consisted in: (i) thymic output; (ii) bone marrow renewal of CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells (CD34<sup>+</sup>HPC) and lymphoid (l-HPC) and myeloid (m-HPC) progenitor ratio; (iii) T cell phenotype; and (iv) measurement of T cell relative telomere length (RTL) and telomerase activity (RTA). Clinical correlates were analyzed with a 3 year follow-up. Thymic output significantly decreased one-year posttransplant in ATG-treated patients. ATG was associated with a significant decrease in l-HPC/m-HPC ratio. Late stage differentiated CD57<sup>+</sup>/CD28<sup>-</sup> T cells increased in ATG-treated patients. One-year posttransplant T cell RTL and RTA were consequently lower in ATG-treated patients. ATG is associated with accelerated immune senescence. Increased frequency of late differentiated CD4<sup>+</sup> T cell frequency at transplantation tended**

to be predictive of a higher risk of subsequent opportunistic infections and of acute rejection only in ATG-treated patients but this needs confirmation. Considering pretransplant immune profile may help to select those patients who may benefit from ATG to prevent severe infections and acute rejection.

**Abbreviations:** Anti-CD25, α-CD25; ATG, anti-thymocyte globulins; HPC, hematopoietic progenitor cells; l-HPC, lymphoid hematopoietic progenitor cells; mAb, monoclonal antibody; m-HPC, myeloid hematopoietic progenitor cells; qPCR, quantitative PCR; RTA, relative telomerase activity; RTE, recent thymic emigrant; RTL, relative telomere length; RTR, renal transplant recipient; TCR, T cell receptor; TREC, T cell receptor excision circles; Treg, regulatory T cells

Received 05 September 2014, revised 16 October 2014 and accepted for publication 01 November 2014

## Introduction

Broad T cell depletion by polyclonal anti-thymocyte globulins (ATG) has been used for many years as a part of immunosuppressive treatment in transplantation. These polyclonal antibodies are a complex mixture of antibodies with multiple specificities directed against both T and non-T cells, including thymic stromal cells or hematopoietic progenitors (1,2). They produce profound T cell depletion (1,2) and induce persistent changes in T cell subsets characterized by a low CD4<sup>+</sup> T cell count and CD8<sup>+</sup> T cell expansion (3). Interestingly, persistent post-ATG CD4<sup>+</sup> T cell lymphopenia is also associated with some nonspecific features of immune senescence, such as CD4/CD8 T-cell ratio inversion, B cell lymphopenia and chronic low-grade inflammation (4). However, there are currently few data supporting the concept of "ATG-induced accelerated immune senescence."

The loss of thymic function is a hallmark of immune senescence (5). We previously reported that CD4<sup>+</sup> T cell reconstitution after ATG is dependent on pretransplant thymic function (4). Nevertheless, whether ATG could affect thymic function is a matter of debate. Preville et al showed, in a nonhuman primate model, that T cell depletion induced by ATG essentially concerned peripheral blood T cells and peripheral lymphoid tissues, but not the thymus (6). Ruzek et al studied the effects of an anti-murine rabbit

ATG (mATG) administered to C57BL/6 mice. Although mATG depleted thymocytes *in vitro*, there was no thymocyte depletion *in vivo* at any dose level (7), suggesting decreased antibody accessibility to the thymus. Nevertheless, the effects of ATG on human thymic function have never been assessed.

Alternatively, ATG may act upstream of thymus through lymphoid progenitor depletion. We have previously observed a prolonged B cell lymphopenia after ATG in patients with prolonged CD4<sup>+</sup> T cell lymphopenia (4). This observation could suggest that ATG could have a common toxic effect on bone marrow-derived CD34<sup>+</sup> hematopoietic progenitor cells (CD34<sup>+</sup>HPC), particularly on lymphoid progenitor cells (l-HPC), the source of thymocytes and immature B cells. To date, no data about the effect of ATG on these human bone marrow progenitor cells have been reported.

Thymic involution is associated with alterations of T cell subpopulations, including naive T cell pool reduction, memory T cell pool expansion, oligoclonal T cell receptor (TCR) repertoire, and alteration of T cell functions leading to a decreased capacity to control infections and respond to vaccines (8). CD4<sup>+</sup> T cells become more sensitive than CD8<sup>+</sup> T cells to apoptosis leading to an inverted CD4/CD8 T-cell ratio, and some data suggest that regulatory T cells (Treg) could expand (9). These alterations of T cell phenotypes have not been studied simultaneously in ATG- and non-ATG-treated patients.

Finally, immune senescence can be assessed by measurement of telomere length: naive T cells have longer telomeres than effector memory T cells (10). To reverse this phenomenon, T cell precursors, thymocytes, naive, and activated T cells have the property to increase their telomerase activity (11). No data are currently available on T cell relative telomere length (RTL) and telomerase activity (RTA) after ATG treatment.

We hypothesized that ATG could reduce circulating lymphoid progenitors and thymic output of naive T cells leading to accelerated immune senescence. To ascertain this, we assessed markers of immune senescence in a prospective cohort of renal transplant recipients (RTRs) the day of transplantation and one year after renal transplantation. We also analyzed the influence of these immune senescence biomarkers on patients' outcome during a period of 3 years following renal transplantation.

## Methods

### Study design and populations

**Patient population and samples:** Research has been conducted on biological samples collected in 97 incident RTR from the ORLY-EST study. For each patient, blood samples were collected at time of transplantation and one year after. Sample collection was performed after regulatory

approval by the French ministry of health (agreement number # DC-2008-713, June 11 2009). The ethic committee of Franche-Comté study has approved the study (2008). Patients enrolled in the ORLY-EST study gave their written informed consent. Clinical data were prospectively collected. Among the 97 RTR, 62 patients had received T cell depleting ATG therapy and were compared to 35 RTR who had received nondepleting anti-CD25 ( $\alpha$ -CD25) monoclonal antibody (mAb) therapy. The patients did not differ for baseline characteristics (Table S1 of Supporting Information). Calcineurin inhibitors (CNI) and Mycophenolate mofetil (MMF) were widely used as immunosuppressive regimen (Table S1 of Supporting Information). For details, see the Methods in the Supporting Information section.

**T cell immunophenotypic analysis:** Absolute numbers of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were determined on fresh samples by a single platform flow cytometry approach using TetraCXP<sup>®</sup> method, Flow-Count<sup>®</sup> fluorospheres, and FC500 cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) according to manufacturer's recommendations. Extended T cell phenotype was performed on frozen samples. For this, PBMCs were isolated by density gradient centrifugation (Pancoll, Pan-Biotech GmbH Aidenbach, Germany) and cryopreserved. After thawing, PBMCs were washed twice in RPMI 1640 + GlutaMAX<sup>™</sup>-I medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) containing 10% fetal calf serum (Invitrogen), thereafter referred as complete medium. Cells were stained with the following conjugated antibodies directed against: CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD31, CD57, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD127 (IL-7R $\alpha$ ) (Table S2 of Supporting Information). To detect intracellular FoxP3, surface staining PBMCs were processed using fixation buffer and permeabilization buffer (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) and incubated with the anti-FoxP3 antibody. Cell debris and doublets were excluded on the basis of side versus forward scatter. Cells were analyzed on a FACS CANTO II cytometer (BD Biosciences) using FACS Diva (BD Biosciences) software. For details on the phenotype of analyzed T cell subsets, see the Methods in the Supporting Information section.

**CD34<sup>+</sup> HPC immunophenotypic analysis:** CD34<sup>+</sup> HPC immunophenotype analysis was performed on frozen samples of 54 patients at day 0 (27 ATG, 27  $\alpha$ -CD25) and 58 patients at 1 year (27 ATG, 31  $\alpha$ -CD25) from the 97 patients. PBMCs were isolated by density gradient centrifugation (Pancoll, Pan-Biotech GmbH Aidenbach, Germany) and cryopreserved. After thawing, PBMCs were washed twice in complete medium. Cells were stained with the following conjugated antibodies directed against: CD34, Lineage (CD3 CD14 CD16 CD19 CD20 CD56), CD45, CD38, CD10, CD117, CD45RA (Table S2 of Supporting Information). Using Fixable Viability Dye allows dead cells to be excluded from analysis and doublets were also excluded on the basis of side versus forward scatter. Cells were analyzed on a FACS CANTO II cytometer using FACS Diva (BD Biosciences) software. HPCs are divided into two main progenitor subsets: lymphoid progenitor cells (l-HPCs, CD38<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup>) and myeloid progenitor cells (m-HPCs: CD38<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD10<sup>-</sup>). The variation in l-HPCs (named  $\Delta$ PG-L) was calculated as: (posttransplant l-HPC% - pretransplant l-HPC%)/pretransplant l-HPC%. For details on the phenotype of analyzed CD34<sup>+</sup>HPC subsets, see Figure S1 in the Supporting Information section.

**T cell relative telomere length and telomerase activity:** Twenty patients (10 ATG and 10  $\alpha$ -CD25) out of 97 were selected on baseline characteristic to maintain the comparability of the patients in each group (age and CMV status).

**Isolation of CD3<sup>+</sup> T cells:** T cells were isolated by negative immunomagnetic cell sorting using a human pan T cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) with an autoMACS separator PRO (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's recommendations. Sorted cell populations were confirmed to be >91% pure. For details, see the Methods in the Supporting Information section.

**Relative telomere length measurement:** Relative telomere length quantification in T cells was performed by the quantitative polymerase chain reaction (qPCR) approach based on a previously established method, using  $\beta$ -globin as normalizing gene. Details about the primer sequences and amplification conditions are available in the Methods in the Supporting Information section.

**Relative telomerase activity measurement:** Telomerase activity of T cells was examined using the Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA PLUS kit (Applied, Roche Diagnostics, France) according to the manufacturer's instructions. Jurkat cells (high RTA) and human fibroblasts (low RTA) were used as control. For more details, see the Methods in the Supporting Information section.

**Assessment of thymic output by T cell receptor excision circles (TREC) content and CD31 expression analysis:** TREC content was studied in 62 patients (43 ATG and 19  $\alpha$ -CD25) out of 97 selected on baseline characteristics to maintain the comparability of the patients in each group (age and CMV status). DNA extracted from T cells or total PBMC was tested for the quantification of recent thymic emigrants (RTEs) by qPCR, using specific primers for TREC amplification, as previously described (4). To confirm these data, CD31 expression was also used to identify RTE in all 97 patients (12).

**Outcomes:** Clinical outcomes occurring during the three year period following renal transplantation were prospectively collected and registered by an independent committee. Definitions are available in the supplementary text in the Supporting Information section. CMV disease, opportunistic infections, acute rejection, new onset diabetes mellitus, atherosclerotic event, graft loss, and death were defined prospectively in the ORLY-Est

study. These outcomes were analyzed according to induction therapy and features of immune senescence explored in all patients at transplant and one year posttransplant.

**Statistical analysis**

Study values at transplant and one year after were compared using paired t-test. The relationships between RTE, delta RTE (i.e. [RTE at one year after transplantation – RTE at time of transplantation]/RTE at time of transplantation), and Treg were examined using Spearman correlation coefficients. Age was split into two classes separated by the median age of the value. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 5 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA). Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . Age, gender, induction therapy (i.e. ATG or  $\alpha$ -CD25), immunosuppressive regimen, and CMV status were analyzed as potential confounding factors.

**Results**

**Patient characteristics at baseline**

Patient characteristics at baseline are summarized in Table 1. Ninety-seven patients were included in the study: 62 received ATG and 35  $\alpha$ -CD25. Both groups were comparable for age, CMV status, cardiovascular risk factors and events, and method of dialysis prior to transplantation. Time on dialysis and anti-HLA immunization were significantly higher in patients having received ATG ( $48.6 \pm 54$  vs.  $26.5 \pm 29$  months,  $p = 0.04$  and  $51\%$  vs.  $20\%$ ,  $p < 0.005$ , respectively). The immunosuppressive regimen was identical in both groups, except for corticoid, significantly more prescribed in the  $\alpha$ -CD25 group ( $100\%$  vs.  $82\%$ ,  $p = 0.006$ ).

**Table 1:** Patient characteristics at baseline

	All patients	ATG	$\alpha$ -CD25	p
N	97	62	35	
Age	$48 \pm 13$	$47 \pm 12$	$51 \pm 13$	0.15
Sex ratio	1.6	1.3	2.2	0.32
BMI ( $\text{kg}/\text{m}^2$ )	$24.2 \pm 4.4$	$24.1 \pm 4.6$	$24.4 \pm 4.1$	0.86
Mycophenolate mofetil/mycophenolic acid n. (%)	94 (95.5)	61 (97)	33 (94)	0.62
CNI n. (%)	95 (97)	61 (97)	34 (97)	1
mTor inhibitors n. (%)	6 (4)	4 (5)	2 (3)	1
Corticosteroid n. (%)	86 (89)	51 (82)	35 (100)	0.006
CMV D+/R- n. (%)	17 (17.5)	10 (16)	7 (20)	0.78
Valgancyclovir n. (%)	55 (57)	28 (44)	27 (77)	0.003
Mean time on dialysis prior to transplantation (months)	$40.4 \pm 46.8$	$48.7 \pm 53.4$	$26.7 \pm 29.1$	0.04
Peritoneal dialysis (PD) n. (%)	19 (19.5)	13 (20)	6 (17)	1
Hemodiaysis (HD) n. (%)	9 (9.3)	5 (7)	4 (11)	0.46
PD and HD n. (%)	50 (51.5)	38 (61)	22 (63)	1
No dialysis prior to transplantation n. (%)	8 (8.2)	5 (8)	3 (9)	1
Anti-HLA immunization prior to transplantation n. (%)	39 (40.2)	32 (51)	7 (20)	<0.005
Previous transplantation n. (%)	9 (9.3)	8 (13)	1 (3)	0.15
Cancer n. (%)	10 (10.3)	5 (7)	5 (14)	0.28
Cardiovascular event (CVE) n. (%)	8 (8.2)	5 (7)	3 (9)	0.70
Hypertension n. (%)	88 (91)	56 (89)	32 (89)	1
Dyslipidemia n. (%)	19 (19.6)	17 (26)	2 (4)	0.17
Diabetes n. (%)	14 (14.4)	10 (16)	4 (11)	0.56

n.: number; BMI: body mass index; CNI: calcineurin inhibitors; TREC: T receptor cell excision circle; RTE: recent thymic emigrants assessed by the following phenotype  $\text{CD}31^+ \text{CD}45\text{RA}^+ \text{CD}45\text{RO}^+$ ; L-HPC: lymphoid progenitor cells.

**Thymus-derived T cells decrease after treatment with anti-thymocyte globulins**

Thymic function (assessed by CD31 expression and TREC analysis) at time of transplantation was similar in ATG- and  $\alpha$ -CD25-treated patients.

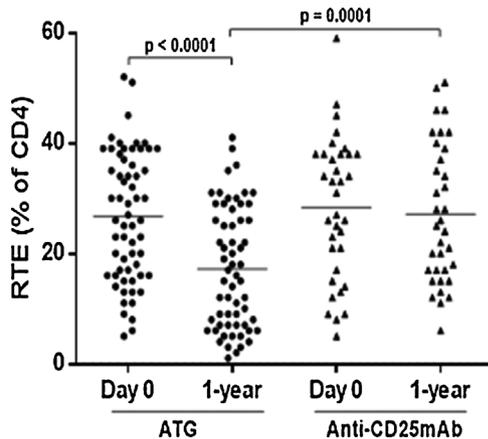
Patients having received ATG experienced a significant decrease in RTE percentage (mean:  $26.7 \pm 12\%$  vs.  $17.2 \pm 11\%$ ,  $p < 0.0001$ ), absolute CD31<sup>+</sup> RTE cell count ( $190 \pm 131 \text{ mm}^{-3}$  vs.  $52 \pm 53 \text{ mm}^{-3}$ ,  $p < 0.0001$ ) and TREC ( $2336.2 \pm 4699$  vs.  $824.3 \pm 1831/150\,000 \text{ CD3}^+$  T cells,  $p = 0.030$ ) one-year posttransplant (Figure 1 and Table 2). This decrease was not observed in  $\alpha$ -CD25-treated patients (RTE% mean:  $28.4 \pm 13\%$  vs.  $27.3 \pm 13\%$ ,  $p = 0.546$ , RTE cell count:  $219.5 \pm 164 \text{ mm}^{-3}$  vs.  $242.4 \pm 205 \text{ mm}^{-3}$ ,  $p = 0.481$  and TREC:  $1784.5 \pm 3364$  vs.  $2106.5 \pm 3972/150\,000 \text{ CD3}^+$  T cells,  $p = 0.394$ ) (Figure 1 and Table 2).

Mean of RTE percentage, absolute number of CD31<sup>+</sup> RTE and TREC one-year after transplantation were significantly lower in patients having received ATG compared to those having received the  $\alpha$ -CD25 ( $17.2 \pm 11\%$  vs.  $27.3 \pm 13\%$ ,  $p = 0.0001$ ,  $52.2 \pm 53 \text{ mm}^{-3}$  vs.  $242.4 \pm 205 \text{ mm}^{-3}$ ,  $p < 0.0001$  and  $824.3 \pm 1831$  vs.  $2106.5 \pm 3972/150\,000 \text{ CD3}^+$  T cells,  $p = 0.049$ ) (Figure 1 and Table 2).

Figures S2A–D are discussed in the supplementary text in the Supporting Information section.

**Circulating lymphoid progenitor cells decrease after treatment with anti-thymocyte globulins**

No significant variation of total HPCs was observed after ATG or  $\alpha$ -CD25. However, compared to the transplant time,



**Figure 1: Circulating recent thymic emigrants (RTE) in RTRs after T cell depleting therapy (ATG) versus nondepleting therapy ( $\alpha$ -CD25).** Variation of RTE cell population between the transplant time and 1 year posttransplant according to induction therapy. Values are expressed in percentage. Bars represent mean values. Only significant p values between groups are represented.

**Table 2: Evolution of RTR thymic function assessed by CD31<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>-</sup> recent thymic emigrants (RTE) and T cell receptor excision circles (TREC) according to induction therapy**

Evolution of RTE			
	Day 0	1 year	p
ATG group (n = 62)			
RTE <sup>1</sup> % (of CD4)	26.7 ± 12	17.2 ± 11*	<0.0001
RTE per mm <sup>3</sup>	190 ± 131	52.2 ± 53**	<0.0001
TREC <sup>2</sup>	2336.2 ± 4699	824.3 ± 1831***	0.0302
$\alpha$ -CD25 group (n = 35)			
RTE % (of CD4)	28.4 ± 13	27.3 ± 13*	0.546
RTE per mm <sup>3</sup>	219.5 ± 164	242.4 ± 205**	0.481
TREC	1784.5 ± 3364	2106.5 ± 3972***	0.394

\*p = 0.0001.  
\*\*p < 0.0001.  
\*\*\*p = 0.049.

<sup>1</sup>RTE were assessed by cytometry based on the following phenotype: CD31<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> CD4<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>.  
<sup>2</sup>TREC were expressed per 150 000 CD3<sup>+</sup> T cells.

we observed a significant decrease of I-HPC frequency among HPCs at one year in patients having received ATG ( $14.3 \pm 9.3\%$  vs.  $10.6 \pm 6.4\%$ ,  $p = 0.037$ ) (Figure 2A) and a concomitant increase of m-HPC frequency ( $85.2 \pm 9.6\%$  vs.  $89.1 \pm 6.7\%$ ,  $p = 0.033$ ) (Figure 2B). This variation is confirmed when analyzing I-HPC/mHPC ratio (Figure 2C). No significant variations were observed in the  $\alpha$ -CD25 group.

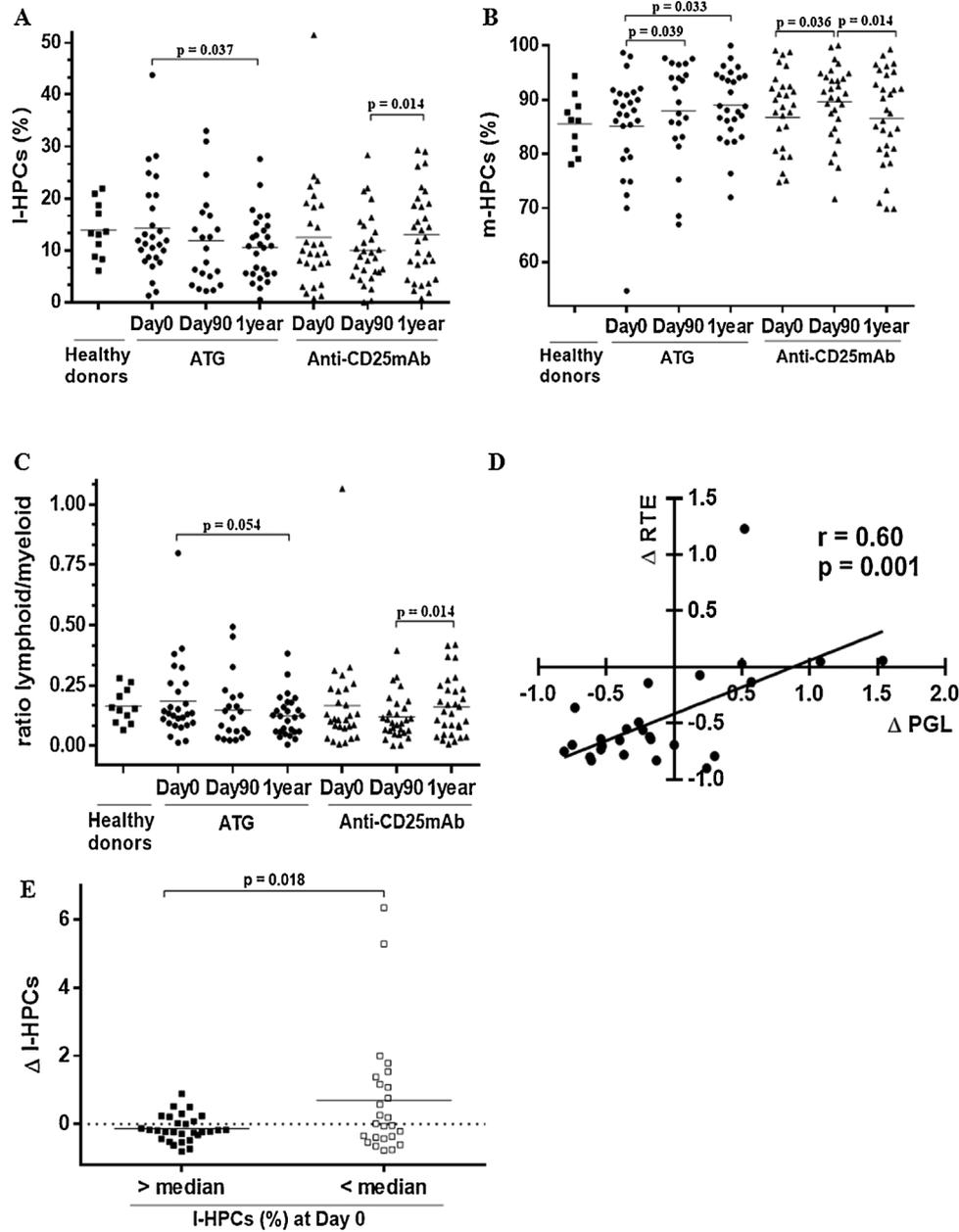
We observed a significant positive correlation between variation of lymphoid progenitors between the transplant time and one year after transplantation ( $\Delta$ PG-L) and  $\Delta$ RTE ( $r = 0.60$  and  $p = 0.001$ ) only in patients having received ATG (Figure 2D). This correlation could suggest that thymic output after ATG is, at least in part, directly dependent of the renewal capacity of the bone marrow to produce progenitor T cells.

As for RTE, the effect of ATG on this renewal capacity is related to the bone marrow output at time of transplantation. Pretransplant I-HPC percentage of patients having received ATG was split into two classes separated by the median (7.15%). Patients with higher pretransplant I-HPC had a greater decrease in I-HPCs after ATG than those with lower pretransplant I-HPC ( $-13.1 \pm 39\%$  vs.  $+68.8 \pm 176\%$ ;  $p = 0.018$ ) (Figure 2E).

**Anti-thymocyte globulins induce expansion of late stage differentiated T cells**

Late stage differentiated CD8<sup>+</sup> T cells increased one year posttransplant in ATG-treated patients (CD28<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>:  $47.5 \pm 22\%$  vs.  $55.4 \pm 24\%$  one year after transplantation,  $p = 0.005$ ; Figure 3A) and CD57<sup>-</sup>CD28<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>:  $19.6 \pm 9\%$

## ATG and Immune Senescence in Transplanted Patients



**Figure 2: Circulating progenitor cells in RTRs after T cell depleting therapy (ATG) versus nondepleting therapy ( $\alpha$ -CD25).** Evolution of I-HPC subpopulations according to induction therapy between the transplant time (day 0), 3 months (day 90) and 1 year posttransplant (1 year) (A). Evolution of m-HPC subpopulations according to induction therapy between the transplant time (day 0), 3 months (day 90) and 1 year posttransplant (1 year) (B). Evolution of lymphoid/myeloid progenitor cell ratio according to induction therapy between the transplant time (day 0), 3 months (day 90) and 1 year posttransplant (1 year) (C). Correlation between RTE cell population variation ( $\Delta RTE = [RTE \text{ at } 1 \text{ year after transplantation} - RTE \text{ at time of transplantation}] / RTE \text{ at time of transplantation}$ ) and I-HPC subpopulation variation ( $\Delta PGL = [PGL \text{ at one year after transplantation} - PGL \text{ at time of transplantation}] / PGL \text{ at time of transplantation}$ ) in ATG patient's group between the transplant time and 1 year posttransplant (D). Variation of I-HPC subpopulations between the transplant time and 1 year posttransplant according to I-HPC subpopulations at transplant time (day 0) (E). Values are expressed in percentage. Bars represent mean values. Only significant p values between groups are represented.

vs.  $28.0 \pm 15\%$  one year after transplantation,  $p < 0.0001$ ; Figure 3B), while naive  $CD8^+$  T cells significantly decreased ( $CD28^+CD8^+$ :  $52.5 \pm 22\%$  vs.  $44.6 \pm 24\%$  one year after transplantation,  $p = 0.048$ , and  $CD57^-CD28^+CD8^+$ :

$51.8 \pm 24.1\%$  vs.  $41.5 \pm 21\%$  one year after transplantation,  $p = 0.004$ ). These modifications were amplified in  $CD4/CD8$  inverted ratio and CMV-exposed patients (Figures 3D and E).

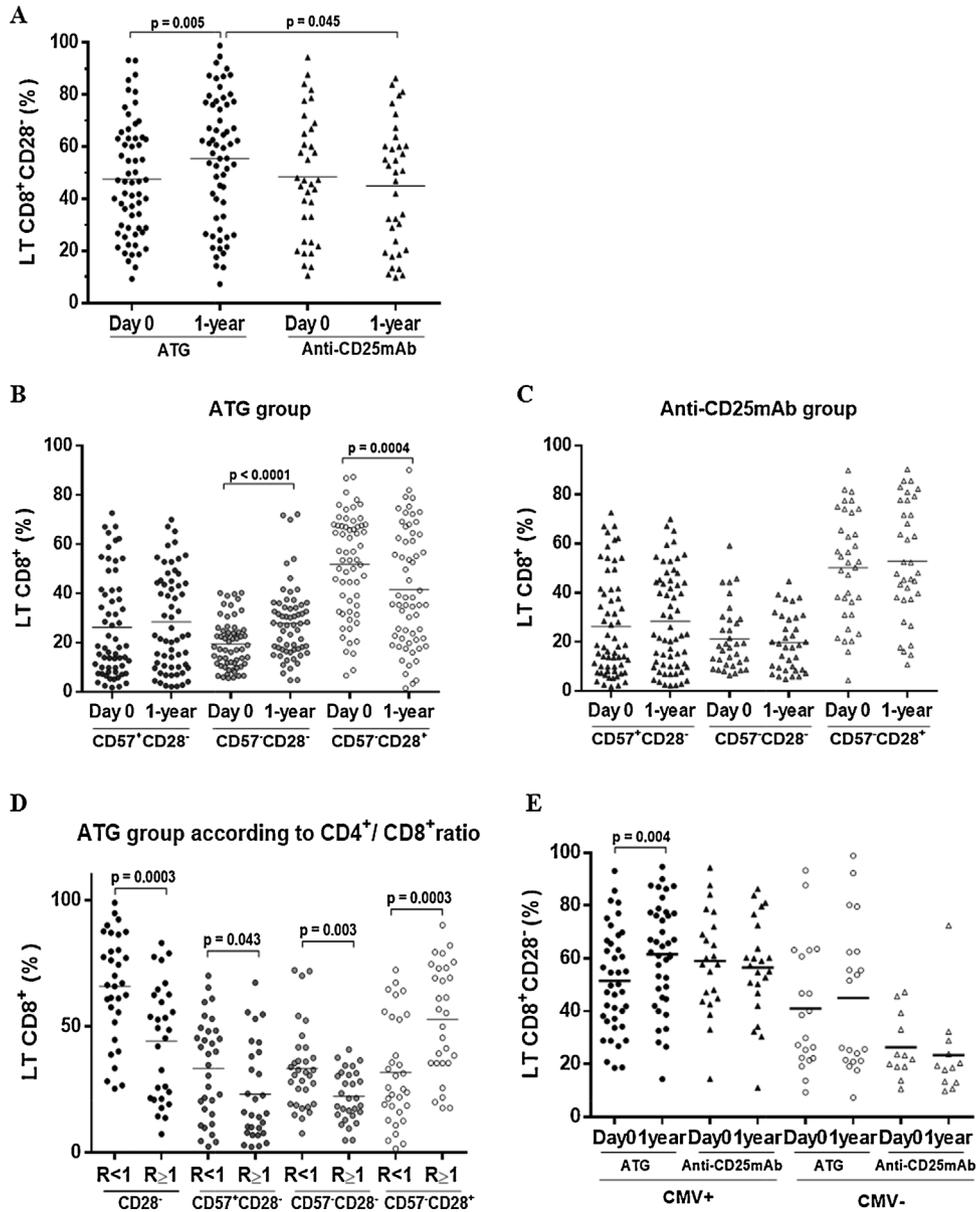
All CD8<sup>+</sup> T cells subsets remained unchanged in patients having received  $\alpha$ -CD25 mAb induction therapy (Figures 3A, C, and E).

Late stage differentiated CD4<sup>+</sup> T cells also increased in ATG-treated patients (CD57<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup>: 4.3  $\pm$  7% vs.

5.7  $\pm$  12% one year after transplantation, p=0.025; data not shown).

**Circulating peripheral Treg are expanded in ATG-treated patients**

Both CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD127<sup>-</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> Treg increased in ATG-treated patients (3.7  $\pm$  2.2% vs. 4.7  $\pm$  2.5%,



**Figure 3: Circulating CD8<sup>+</sup> T cell subsets in RTRs after T cell depleting therapy (ATG) versus nondepleting therapy ( $\alpha$ -CD25).** Evolution of CD28<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (A) T cell subpopulations according to induction therapy between the transplant time (day 0) and 1 year posttransplant (1 year). Evolution of CD28<sup>+</sup> and CD28<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cell subpopulations between transplant time (day 0) and 1 year posttransplant (1 year) in patients receiving ATG (B) and anti-CD25 mAb (C). Comparison of CD8<sup>+</sup> T cells according to CD4/CD8 T-cell ratio at 1 year posttransplant in ATG patients (D). Evolution of CD28<sup>+</sup> and CD28<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T cell subsets according to CMV status in ATG or anti-CD25 mAb treated patients between transplant time (day 0) and 1 year posttransplant (year) (E). Values are expressed in percentage. Bars represent mean values. Only significant p values between groups are represented.

$p=0.024$  and  $2.7 \pm 1.9\%$  vs.  $4.0 \pm 2.5$ ,  $p=0.011$ , respectively) (Figure 4A). By contrast,  $CD25^+FoxP3^+CD4^+$  and  $CD127^-FoxP3^+CD4^+$  Treg decreased in  $\alpha$ -CD25-treated recipients ( $4.5 \pm 1.8\%$  vs.  $3.2 \pm 1.3\%$ ,  $p=0.021$  and  $4.2 \pm 1.4\%$  vs.  $3.1 \pm 1.3$ ,  $p=0.042$ , respectively) (Figure 4B). Impaired thymic function one year posttransplant (defined as RTE  $< 41 \text{ mm}^{-3}$ ) was associated with a greater expansion of Treg ( $CD25^+FoxP3^+CD4^+$   $4.2 \pm 2.6\%$  vs.  $5.3 \pm 2.3\%$ ,  $p=0.078$  and  $CD127^-FoxP3^+CD4^+$ :  $3.4 \pm 1.9\%$  vs.  $4.7 \pm 2.9\%$ ,  $p=0.034$ ; Figure 4C). When CD31 was used to discriminate thymic versus peripheral Treg (12), thymic Treg, defined as  $CD31^+FoxP3^+CD4^+$ , significantly decreased in ATG-treated patients with impaired thymic function ( $27.3 \pm 16.8\%$  vs.  $18.8 \pm 8.8\%$ ,  $p=0.021$ ; Figure 4D). Taken together, these results suggested that a peripheral Treg expansion occurred in ATG-treated patients especially in those with impaired thymic function one year posttransplant.

**T cell relative telomere length and telomerase activity increase in  $\alpha$ -CD25-treated patients but not in ATG-treated patients**

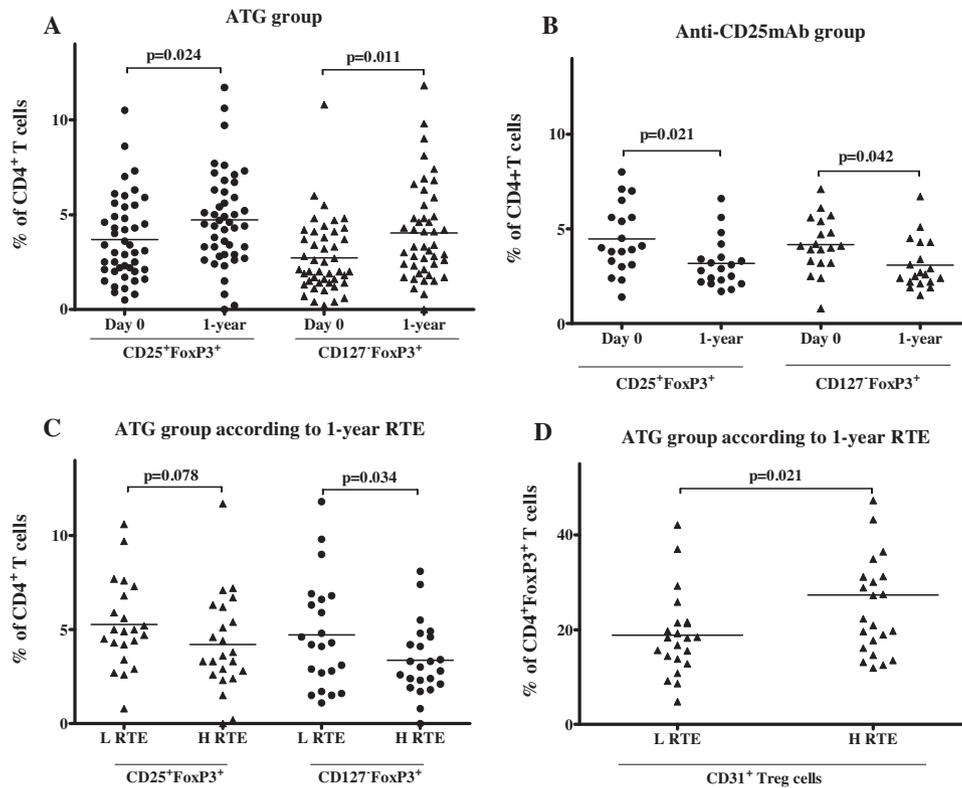
T cell RTL was highly correlated with age ( $r=0.591$ ,  $p<0.001$ ) in a control group of seven healthy donors. By

contrast, there was no correlation between patients' age and RTL ( $r=0.31$ ,  $p=0.181$ ). T cells from end-stage renal disease patients (i.e., at the transplant time) had RTL similar to T cells from 40 to 60 years older healthy donors (data not shown).

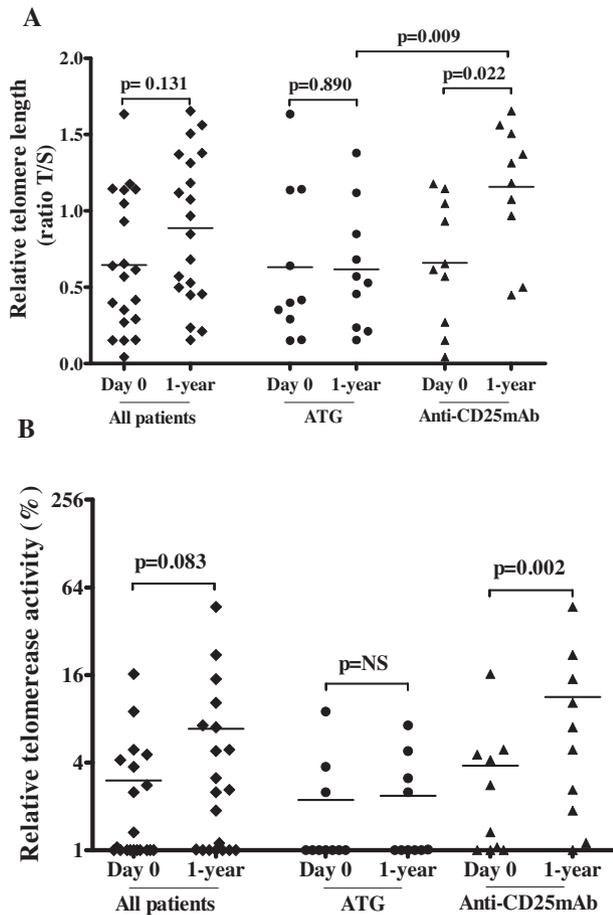
Before transplantation, T cell RTL was similar in the two groups ( $0.63 \pm 0.5$  vs.  $0.66 \pm 0.4$ , in the ATG- and  $\alpha$ -CD25 groups, respectively;  $p=0.890$ ). T cell RTL increased in  $\alpha$ -CD25 recipients during the first year posttransplant ( $0.66 \pm 0.41$  vs.  $1.16 \pm 0.42$ ;  $p=0.022$ ). No variation was observed in ATG recipients. One year after ATG, mean T cell RTL was lower in ATG than in  $\alpha$ -CD25-treated patients ( $0.62 \pm 0.4$  vs.  $1.16 \pm 0.4$  respectively;  $p=0.009$ ) (Figure 5A).

T cell RTA was not correlated with age, neither in a control group of seven healthy donors ( $r=0.11$ ,  $p=0.806$ ), nor in patients ( $r=0.438$ ,  $p=0.206$ ). Mean RTA was lower in end-stage renal patients (patients at time of transplant) than healthy donors ( $2.6 \pm 4\%$  vs.  $48.1 \pm 63.9\%$ , respectively;  $p=0.005$ ).

Pretransplant T cell RTA were comparable in patients having received ATG and in those having received  $\alpha$ -CD25



**Figure 4: Circulating Treg in RTRs after T cell depleting therapy (ATG) versus nondepleting therapy (anti-CD25 mAb).** Evolution of Treg cells according to ATG (A) or  $\alpha$ -CD25 (B) induction therapy. Influence of thymic function at 1 year posttransplant (assessed by RTE; low RTE [L RTE]: RTE  $< 41 \text{ mm}^{-3}$  vs. high RTE [H RTE]: RTE  $> 41 \text{ mm}^{-3}$ ) on Treg (C), and on  $CD31^+$  thymic Treg at 1 year posttransplantation in ATG patients (D). Values are expressed in percentage. Bars represent mean values. Treg were defined as either  $CD25^+FoxP3^+$  or  $CD127^-FoxP3^+CD4^+CD3^+$  T cells.



**Figure 5: Evolution of specific biomarkers of immune senescence in all RTRs and according to induction therapy:** T cell RTL (A) and RTA (B) were assessed at day of transplantation and one year after transplantation according to ATG or  $\alpha$ -CD25 treatment. Values are expressed in T/S\* ratio for RTL and in percentage for RTA. \*T/S ratio for a DNA sample is T, the number of nanograms of the standard Jurkat cells DNA that matches the sample for copy number of the telomere template, divided by S, the number of nanograms of the standard DNA that matches the sample for copy number of the  $\beta$ -globin. Two T/S results were obtained for each sample, and the final reported result for a sample in a given run is the average of the two T/S values. Average T/S is expected to be proportional to the average telomere length per cell.

( $1.6 \pm 2.8\%$  vs.  $3.5 \pm 4.9\%$ , respectively;  $p = 0.109$ ). T cell RTA increased in the first year posttransplant in  $\alpha$ -CD25 patients ( $3.5 \pm 4.9\%$  vs.  $11.3 \pm 14.3\%$ ;  $p = 0.053$ ). No variation in T cell RTA was observed for ATG recipients ( $1.6 \pm 2.8\%$  vs.  $2.0 \pm 2.4\%$ ;  $p = 0.688$ ). One year posttransplant, T cell RTA was lower in ATG than in  $\alpha$ -CD25 recipients ( $2.0 \pm 2.4\%$  vs.  $11.3 \pm 14.3\%$  respectively;  $p = 0.021$ ) (Figure 5B).

**Outcomes**

Patients' outcomes occurring in the 3 year period following renal transplantation are summarized in Table 3.

**Table 3:** Cumulative patient outcomes in a 3-year period of follow-up after renal transplantation

	All patients	ATG	Anti-CD25mAb	p
N	97	62	35	
Acute rejection n. (%)	30 (30.9)	22 (35.4)	8 (22.9)	0.17
Opportunistic infections n. (%)	42 (43.3)	29 (46.8)	13 (37.5)	0.31
CMV disease n. (%)	17 (17.5)	15 (24.1)	2 (5.7)	0.02
Severe bacterial infections n. (%)	34 (35.1)	19 (30.6)	15 (42.9)	0.27
NODAT n. (%)	19 (19.6)	13 (21)	6 (17.1)	0.61
Graft loss n. (%)	3 (3.1)	1 (1.6)	2 (7.4)	0.28
Death n. (%)	3 (3.1)	2 (3.2)	1 (2.9)	0.9

n.: number; NODAT: new onset diabetes mellitus.

**Opportunistic infections and CMV disease:** At transplant, no biomarker was associated with the occurrence of opportunistic infections or CMV disease neither in  $\alpha$ -CD25 patients nor in the whole cohort.

In contrast, in ATG recipients, monivariate analysis associated diabetes with the occurrence of opportunistic infections (RR 5.90, CI95% [1.14–30.61],  $p = 0.019$ ) whereas late stage differentiated CD28<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells frequency at transplant were protective against (RR 0.17, CI95% [0.05–0.58],  $p = 0.004$ ) the occurrence of opportunistic infection.

Multivariate analysis only retained high late stage differentiated CD28<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cell frequency at transplant as protective against opportunistic infections (RR 0.20, CI95% [0.06–0.65], for each increase of 1% of CD28<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>,  $p = 0.007$ ). Late stage differentiated CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cells frequency at transplant (RR 1.03, CI95% [0.99–1.06],  $p = 0.060$ ) was associated with the occurrence of CMV disease in ATG-treated patients. The best threshold to predict CMV disease was 34%. Patients having late stage differentiated CD8<sup>+</sup> T cells frequency > 34% had a threefold increased risk in developing CMV disease (RR 3.33, CI95% [1.00–11.20],  $p = 0.050$ ).

**Acute rejection and graft loss:** At transplant, no biomarker was associated with the occurrence of acute rejection neither in  $\alpha$ -CD25 patients nor in the whole cohort.

In contrast, in monivariate analysis, late stage differentiated CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells frequency at transplant (RR 1.12, CI95% [0.99–1.27],  $p = 0.059$ ) was associated with the occurrence of acute rejection in ATG-treated patients whereas an inverted CD4/CD8 ratio tended to be protective (RR 0.56, CI95% [0.29–1.08],  $p = 0.083$ ). Multivariate analysis only retained a tendency for high late stage differentiated CD4<sup>+</sup> T cell frequency at transplant to be associated with acute rejection (RR 1.12, CI95% [0.99–1.27], for each increase of 1% of CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>,  $p = 0.073$ ).

## Discussion

Our results suggest that ATG delays thymic-dependent T cell reconstitution, increases the frequency of late stage differentiated T cells, and promotes peripheral Treg expansion. Moreover, ATG is associated with persistent low values of RTL and RTA. These data collectively suggest that ATG induces accelerated immune senescence. The effect depends on both thymic involvement and replicative senescence. Consistent with these observations, immune senescence promotes opportunistic infections in ATG-treated patients who are at higher risk of acute rejection. This is, in our knowledge, the first study exploring thymic, bone marrow, and peripheral mechanisms of T cell alterations induced by ATG and their clinical issues in renal transplantation.

We observed a marked posttransplant reduction in thymic output of RTE in ATG-treated patients as compared with those having received  $\alpha$ -CD25 mAb. This could explain the previously described persistent CD4<sup>+</sup> T cell lymphopenia in some RTRs (13). Our results differed from some previous studies. Gurkan et al (14) reported evidence for both thymopoiesis and homeostatic proliferation contributing to immune reconstitution after rATG. More recently, Bouvy et al (15) measured the percentage of RTE at 1, 3, and 6 months after rATG and showed no effect of rATG on thymopoiesis. Several differences with our study are noteworthy. The first study (14) included pediatric patients in whom thymopoiesis could be preserved; the number of patients in Bouvy et al's (15) report was limited (8 ATG and 8 basiliximab) hampering the relevance of their findings; finally, both studies (14,15) explored thymic output during the first 6 months while we studied thymic function one year after transplantation. Hence, a thymic toxicity of ATG remains controversial. CD31 is not a known target antigen for ATG, but other target antigens are expressed by thymic stromal (HLA class II+) or dendritic cells (CD45+) (16,17). These cells play a crucial role in thymocyte maturation and thymic function (17). Alternatively, ATG may deplete bone marrow-derived lymphoid precursors before or during their migration to the thymus. To assess whether the effect of ATG on thymus is direct or indirect, we explored bone marrow hematopoietic progenitors. Our results do not show any significant variation of total circulating CD34<sup>+</sup> hematopoietic precursor cells, but put forward a significant decrease in the lymphoid I-HPC proportion of CD34<sup>+</sup> cells after ATG. Moreover, the positive correlation between the variation of lymphoid progenitors ( $\Delta$ PG-L) and RTE ( $\Delta$ RTE) in patients having received ATG suggests that ATG could act upstream of the thymus on lymphoid progenitor cells. This hypothesis reconciles the apparently contradictory results showing thymus inaccessibility for ATG (6,7) and reduced thymic function after ATG. To ascertain a toxic effect of ATG on bone marrow progenitor cells, which remains a rare detectable circulating event, we probably need to explore more patients with the use of fresh samples to enhance analysis sensitivity and to shorten the delay following

induction therapy to detect early variation in hematopoietic precursor cells.

Circulating Treg increase in patients having received ATG while decreasing in those having received an  $\alpha$ -CD25 mAb-based induction therapy. Bluestone et al demonstrated that basiliximab causes a transient loss of both FOXP3<sup>+</sup> and FOXP3<sup>-</sup> CD25<sup>+</sup> T cells (18), while Wang et al showed that Treg function is not influenced by short-term basiliximab treatment (19). Treg expansion has already been reported after ATG therapy. Gurkan et al have described a natural Treg expansion earlier after lymphocyte depletion whereas peripheral Treg expansion occurred six months after transplantation (14). Conversely, Bouvy et al have recently shown that the repopulation of Treg after rATG and basiliximab therapy was the result of homeostatic proliferation and not thymopoiesis (20). This is consistent with our own results: the increase in Treg is rather dependent on ATG-induced peripheral expansion, since CD31<sup>+</sup> Treg decreased one year after ATG. This phenomenon could favor the protective role of ATG against acute rejection, although Treg function after transplantation has not been studied *in vivo*. Bouvy et al demonstrated an *in vitro* suppressive function of Treg whatever the induction therapy but no difference in the occurrence of biopsy-proven acute rejection between ATG and basiliximab in 33 consecutive transplanted patients (20). This Treg expansion could also be interpreted as a compensatory mechanism against the expansion of late stage differentiated T cells. Alternatively, Treg expansion, *per se*, may be a component of ATG-induced immune senescence. Indeed, Gregg et al (21) and Wang et al (9) recently reported that Treg expansion was associated with immune senescence contributing to the aging-related decline of immune responses and leading to the higher risk of immune-mediated diseases, cancer or infections in elderly individuals.

Pretransplant patients have shorter T cell telomere length and lower telomerase activity compared to healthy donors, suggesting that end stage renal disease (ESRD) induced accelerated immune senescence. Carrero et al reported similar results in hemodialysis patients (22). Premature immune senescence in ESRD patients may be related to oxidative stress and chronic inflammation status. T cell RTL and RTA increase in  $\alpha$ -CD25 mAb treated patients but not in ATG recipients. This suggests that renal function recovery may induce a partial reversion of immune senescence. The restoration of RTA in  $\alpha$ -CD25 mAb recipients could explain the expansion of RTL in these patients. The absence of increase in RTL and RTA in ATG-treated patients may be due to ATG-induced altered thymic output. Yet, ATG-treated patients did not show shorter T cell telomere length or lower T cell RTA 1 year posttransplant. Indeed, we already observed very low values for T cell RTL and RTA in most patients before transplantation and thus, the detection of a significant decrease after ATG is difficult to attest due to the sensitivity of both techniques. Another reason

might be a late time point of T cell RTL and RTA measurement in those patients.

We showed that higher CD28<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cell frequency at transplant tended to be associated with a decreased risk of opportunistic infections, and that a higher CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T cell frequency correlates with a higher risk of CMV disease. These results were only observed in ATG-treated patients suggesting that ATG increases the consequences of these immune alterations. These clinical correlates are consistent with the effects of ATG on immune profile suggesting ATG-induced accelerated immune senescence. Immune senescence is associated with an increased risk of infections. Obviously, less is known on the impact of immune senescence on allo-immune responses. An expansion of CD28<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> T cell has been previously described after allogeneic transplantation and associated with better graft outcomes (23). On the contrary, Yap et al recently identified the expansion of terminally differentiated effector memory CD8<sup>+</sup> T cells as a biomarker of long-term graft dysfunction (24). Our study demonstrated that high CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cell frequency at transplant was associated with acute rejection. Functional features of terminally differentiated T cells have been widely explored in the elderly (9,10) and are now well described in younger adults exposed to several diseases. Chronic inflammation or latent infections induce repeated antigenic stimulation of T cells, causing them to proliferate and age more rapidly which could, at least partly, explain what we observed after ATG induction. Hence, peripheral reconstitution and CMV reactivation could participate to this phenomenon. CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cell are well-known markers of latent CMV infection and indirect markers of a reduced T cell repertoire diversity, enhancing the risk of infections (10). More recently, CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cell have been involved in the pathogenesis of inflammatory and auto-immune diseases, such as rheumatoid arthritis, chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system, inflammatory bowel disease, or atherosclerosis (25). It has been reported that CD28<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> T cells express cytotoxic molecules, including perforin, granzyme, and IFN- $\gamma$  (26), as well as adhesion molecules that enhance their capacity to infiltrate inflamed tissues (27). These capacities may explain the exclusive association we have found between acute rejection and CD28<sup>-</sup>CD57<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cells.

Taken together, our results show that pretransplant immune senescence by increasing late differentiated CD4<sup>+</sup> T cells may modulate the risk of opportunistic infections and acute rejection in ATG-treated patients. This suggests that these patients might not benefit from ATG. Yet, these findings need further confirmation. Future studies should assess whether these biomarkers could help in determining the benefit/risk ratio of ATG. Larger studies with clinical end-points are required to obtain relevant thresholds.

ATG may contribute, through central and peripheral mechanisms, to accelerated immune senescence in RTRs. Concordant clinical consequences are observed in patients with pretransplant features of immune senescence. Considering pretransplant immune profile may help to select those patients who may benefit from ATG.

## Acknowledgments

Supported by grants from the Fondation Transplantation, the PHRC 2005 and 2011 (to DD), the Fondation de France (Appel d'offre "Maladies Cardiovasculaires" 2007 #2007 001859 to PS), the DHOS/INSERM/INCa (Appel d'offre Recherche Translationnelle 2008 to DD and PS) and the APICHU 2010 (to JB), from the Agence Nationale de la Recherche (Labex LipSTIC, ANR-11-LABX-0021) and the Région de Franche-Comté (LipSTIC to PS). TC, CR and JB received financial support from the Fondation Transplantation (#ET-031211 and #ET-050320, respectively). This work is a part of the RIALTO (Research in Immunology of Atherosclerosis after Transplantation) program.

## Disclosure

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

## References

1. Bonnefoy-Berard N, Vincent C, Revillard JP. Antibodies against functional leukocyte surface molecules in polyclonal antilymphocyte and antithymocyte globulins. *Transplantation* 1991; 51: 669–673.
2. Rebellato LM, Gross U, Verbanac KM, Thomas JM. A comprehensive definition of the major antibody specificities in polyclonal rabbit antithymocyte globulin. *Transplantation* 1994; 57: 685–694.
3. Müller TF, Grebe SO, Neumann MC, et al. Persistent long-term changes in lymphocyte subsets induced by polyclonal antibodies. *Transplantation* 1997; 64: 1432–1437.
4. Ducloux D, Courivaud C, Bamoulid J, et al. Prolonged CD4 T cell lymphopenia increases morbidity and mortality after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol* 2010; 21: 868–875.
5. Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. *J Pathol* 2007; 211: 144–156.
6. Préville X, Flacher M, LeMauff B, et al. Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model. *Transplantation* 2001; 71: 460–468.
7. Ruzek MC, Neff KS, Luong M, et al. *In vivo* characterization of rabbit anti-mouse thymocyte globulin: A surrogate for rabbit anti-human thymocyte globulin. *Transplantation* 2009; 88: 170–179.
8. Lewin SR, Heller G, Zhang L, 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: 2235–2242.
9. Wang L, Xie Y, Zhu LJ, Chang TT, Mao YQ, Li J. An association between immunosenescence and CD4(+)CD25(+) regulatory T cells: A systematic review. *Biomed Environ Sci* 2010; 23: 327–332.

10. Derhovanessian E, Maier AM, Beck R, et al. Hallmark features of immunosenescence are absent in familial longevity. *J Immunol* 2010; 185: 4618–4624.
11. Weng N. Telomeres and immune competency. *Cur Opin Immunol* 2012; 24: 1–6.
12. Kohler S, Thiel A. Life after the thymus: CD31+ and CD31– human naive CD4+ T-cell subsets. *Blood* 2009; 113: 769–774.
13. Ducloux D, Carron PL, Racadot E, et al. CD4 lymphocytopenia in long-term renal transplant recipients. *Transplant Proc* 1998; 30: 2859–2860.
14. Gurkan S, Luan Y, Dhillon N, et al. Immune reconstitution following rabbit antithymocyte globulin. *Am J Transplant* 2010; 10: 2132–2141.
15. Bouvy AP, Kho MM, Klepper M, et al. Kinetics of homeostatic proliferation and thymopoiesis after rATG induction therapy in kidney transplant patients. *Transplantation* 2013; 96: 904–913.
16. Mohty M. Mechanisms of action of antithymocyte globulin: T-cell depletion and beyond. *Leukemia* 2007; 21: 1387–1394.
17. Williams KM, Mella H, Lucas PJ, Williams JA, Telford W, Gress RE. Single cell analysis of complex thymus stromal cell populations: Rapid thymic epithelia preparation characterizes radiation injury. *Clin Trans Sci* 2009; 2: 279–285.
18. Bluestone JA, Liu W, Yabu JM, et al. The effect of costimulatory and interleukin 2 receptor blockade on regulatory T cells in renal transplantation. *Am J Transplant* 2008; 8: 2086–2096.
19. Wang Z, Shi BY, Qian YY, Cai M, Wang Q. Short-term anti-CD25 monoclonal antibody administration down-regulated CD25 expression without eliminating the neogenetic functional regulatory T cells in kidney transplantation. *Clin Exp Immunol* 2009; 155: 496–503.
20. Bouvy AP, Klepper M, Kho MM, et al. The impact of induction therapy on the homeostasis and function of regulatory T cells in kidney transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 2014; 29: 1587–1597.
21. Gregg R, Smith CM, Clark FJ, et al. The number of human peripheral blood CD4+ CD25high regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 540–546.
22. Carrero JJ, Stenvinkel P, Fellström B, et al. Telomere attrition is associated with inflammation, low fetuin-A levels and high mortality in prevalent haemodialysis patients, Telomere attrition is associated with inflammation, low fetuin-A levels and high mortality in prevalent haemodialysis patients. *J Int Med* 2008; 263: 302–312.
23. Strioga M, Pasukoniene V, Characiejus D. CD8 + CD28– and CD8 + CD57+ T cells and their role in health and disease. *Immunology* 2011; 134: 17–32.
24. Yap M, Boeffard F, Clave E, et al. Expansion of highly differentiated cytotoxic terminally differentiated effector memory CD8+ T cells in a subset of clinically stable kidney transplant recipients: A potential marker for late graft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2014; 25: 1856–1868.

25. Broux B, Markovic-Plese S, Stinissen P, Hellings N. Pathogenic features of CD4 + CD28–T cells in immune disorders. *Trends Mol Med* 2012; 18: 446–453.
26. Miyazaki Y, Iwabuchi K, Kikuchi S, et al. Expansion of CD4 + CD28– T cells producing high levels of interferon- $\gamma$  in peripheral blood of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2008; 8: 1044–1055.
27. Thewissen M, Somers V, Hellings N, Fraussen J, Damoiseaux J, Stinissen P. CD4 + CD28null T cells in autoimmune disease: Pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. *J Immunol* 2007; 179: 6514–6523.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

**Table S1:** Patient characteristics.

**Table S2:** Details concerning monoclonal antibodies used in the study.

**Figure S1: Circulating CD34<sup>+</sup> HPCs.** (A) Representative example of CD34 and CD45 staining to identify HPCs in PBMC samples. (B) Representative staining examples of CD10 CD38 CD117 and CD45RA on CD34<sup>+</sup> cells; lymphoid-HPCs exhibit a CD38<sup>+</sup>CD117<sup>–</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup> HPC phenotype while myeloid-HPCs present a CD38<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>CD45RA<sup>–</sup>CD10<sup>–</sup> HPC phenotype.

**Figure S2: Circulating recent thymic emigrants (RTE) in renal transplant recipients according to patients' age and variation of RTE ( $\Delta$  RTE) according to induction therapy and RTE cell population at the transplant time (day 0).** (A) Evolution of RTE cell populations according to the age of patients (mean age = 50 years) between the transplant time (day 0) and 1 year posttransplant (1 year). (B) Correlation between RTE cell population and the patient age. (C) Variation of RTE cell population ( $\Delta$  RTE) between the transplant time and 1 year posttransplant according to induction therapy. (D) Variation of RTE cell population ( $\Delta$  RTE = [RTE at one year after transplantation – RTE at time of transplantation]/RTE at time of transplantation) between the transplant time and 1 year posttransplant according to RTE cell population at the transplant time (day 0). Values are expressed in percentage. Bars represent mean values. Only significant p values between groups are represented.

« supplementary data » concernant l'article précédent:

## **METHODS**

### **Description of the ORLY-EST study**

The ORLY-EST study is a prospective observational study designed to assess immunologic factors predictive of post-transplant atherosclerotic events. Four French transplant centers (Besançon, Nancy, Reims, Strasbourg) participate in this study. To date, 603 patients have been enrolled. Samples were collected and sent to the Biomonitoring Platform (CIC-BT506, EFS Besançon, France) for processing and storage.

### **Immunophenotype of analyzed T cell subsets**

Thymic function was assessed through RTE cell count, defined as CD62L<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>/CD45RO<sup>-</sup>CD31<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T cells. Memory and late stage differentiated T cells were defined by the following phenotypes: CD45RO<sup>+</sup>, CD28<sup>-</sup>, CD57<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> CD3<sup>+</sup>CD8(4)<sup>+</sup>. Naive and effector T cells were defined by the following phenotypes: CD45RA<sup>+</sup>, CD28<sup>+</sup>, or CD57<sup>-</sup>CD28<sup>+</sup> CD3<sup>+</sup>CD8(4)<sup>+</sup>. Treg were defined by the following phenotypes: CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> and CD127<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>. CD31<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells were defined as thymic-derived Treg.

### **Cell sorting**

Frozen PBMCs were thawed, washed 2 times with PBS. T cells were isolated by negative immunomagnetic cell sorting using a human pan T cell isolation kit (Miltenyi Biotec, Paris, France) with an autoMACS separator pro (Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's recommendations. After release of CD3<sup>+</sup> negative fraction, CD3<sup>+</sup> positive fraction divided in 2 aliquots, one for the RTL and one for the RTA assays, respectively. Sorted cell populations were confirmed to be > 91% pure.

### **DNA extraction**

Genomic DNA of sorted T cells was extracted using QIAGEN FlexiGene DNAKit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol. A Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Labtech, Palaiseau, France) was used to quantify genomic DNA. Genomic DNA was stored in TE buffer (10 mMTris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5) at 4°C at a concentration of < 10 ng/μL. DNA stocks were diluted into pure water before starting real-time PCR runs described thereafter.



### **Telomerase activity measurement (RTA)**

Telomerase activity was examined using the Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA PLUS kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. RTA was determined for sorted T cell, Jurkat cell (high RTA) and human fibroblasts (low RTA). After incubation for 30 minutes on ice, cell lysates were centrifuged during 20 minutes at 4°C and 3 µL of cell extract (corresponding to  $1.5 \times 10^3$  cell equivalents) was used for each telomeric repeat PCR amplification reaction and 3 µL of inactivated cell lysate ( $1.5 \times 10^3$  cells warmed up for 10 minutes at 85°C) were used for TRAP reaction according to the manufacturer's recommendation. Each TRAP reaction was performed with amplification of an internal control from the kit to validate the absence of a PCR inhibitor. The PCR amplification product was then denatured and hybridized to digoxigenin-labeled detection probes. The resulting products were immobilized via the biotin label to streptavidin-coated 96-well microplate. Immobilized amplicons were then detected with an antibody against digoxigenin that is conjugated to HRP and the sensitive peroxidase substrate, 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. After incubation for 15 minutes at room temperature, stop reagent was added and sample values were measured as absorbance (OD) at 450 nm read against the blank value. RTA was calculated according to the standards as followed:  $RTA = [(OD \text{ sample} - OD \text{ negative standard}) / OD \text{ kit control sample}] / [(OD \text{ positive standard} - OD \text{ negative standard}) / OD \text{ kit control sample}]$ .

### **Outcomes**

#### ***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.

### ***Acute rejection***

Acute rejection was considered in the presence of serum creatinine elevation. All episodes of treated acute rejection and biopsy-proven acute rejection were considered separately. Acute rejection was defined according to the Banff classification (2). Systematic biopsies were not performed at any time of the study period.

### ***Severe bacterial infections***

Diagnosis of severe bacterial infections required bacterial infection-related hospitalization.

### ***CMV disease***

Diagnosis of CMV disease required the presence of viral replication and a treatment by ganciclovir.

### ***Opportunistic infections***

Occurrence of opportunistic infections (*Pneumocystis carinii*, tuberculosis, Epstein-Barr virus, toxoplasmosis, aspergillosis, zoster infection, *Legionella pneumophila*) was recorded.

### ***New onset diabetes mellitus (NODAT)***

NODAT was defined according to the 2003 International Consensus Guidelines on Diabetes Mellitus in Transplantation (3). 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  $\geq 11.1$  mmol/L, or a fast plasma glucose (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.

### ***Graft Loss***

Graft loss was defined as a continuous recourse to dialysis above a 3 months period.

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

## RESULTS

### **Thymus-derived T cells decrease after treatment with anti-thymocyte globulins.**

Because thymic function depends on subject's age (4), we determined whether RTE was influenced by patient's age. Patients were split into 2 groups according to the median age (50 y-old). The mean percentage of RTE (*mpRTE*) and the TREC number (TREC) were lower in older patients as compared with younger (*mpRTE*: 25.4 ± 13% vs. 30.2 ± 13% respectively,  $p=0.026$  (**Figure S2A**) and TREC: 491 ± 3157 vs. 2959 ± 3202/150 000 CD3+ T cells,  $p=0.031$  (**data not shown**)). There was a negative correlation between patients' age and both *mpRTE* and TREC at the time of transplantation (*mpRTE*:  $r=-0.24$ ,  $p=0.0183$  (**Figure S2B**) and TREC:  $r=-0.42$ ,  $p=0.0005$ ).

The variation in RTE ( $\Delta$ RTE) was calculated as: (post-transplant RTE - pre-transplant RTE)/pre-transplant RTE. Patients having received ATG have a negative  $\Delta$ RTE whereas the  $\alpha$ -CD25 mAb control group was characterized by a positive  $\Delta$ RTE with a significant difference between both groups ( $-49.66 \pm 65.82\%$  vs.  $+39.94 \pm 108.16\%$ ,  $p<0.0001$ ) (**Figure S2C**).

Pre-transplant CD31<sup>+</sup> RTE values of patients having received ATG were split into two classes separated by the median (139/mm<sup>3</sup>). Patients with higher pre-transplant RTE had a greater decrease in RTE after ATG than those with lower pre-transplant RTE ( $-79.60 \pm 27.93\%$  vs.  $20.70 \pm 78.42\%$ ;  $p=0.0003$ ) (**Figure S2D**). The variation in RTE was inversely related to pre-transplant RTE value ( $r= -0.51$ ;  $p=0.0003$ ) (**data not shown**). Similar results were obtained when thymic function was assessed by TREC analysis (**data not shown**).

## SUPPLEMENTARY TABLES

**Table S1:** Patient characteristics

	Day 0	Year 1
n	<b>97</b>	<b>97</b>
Age, median (range)	<b>49 (21-74)</b>	<b>50 (22-75)</b>
Sex ratio	<b>1.53</b>	<b>1.53</b>
Donor source (DD/LD)		<b>97/0 (100)</b>
ATG n. (%)		<b>62 (63.5)</b>
Anti-CD25 n. (%)		<b>35 (36.5)</b>
Corticosteroid n.(%)		<b>85 (88.5)</b>
Tacrolimus n. (%)		<b>66 (68.8)</b>
Ciclosporine n. (%)		<b>26 (27.1)</b>
Sirolimus/Everolimus n. (%)		<b>3 (3.1)</b>
Mycophenolate mofetil/Mycophenolic acid n. (%)		<b>92 (95.8)</b>
Azathioprine n. (%)		<b>1 (1)</b>
CD4 <sup>+</sup> T cells < 300/mm <sup>3</sup> n. (%)	<b>7 (7.3)</b>	<b>24 (25)</b>
CD4/CD8 T-cell ratio < 1 n. (%)	<b>10 (10.4)</b>	<b>27 (28.1)</b>
CMV exposure n. (%)	<b>48 (50)</b>	<b>50 (52.1)</b>

**n.:** number

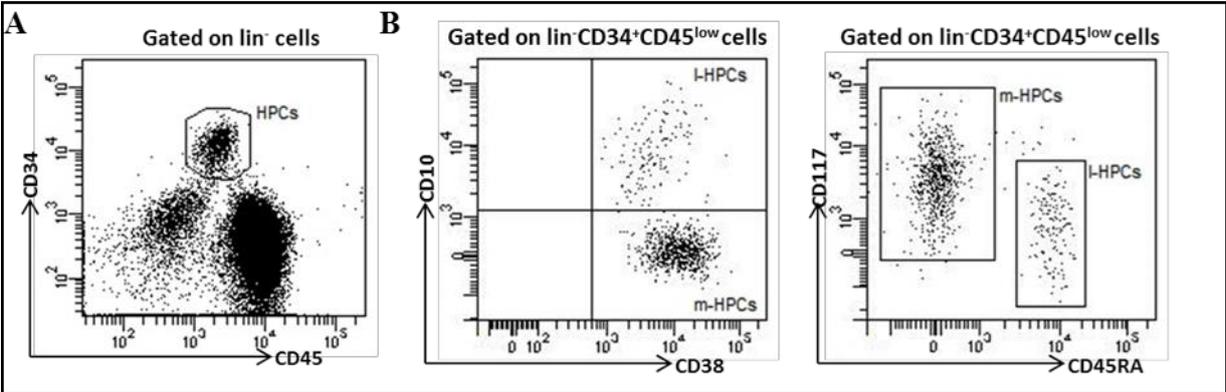
**DD:** deceased donor

**LD:** living donor

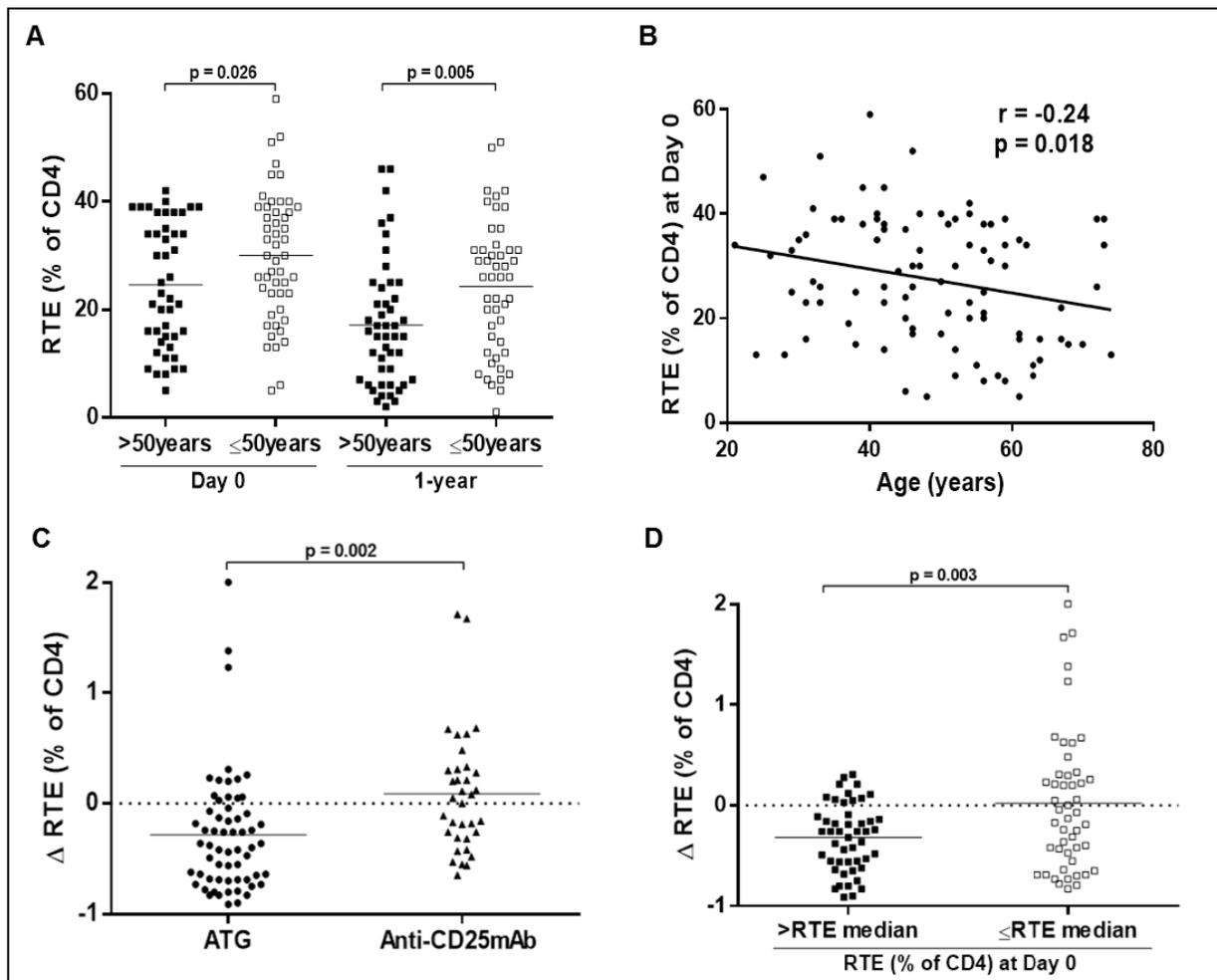
**Table S2:** Details concerning monoclonal antibodies used in the study

Antibodies	clone number	Providers
Allophycocyanin (APC)-Cyanin (Cy) 7 conjugated CD3	HIT3a	Biolegend, (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France)
Pacific blue conjugated CD4	RPA-T4	Biolegend
Phycoerythrin (PE)-Cy 7 conjugated CD8	RPA-T8	Biolegend
PE-conjugated CD25	4E3	Miltenyi Biotec, (Paris, France)
PerCP-Cy 5.5 conjugated CD28	CD28.2	Biolegend
PE-Cy7 conjugated CD31	WM59	Biolegend
Fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugate CD57	NC1	Beckman Coulter, (Villepinte, France)
APC or FITC-conjugated CD45RA	HI100	BD Biosciences, (Le Pont de Claix, France)
ECD-conjugated CD45RO	UCHL1	Beckman Coulter
PE-conjugated CD62L	Dreg56	BD Biosciences
PerCP-Cy5.5 conjugated CD127	HCD127	Biolegend
Alexa Fluor® 647 conjugated anti-FoxP3 mAb	259D	Biolegend
FITC-conjugated LIN (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56)	SK7, 3G8, SJ25C1, L27, MΦP9, NCAM16.2	BD Biosciences
PE-conjugated CD10	HI10a	BD Biosciences
PerCP-Cy 5.5 conjugated CD34	8G12	BD Biosciences
PE-Cy7 conjugated CD117	104D2D1	Beckman Coulter
Brilliant Violet (BV) 421-conjugated CD38	HIT2	Biolegend
Horizon (H)-V500 conjugated CD45	HI30	BD Biosciences

**SUPPLEMENTARY FIGURES**



**Figure S1: Circulating CD34<sup>+</sup> HPCs.** Representative example of CD34 and CD45 staining to identify HPCs in PBMC samples (A). Representative staining examples of CD10 CD38 CD117 and CD45RA on CD34<sup>+</sup> cells; lymphoid-HPCs exhibit a CD38<sup>+</sup>CD117<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>CD10<sup>+</sup> HPC phenotype while myeloid-HPCs present a CD38<sup>+</sup>CD117<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>CD10<sup>-</sup> HPC phenotype (B).



**Figure S2: Circulating recent thymic emigrants (RTE) in renal transplant recipients according to patients' age and variation of RTE ( $\Delta$  RTE) according to induction therapy and RTE cell population at the transplant time (day 0).** Evolution of RTE cell populations according to the age of patients (mean age = 50 years) between the transplant time (day 0) and 1-year post-transplant (year-1) (**A**). Correlation between RTE cell population and the patient age (**B**). Variation of RTE cell population ( $\Delta$  RTE) between the transplant time and 1-year post-transplant according to induction therapy (**C**). Variation of RTE cell population ( $\Delta$  RTE = RTE at one year after transplantation - RTE at time of transplantation)/RTE at time of transplantation) between the transplant time and 1-year post-transplant according to RTE cell population at the transplant time (day 0) (**D**). Values are expressed in percentage. Bars represent mean values. Only significant p values between groups are represented.

## References of supplementary text

1. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Research* 2002;30: e47.
2. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, Castro MC, David DS, David-Neto E, Bagnasco SM, Cendales LC, Cornell LD, Demetris AJ, Drachenberg CB, Farver CF, Farris AB 3rd, Gibson IW, Kraus E, Liapis H, Loupy A, Nickeleit V, Randhawa P, Rodriguez ER, Rush D, Smith RN, Tan CD, Wallace WD, Mengel M; Banff meeting report writing committee. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant* 2014;14: 272-83.
3. Davidson J, Wilkenson 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. *Transplantation* 2003;75[Suppl]: SS3–SS24.
4. Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. *J Pathol* 2007;211: 144–156.

## **1. Discussion de l'article**

Les GALP ont un impact prolongé sur le système immunitaire chez certains patients. Les résultats de l'article confirment l'hypothèse d'un effet majeur des GALP sur la perte de la fonction thymique et l'existence d'une reconstitution immunitaire thymo-indépendante par prolifération homéostatique après déplétion des LT. En effet, nous avons retrouvé une augmentation des Treg périphériques, une inversion du rapport CD4/CD8, une expansion des LT de phénotypes sénescents CD28<sup>-</sup> après GALP. Le rôle du statut CMV apparaît comme un élément amplificateur de ce phénomène notamment sur l'expansion de LT CD28<sup>-</sup> et l'inversion du rapport CD4/CD8. Les patients en attente de transplantation rénale ont des télomères plus courts par rapport aux donneurs sains (fonction rénale normale) du même âge. Le traitement d'induction joue un rôle déterminant dans l'évolution des marqueurs spécifiques d'immunosénescence après la transplantation rénale. Alors que la transplantation rénale est accompagnée d'une réversibilité des marqueurs d'immunosénescence chez les patients traités par Ac anti-CD25 (augmentation de la longueur relative des télomères et de l'activité télomérase à un an), cet effet semble absent chez les patients traités par GALP. Cette augmentation des télomères est concomitante de l'apparition d'une activité télomérase initialement absente.

Les patients porteurs de maladie rénale chronique au stade d'IRC sévère, de dialyse et porteur d'un transplant rénal présentent des altérations immunologiques du compartiment T ayant les caractéristiques d'une immunosénescence prématurée [ces caractéristiques sont résumées dans une revue en français mise en annexe de ce manuscrit ; revue, (Bamoulid *et al.* 2015)]. Cependant, l'ensemble des résultats obtenus montrent que l'étude de la sénescence après transplantation et notamment après utilisation de GALP, ainsi que les mécanismes à l'origine de cette sénescence doit être poursuivie. Particulièrement, les mécanismes à l'origine de la diminution de la thymopoïèse restent incertains. Certaines GALP sont issues de l'immunisation de lapins par des extraits de thymus humain amenant à la production d'anticorps dirigés contre les cellules épithéliales thymiques (THYMOGLOBULINE). Ces cellules sont essentielles pour soutenir une thymopoïèse de bonne qualité [revue, (Anderson *et al.* 2012)]. L'hypothèse d'une éventuelle thymotoxicité directe des GALP sur des thymus humain *in vivo* reste difficile à explorer d'un point de vue éthique et difficile à extrapoler d'un point

de vue technique. Dans un modèle murin, Ruzek *et al* ont démontré que les GALP, *in vitro*, induisaient une déplétion thymocytaire mais, qu'il n'y avait pas de déplétion thymocytaire *in vivo* quelle que soit la dose administrée, suggérant une accessibilité diminuée des anticorps au thymus et une absence d'effet toxique direct des GALP sur le thymus (Ruzek *et al.* 2009). Dans un modèle de primates non humains, Preville *et al* ont retrouvé une déplétion lymphocytaire T secondaire aux GALP, dose-dépendante et périphérique comprenant le sang et les tissus lymphoïdes périphériques, mais pas le thymus (Preville *et al.* 2001). Chez l'homme, l'analyse fonctionnelle de l'activité thymique peut-être évaluée par imagerie fonctionnelle (Tomographie par Emission de Positron couplée à un scanner, TEP-scan). Il n'a pas été mis en évidence de corrélation évidente entre l'hyperplasie thymique et la reconstitution LT CD4+ à partir de cellules naïves (Sun *et al.* 2015).

Nous avons confirmé que les GALP ont un impact sur la thymopoïèse. La numération et la proportion de RTE diminuent significativement un an après transplantation dans le groupe GALP. Nous avons étudié les mécanismes à l'origine de ce phénomène. Dans notre travail, la diminution de la fréquence des PG-L chez les patients du groupe GALP témoignerait d'un effet toxique des GALP en amont du thymus sur les ressources de populations progénitrices issues de la moelle osseuse. Nous avons observé une corrélation positive entre la variation des taux de PG-L et celle des RTE entre J0 et un an chez les patients du groupe GALP. L'activité thymique serait donc dépendante de l'activité médullaire chez les patients du groupe GALP. L'augmentation de la proportion de PG-M par rapport à celle des PG-L est également un effet décrit dans l'immunosénescence (Rundberg Nilsson *et al.* 2016). Avec l'âge, les CSH ont une différenciation réduite vers la lignée lymphoïde (Young *et al.* 2016). La moelle osseuse des souris âgées compte plus de cellules progénitrices myéloïdes, au détriment des cellules progénitrices lymphoïdes (Sun *et al.* 2012). L'augmentation des cellules myéloïdes est un autre marqueur du vieillissement du système immunitaire, suggérant que les GALP pourraient accélérer ce phénomène chez le transplanté rénal. Cependant, l'étude des CSH a été réalisée sur PBMC décongelées. C'est pourquoi dans l'étude GABII (présentée ci-après) des numérations de cellules CSH à partir de sang total utilisant des billes, ont été réalisées pour la numération des sous-populations lymphocytaires du sang périphérique ce qui permet d'obtenir des résultats plus précis.

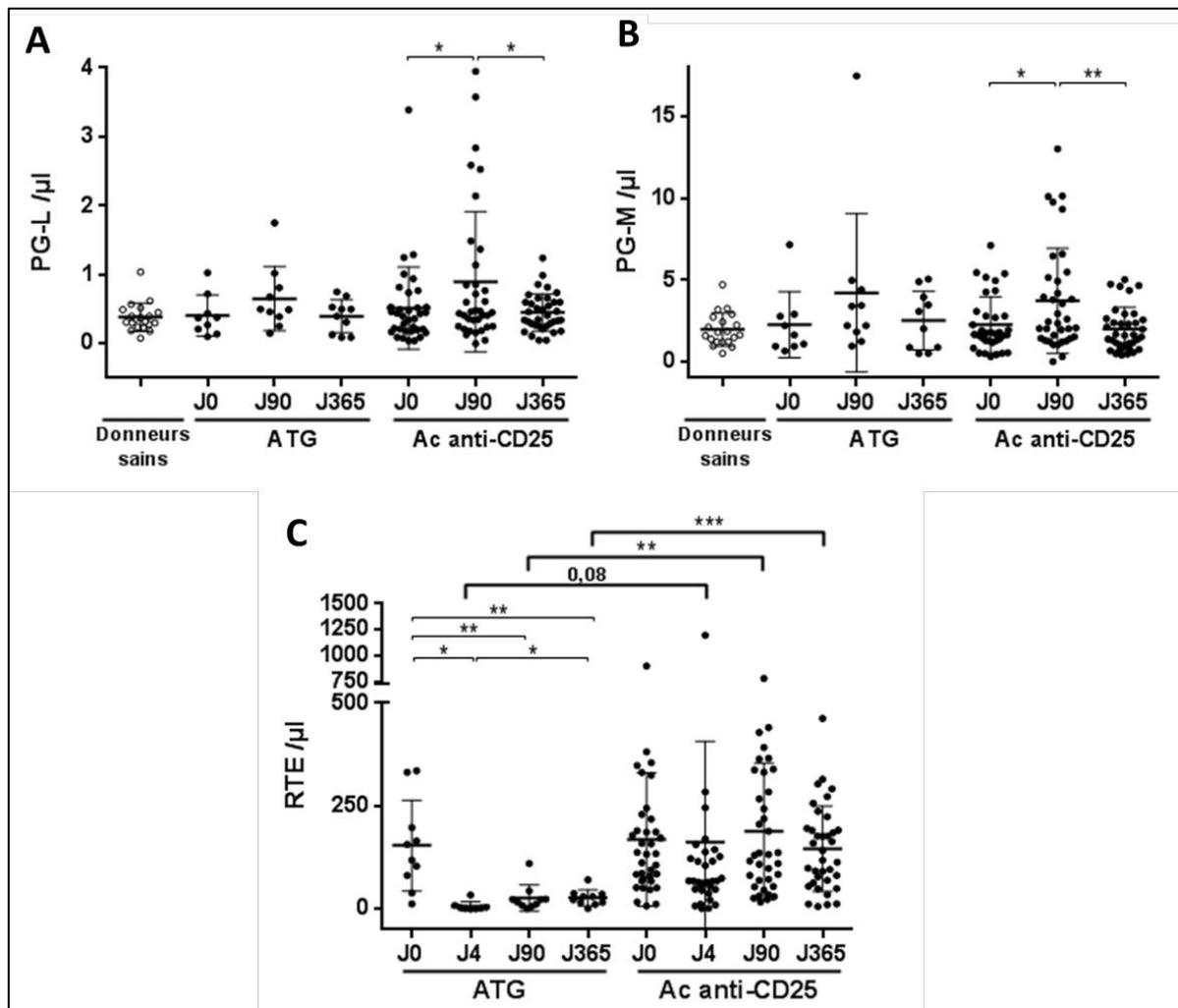
L'étude GABII (Globulines Anti-lymphocytaires polyclonales & Barrière Immunitaire Intestinale après transplantation rénale) est une étude prospective d'observation initiée en 2014 et conçue pour évaluer l'implication du microbiote et de la TBD dans l'activation de l'inflammation chronique après GALP en transplantation rénale. C'est une étude monocentrique pour laquelle les inclusions ont été réalisées au centre de transplantation du CHRU de Besançon. Les prélèvements biologiques et une analyse des sous-populations lymphocytaires ont été réalisés le jour de la transplantation (J0), entre 4 et 7 jours (J4), à 3 mois (J90) et un an après la transplantation (J365). Le recueil des événements cliniques porte sur une période de 1 an. Une banque de prélèvements biologiques est conservée (cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC), sérum et selles) au Centre de Ressources Biologiques de Dijon pour les éventuelles analyses complémentaires. A ce jour, 68 patients ont été inclus mais 3 sont décédés et 4 sont retournés en dialyse. Des échantillons de sang ont été collectés et envoyés à la plateforme de biomonitoring (CIC-BT506, EFS Besançon, France) pour traitement et stockage. Aujourd'hui, tous les patients ont atteints leur suivi à 3 mois mais seulement 46 patients vivants et ayant conservés leurs greffons ont atteint leur suivi à un an. Les caractéristiques de ces patients sont décrites dans le **tableau 5** ci-après.

**Tableau 5 : Description des caractéristiques des patients de la cohorte GABII.**

Variable	Patients de l'étude GABII ayant atteint le suivi à un an		
n	46		
Age, moyenne en années	50		
Sexe ratio (H/F)	1,88		
IMC (kg/m <sup>2</sup> ), moyenne	25,7		
Tabagisme actif n. (%)	7 (15,2)		
Dialysés n. (%)	39 (84,8)		
Durée de la dialyse, moyenne en mois	32,1		
Première transplantation rénale n. (%)	39 (84,8)		
Presence d'anticorps anti-HLA n. (%)	13 (28,3)		
Exposition au CMV n. (%)	33 (71,7)		
Diabète avant transplantation n. (%)	7 (15,2)		
Anti-CD25 n. (%)	36 (78,3)		
ATG n. (%)	10 (21,7)		
Corticostéroïdes n. (%)	46 (100)		
Tacrolimus n. (%)	43 (93,5)		
Ciclosporine n. (%)	0 (0)		
Sirolimus/Everolimus n. (%)	1 (2,2)		
Mycophenolate mofetil n. (%)	46 (100)		
Rapport CD4/CD8 <1 n. (%)	7 (15,2)		
Variable	J0 à J4	J4 à J90	J90 à J365
Statines n. (%)	41 (89,1)	40 (87,0)	40 (87,0)
Bactrim n. (%)	16 (100)	43 (93,5)	34 (74,0)
Pentacarinat n. (%)	1 (2,2)	13 (28,3)	19 (41,3)
Rejet Aigu n. (%)	1 (2,2)	2 (4,3)	ND
Diabète post-transplantation n. (%)	5 (10,9)	5 (10,9)	ND
Maladie à CMV n. (%)	0 (0)	0 (0)	ND
Infections opportunistes n. (%)	0 (0)	1 (2,2)	ND
Infections bactériennes sévères n. (%)	14 (30,4)	17 (37,0)	24 (52,2)
Antibiothérapie n. (%)	12 (26,1)	15 (32,6)	22 (73,8)
Diarrhées sévères n. (%)	1 (2,2)	6 (13,0)	7 (15,2)
Événements éthéromatheux n. (%)	1 (2,2)	0 (0)	ND
Rapport CD4/CD8 <1 n. (%)	6 (13,0)	8 (17,4)	10 (21,7)

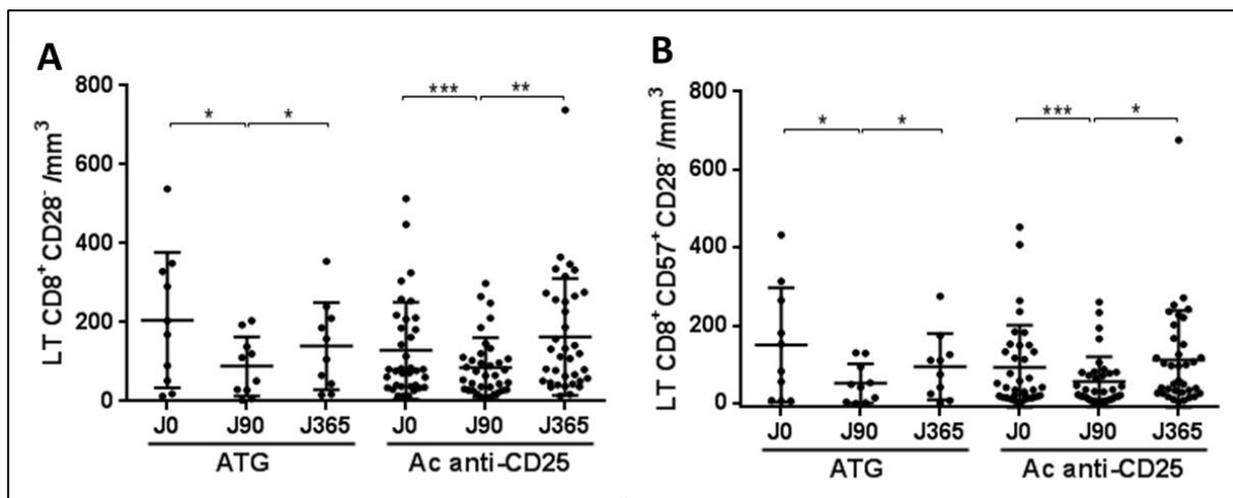
ND= Non déterminé

Les progéniteurs ont été dosés sur la cohorte GABII sur des prélèvements de sang total à J0, J90 et J365 uniquement et les analyses ont été réalisées sur les 46 premiers patients inclus ayant atteints leur suivi à un an. Nous n'avons pas retrouvé de différence de proportions de sous-populations progénitrices selon le traitement d'induction. L'analyse de la numération de ces sous-populations n'a pas non plus révélée de différences significatives (**figure 20**). La piste d'une déplétion des PG-L par les GALP avant leur entrée dans le thymus n'est ici pas confirmée. Néanmoins, nous avons retrouvé une diminution des RTE dans le groupe ATG, dans les premiers jours suivant la transplantation. Cette diminution n'a pas été observée chez les patients du groupe Ac anti-CD25 (**figure 20**). Chez les patients VIH+, la lymphopénie T CD4 est également associée à une diminution des RTE [revue, (Appay *et al.* 2016)]. Sauce *et al* ont décrit que la lymphopénie T CD4 est corrélée à la diminution des CSH et associée à une diminution des PG-L (Sauce *et al.* 2011). Il apparaît nécessaire d'augmenter le nombre de patients à analyser dans notre étude et nous pourrions associer au dosage quantitatif des CSH, des tests de fonctionnalité de ces cellules comme la capacité à proliférer, à se différencier en cellules matures et à assurer l'ontogénèse des cellules immunitaires (Shizuru *et al.* 2005). En effet, à l'inverse de Sauce *et al*, bien qu'ils observent une diminution des RTE, Menkova-Garnier *et al* n'ont pas retrouvé de diminution des CSH chez les patients VIH+ lymphopéniques T CD4. Les auteurs ont montré que les CSH présentent une moins bonne capacité de différenciation de la lignée T, secondaire à une diminution de l'expression des marqueurs de prolifération et de survie et une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la mort cellulaire (Menkova-Garnier *et al.* 2016).



**Figure 20 :** Cellules progénitrices circulantes après transplantation rénale selon le traitement d'induction (ATG vs. Ac anti-CD25). Evolution du nombre de PG-L après transplantation selon le traitement d'induction (A). Evolution du nombre de PG-M après transplantation selon le traitement d'induction (B). Evolution du nombre de RTE après transplantation selon le traitement d'induction (C). Les barres représentent les moyennes, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  et \*\*\* $p < 0.001$ .

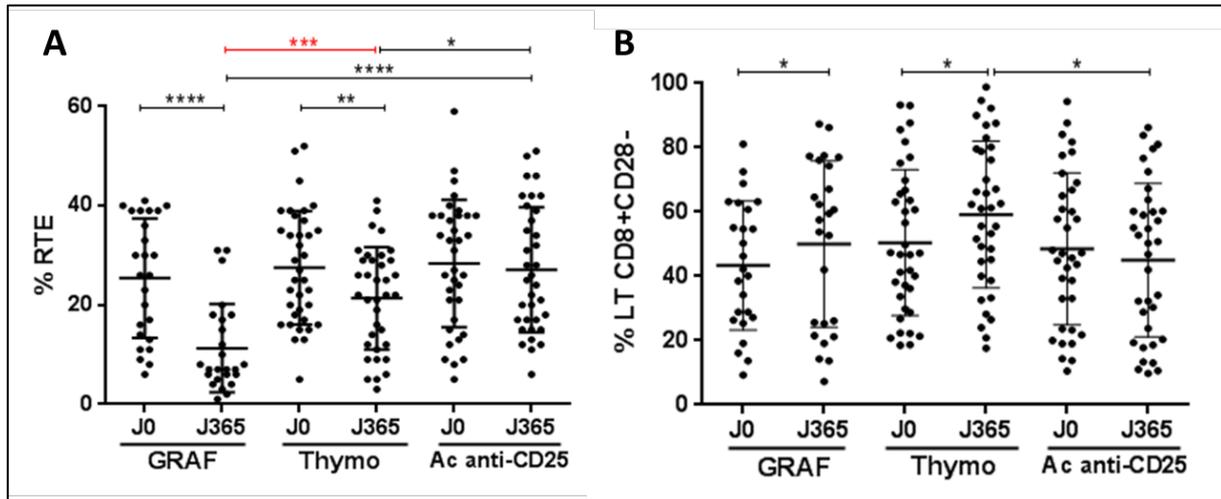
Notre travail a également montré que les GALP pourraient favoriser la proportion de LT de profil phénotypique de sénescence alors que cette observation n'a pas été retrouvée chez les patients traités par Ac anti-CD25. Là encore, nous avons effectué les marquages de ces sous-populations lymphocytaires sur sang total sur la cohorte GABII. Nous n'avons pas retrouvé de différence de proportions de LT sénescents selon le traitement d'induction aux différents temps après transplantation. L'analyse du nombre de LT  $CD8^+CD28^-$  et  $CD8^+CD57^+CD28^-$  a montré une diminution de ces cellules à J90 mais aucune différence entre J0 et un an (**figure 21**). Une augmentation des LT sénescents par les GALP à un an n'est donc pas retrouvée dans cette étude.



**Figure 21 :** LT circulants de phénotype sénescé après transplantation rénale selon le traitement d'induction (ATG vs. Ac anti-CD25). Evolution du nombre de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> après transplantation selon le traitement d'induction (A). Evolution du nombre de LT CD8<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> après transplantation selon le traitement d'induction (B). Les barres représentent les moyennes, \*p<0.05, \*\*p<0.01 et \*\*\*p<0.001.

Les résultats obtenus dans notre travail princeps n'ont pas été confirmés dans l'étude GABII, mais ces différences peuvent s'expliquer. Tout d'abord, nous avons réalisé les marquages sur sang total et non sur PBMC. Les résultats obtenus sur sang total sont plus précis, cependant le nombre de patients étudié est inférieur, c'est pourquoi il faut rester prudent quant à l'interprétation des résultats. En effet, dans la publication nous avons étudié 61 patients ayant reçus des GALP alors que nous n'en avons que 10 dans l'étude GABII. Nous manquons donc de puissance lors des tests statistiques. De plus, nous avons montré que la progression du phénotype de sénescence après GALP était surtout présente chez les patients présentant une inversion du rapport CD4/CD8 à un an, et elle était amplifiée par la maladie à CMV après la greffe. Par ailleurs, les patients inclus dans l'étude GABII sont exclusivement issus de Besançon et reçoivent tous de l'ATG-Fresenius GRAFALON® ; alors que dans la publication nous avons sélectionné des patients issus de la cohorte multicentrique ORLY-Est. Les patients de cette étude traités par GALP ont donc reçu soit de l'ATG-Fresenius GRAFALON® (25 patients) soit de la THYMOGLOBULINE® (36 patients) selon le centre dans lequel ils ont été inclus. Un travail en cours au sein de notre équipe révèle que ces deux traitements ont un effet différent sur l'induction de la sénescence après transplantation. En effet, des résultats préliminaires montrent clairement que le GRAFALON® et la THYMOGLOBULINE®

entraînent une forte déplétion des RTE après transplantation, cependant l'effet sur les LT sénescents est moins marqué avec le GRAFALON® qu'avec la THYMOGLOBULINE®. Nous avons retrouvé ces résultats également lorsque nous avons séparé les patients étudiés dans la publication selon le type de GALP (**figure 22**). Il y aurait donc un effet propre du type de GALP sur l'induction de la sénescence par ces traitements.



**Figure 22 :** RTE et LT sénescents circulants après transplantation rénale selon le traitement d'induction (GRAFALON ou THYMOGLOBULINE vs. Ac anti-CD25). Evolution du pourcentage de RTE après transplantation selon le traitement d'induction (A). Evolution du pourcentage de LT CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> après transplantation selon le traitement d'induction (B). Les barres représentent les moyennes, \*p<0.05, \*\*\*p<0.001 et \*\*\*\*p<0.0001.

Enfin, notre équipe a montré que l'état immunologique du patient avant transplantation peut influencer les événements cliniques survenant après transplantation. Bamoulid *et al*, chez les transplantés rénaux ayant reçu des GALP, une meilleure fonction thymique pré-transplantation rénale, définie selon les RTE, est associée à une augmentation du risque de rejet aigu (Bamoulid *et al*. 2016). Dans cette étude, chez les transplantés rénaux ayant reçu des GALP, une proportion élevée de LT CD4<sup>+</sup> de phénotype sénescent (CD57<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) au moment de la transplantation est associée à une augmentation de l'incidence cumulée de rejet aigu. Cette constatation fait écho aux résultats d'Espinosa *et al* qui ont montré l'implication d'une proportion élevée des LT CD4<sup>+</sup>CD57<sup>+</sup> avant transplantation dans le rejet aigu résistant chez des patients sous BELATACEPT. La présence de ces LT est retrouvée dans les biopsies de greffons après RA. Cependant, les auteurs n'ont pas retrouvé de caractéristiques

d'immunosénescence associées au marqueur CD57 dans le cadre de leur étude (Espinosa *et al.* 2016).

Nous avons aussi montré qu'une proportion élevée de LT CD8<sup>+</sup> de phénotype sénescent au moment de la transplantation est associée à un risque plus élevé de maladies à CMV. La séropositivité pour le CMV accentue l'expansion de LT CD28<sup>-</sup> et l'inversion du rapport CD4/CD8 après GALP. La sénescence pourrait donc être à la fois induite par les GALP et par les événements indésirables se développant chez les transplantés ayant reçus des GALP. Dans une autre étude, Crepin *et al* ont montré qu'un phénotype d'immunosénescence chez les patients séropositifs pour le CMV avant transplantation était un facteur de risque de développer une infection opportuniste ou une infection bactérienne sévère, de façon indépendante et supérieure au fait d'être diabétique et au fait d'avoir reçu une thérapie d'induction par GALP. De plus, ils ont montré que la persistance d'un IRP est plus fréquemment rencontrée lorsque les patients ont reçu des GALP en induction de la transplantation ou s'ils ont présenté une infection à CMV en post-transplantation (Crepin *et al.* 2016).



## **Partie 2 : Translocation bactérienne digestive en transplantation rénale**

En dehors d'un traitement par GALP, le greffon est une source de stimulations allogéniques répétées et les co-morbidités associées à la transplantation telles que le diabète, la dyslipidémie ou des épisodes infectieux récurrents sont à l'origine d'un stress oxydatif et d'inflammation chronique (Turkmen *et al.* 2012). De récents travaux ont montré que la présence chronique de LPS issu d'une translocation dans le sang des bactéries à Gram négatif du contenu intestinal pourrait favoriser la persistance d'un microenvironnement pro-inflammatoire [revue, (Kell *et al.* 2015)].

### **1. Impact de la transplantation rénale sur la translocation bactérienne digestive**

L'implication du LPS dans l'inflammation chronique a largement été décrite chez les patients insuffisants rénaux (McIntyre *et al.* 2011, Wang *et al.* 2012, Shi *et al.* 2014), notamment par l'équipe de Vaziri [revue, (Vaziri *et al.* 2016)]. La TBD est décrite comme un facteur non lié à la dialyse favorisant l'inflammation chronique (Sabatino *et al.* 2015) et cette dernière est décrite comme un facteur non conventionnel des maladies cardiovasculaires (Carrero *et al.* 2009). Dans l'insuffisance rénale, ce sont l'accumulation de toxines urémiques, l'hypoperfusion rénale et la dialyse qui ont été décrites comme facteurs affectant l'intégrité de la barrière intestinale à l'origine de la TBD [revue, (Vaziri 2014)]. L'évolution de ce phénomène après transplantation rénale n'a jamais été décrite. L'objectif est, d'une part, de confirmer la présence de LPS avant transplantation en associant un dosage quantitatif au dosage de son activité (Pais de Barros *et al.* 2015), et d'autre part, d'étudier l'évolution des marqueurs de TBD après transplantation et récupération de la fonction rénale. Enfin, l'impact du LPS sur l'inflammation chronique et sur les événements cliniques précoces après transplantation a été évalué dans ce travail.

## **ESRD-associated gut bacterial translocation: evolution after kidney transplantation and impact on chronic inflammation and acute rejection**

Clémence Carron<sup>1, 2</sup>, Jean-Paul Pais de Barros<sup>3, 4, 5, 6</sup>, Emilie Gaiffe<sup>7, 8</sup>, Valérie Deckert<sup>3, 4, 5, 6</sup>, Caroline Laheurte<sup>1, 9</sup>, David Masson<sup>3, 4, 5, 6, 10</sup>, Dominique Simulat-Faivre<sup>11</sup>, Pascale Louvat<sup>1</sup>, Bruno Moulin<sup>12</sup>, Luc Frimat<sup>13</sup>, Philippe Rieu<sup>14</sup>, Christiane Mousson<sup>15</sup>, Antoine Durrbach<sup>16</sup>, Anne-Elisabeth Heng<sup>17</sup>, Philippe Saas<sup>1, 2, 6, 9</sup>, Didier Ducloux<sup>1, 2, 6, 7, 11</sup>, Laurent Lagrost<sup>3, 4, 5, 6, 10</sup> and Jamal Bamouid<sup>1, 2, 11</sup>

<sup>1</sup>Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions hôte-greffon-tumeur – Ingénierie Cellulaire et Génique, FHU-INCREASE, F-25000 Besançon, France ; <sup>2</sup>Faculté de Médecine et de Pharmacie, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France ; <sup>3</sup>INSERM, LNC UMR866, F-21000 Dijon, France ; <sup>4</sup>LNC UMR866, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-21000 Dijon, France ; <sup>5</sup>Fondation de Coopération Scientifique Bourgogne-Comté, F-21000 Dijon, France ; <sup>6</sup>LabEx LipSTIC, F-25000 Besançon, France ; <sup>7</sup>FHU INCREASE, F-25000 Besançon, France ; <sup>8</sup>CHRU Besançon, INSERM, CIC-1431, F-25000 Besançon, France ; <sup>9</sup>EFS Bourgogne Franche-Comté, Plateforme de BioMonitoring, F-25000 Besançon, France ; <sup>10</sup>CHU Dijon, Biochimie et Service de la recherche, F-21000 Dijon, France ; <sup>11</sup>CHU Besançon, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, F-25000 Besançon, France ; <sup>12</sup>CHU Strasbourg, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, F-67000 Strasbourg, France ; <sup>13</sup>CHU Nancy, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, F-54000 Nancy, France ; <sup>14</sup>CHU Reims, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, F-51100 Reims, France ; <sup>15</sup>CHU Dijon, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, F-21000 Dijon, France ; <sup>16</sup>CHU Kremlin-Bicêtre, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, F-94270 Le Kremlin-Bicêtre, France and <sup>17</sup>CHU Clermont-Ferrand, Department of Nephrology, Dialysis, and Renal Transplantation, F-63000 Clermont-Ferrand, France

## **ABSTRACT**

Chronic inflammation in end-stage renal disease (ESRD) is partly attributed to gut bacterial translocation (GBT) due to a loss of intestinal epithelium integrity. Increased levels of circulating LPS - a surrogate marker of GBT – contribute to maintain a chronic inflammatory state. However, circulating LPS can be neutralized by lipoproteins and transported to the liver for elimination. We aimed to describe the evolution and clinical impact of ESRD-associated GBT after kidney transplantation (KT). One hundred and forty-six renal transplant recipients with serum samples obtained immediately before and one year after transplantation (1-Year post KT) were included. Intestinal epithelium integrity (assessed using iFABP), total LPS (obtained by measuring 3-hydroxymyristate) and LPS activity (representing biologically active LPS measured by the LAL assay), inflammatory biomarkers (sCD14 and cytokines), lipoproteins and LPS binding proteins (LBP and PLTP activity) were simultaneously measured. iFABP decreased 1-Year post KT, but remained higher than in healthy donors. Total LPS mass concentration remained stable while LPS activity decreased. Inflammation biomarkers decreased 1-Year post KT. We concomitantly observed an increase in lipoproteins. Elevated sCD14 before transplantation was associated with lower incidence of acute rejection. Although GBT remains stable one year after KT, the contemporary increase in lipoproteins could bind circulating LPS and contribute both to neutralization of LPS activity and improvement of ESRD-associated chronic inflammation. Chronic exposure to LPS in ESRD could promote endotoxin tolerance and explain why patients with higher pre-transplant sCD14 are less prompt to develop acute rejection after transplantation.

## **KEYWORDS**

Gut bacterial translocation; Lipopolysaccharides; Cholesterol; Chronic inflammation; Kidney transplant; Acute rejection

## INTRODUCTION

End-stage renal disease (ESRD) is associated with elevated plasma concentrations of pro-inflammatory cytokines and activated/exhausted leukocytes (Honda *et al.* 2006, Heine *et al.* 2012). This state of persistent low-grade inflammation plays a major role in the progression of chronic kidney disease (CKD), and has been recognized as a non-conventional risk factor and a promoter for cardiovascular disease (CVD) in CKD (Carrero *et al.* 2009, Gansevoort *et al.* 2013). This chronic inflammation results from the persistence of a causative stimulus stemming from several dialysis-related factors, like membrane bio-incompatibility, and non-dialysis-related factors like infections, oxidative stress, accumulation of uremic toxins, comorbidities, genetic factors, diet (Carrero *et al.* 2009), or more recently described, gut bacterial translocation (GBT) (Sabatino *et al.* 2015). Damage to the integrity of the gut epithelial barrier allows bacteria and their products, especially lipopolysaccharides (LPS), to translocate from the intestinal lumen into the peripheral blood (Estes *et al.* 2010). This disruption has been attributed to accumulation of uremic toxins, metabolites and urea, and intestinal hypoperfusion (Vaziri *et al.* 2016) and is potentially aggravated by intra-dialytic and post-dialytic hypotension (Kwan *et al.* 2013, Vaziri 2014). Whereas Andersen *et al.* (Andersen *et al.* 2016) explored gut damage and permeability with direct and specific biomarkers in murine ileum and colon tissues, few data are available in CKD patients (Magnusson *et al.* 1991, Grant *et al.* 2016).

Once into the blood, LPS is a potent immune stimulating factor. LPS-binding protein (LBP) carries and transfers LPS on innate immune cells expressing the Toll-Like Receptor-4 (TLR-4). LPS binding to TLR-4 is followed by solubilization of the co-receptor CD14 (that generates soluble CD14 [sCD14]) and stimulates the MyD88 and TRIF signaling pathways, involved in pro-inflammatory cytokine release and subsequent chronic inflammation (Park *et al.* 2013). Alternatively, biological activity of circulating LPS may be neutralized by lipoproteins and, thanks to the ‘reverse LPS transport’ pathway, driven to the liver. Earlier studies reported that phospholipid transfer protein (PLTP) may play a key role in mediating lipoprotein binding and neutralization of LPS (Gautier *et al.* 2011).

The LAL assay –using lysate of horseshoe crab amebocytes, which enzymatically interacts with endotoxins– is currently the most frequent method for detection of circulating LPS (Wong *et al.* 2015, Munford 2016). In ESRD, McIntyre *et al.* showed that endotoxemia measured by the LAL assay is associated with systemic inflammation, features of malnutrition, cardiac injury, and reduced survival (McIntyre *et al.* 2011). Shi *et al.*, in addition

to the LAL assay, described the presence of bacteria in the peripheral blood by *16S rDNA* sequencing and suggested that any intestinal bacteria detected in peripheral blood of CKD patients may reveal GBT (Wang *et al.* 2012, Shi *et al.* 2014). Besides, Bohrer *et al.* (Bohrer *et al.* 2001) showed that peritoneal dialysis fluids and hemodialysis concentrates can interfere with the LAL assay. However, the LAL assay better reflects LPS activity than a real quantification of the total LPS mass concentration (Munford 2016). Until now, effective blood measurements of LPS are missing in clinical studies (Munford 2016). Quantitative LPS analysis is now available, using spectrometry coupled to high performance liquid chromatography (Pais de Barros *et al.* 2015). This method measures total circulating mass of LPS, including LPS bound and unbound to lipoproteins and not only LPS activity (*i.e.*, unbound LPS able to activate the LAL assay).

The evolution of GBT after kidney transplantation (KT) remains unknown. To answer this question, we conducted a two-step analysis. First, we aimed to describe evolution of GBT assessed by circulating LPS measurements after weaning of dialysis and the improvement of renal function following KT, and, second we analyzed its impact on inflammatory status and post-transplant outcomes. To perform this study, we explored gut epithelial barrier integrity using a marker of enterocyte damages (Piton *et al.* 2016), *i.e.* intestinal fatty acid binding protein (iFABP), and circulating LPS (by combined measure of total LPS quantity (Pais de Barros *et al.* 2015) and the LAL assay). We also explored both LPS-induced inflammation – by measuring circulating sCD14 as well as inflammatory cytokines– and biliary elimination pathways.

## RESULTS

### Population characteristics

One hundred and forty-six ESRD patients (ESRD) from the ORLY-Est study were included. We first compared this population with study patients not included in this analysis (n=788) for baseline characteristics (**table 1**). The studied population was younger (50.0 vs. 52.4 years-old;  $p = 0.032$ ), received more frequently induction with antithymocyte globulins (ATG) (39.0 vs. 29.2%;  $p = 0.042$ ) and were more frequently under azathioprine (2.1 vs. 0.1%;  $p = 0.001$ ), (**table 1**). Additionally, some of the biomarkers (iFABP, LPS and sCD14) were also measured in 11 healthy donors (HD). Renal transplant recipients (RTR) were older than HD (50.0 vs. 38.7 years-old;  $p = 0.004$ ). There was no correlation between biomarkers and patients' age (data not shown) and no data clearly supports any influence of age on intestinal permeability (Saltzman *et al.* 1995, Valentini *et al.* 2014, Man *et al.* 2015), especially in ESRD.

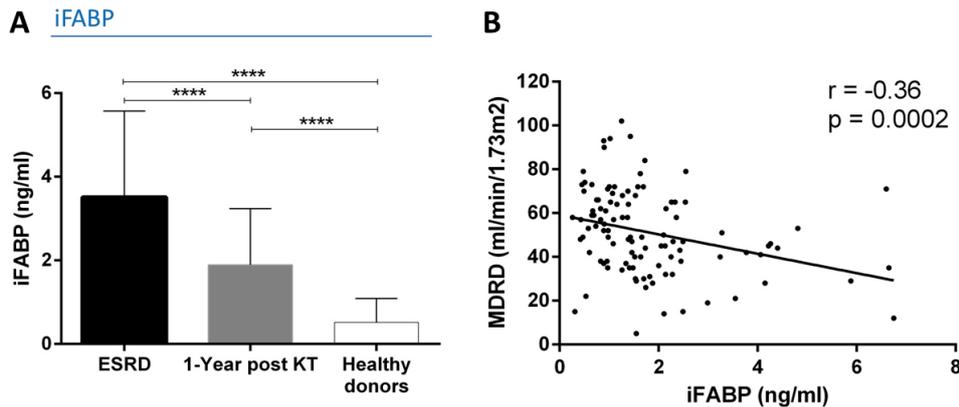
**Table 1: Description of general characteristics of the study RTR population and total RTR population**

Variable	Study population	Total RTR cohort	<i>p</i>
n	146	788	
Age, mean in years (range)	50.0 (20-74)	52.4 (18-84)	<b>0.040</b>
Sex ratio (H/F)	1.60	1.75	0.656
BMI (kg/m <sup>2</sup> ), mean	25.3	25.6	0.483
Dialysis n. (%)	133 (91.1)	711 (90.2)	0.621
HD n. (%)	94 (70.7)	540 (75.9)	0.419
DP n. (%)	28 (21.1)	144 (20.3)	0.747
DP/HD n. (%)	10 (7.5)	27 (3.8)	<b>0.047</b>
Duration of dialysis, mean in months (range)	34.2 (0-219)	40.2 (0-432)	0.107
First renal transplantation n. (%)	135 (92.5)	718 (91.1)	0.595
Presence of anti-HLA antibodies n. (%)	46 (31.5)	241 (30.6)	0.891
CMV exposure n. (%)	117 (80.1)	662 (84.0)	0.752
Diabetes before transplantation n. (%)	22 (15.0)	154 (19.5)	0.186
Anti-CD25 n. (%)	89 (61.0)	446 (56.6)	0.495
ATG n. (%)	57 (39.0)	230 (29.2)	<b>0.042</b>
Corticosteroid n. (%)	134 (91.8)	721 (91.5)	0.910
Tacrolimus n. (%)	104 (71.2)	511 (64.8)	0.135
Ciclosporine n. (%)	33 (22.6)	231 (29.3)	0.098
Sirolimus/Everolimus n. (%)	4 (2.7)	20 (2.5)	0.888
Mycophenolate mofetil/Mycophenolic acid n. (%)	140 (95.9)	758 (96.2)	0.574
Azathioprine n. (%)	3 (2.1)	1 (0.1)	<b>0.001</b>

n: number; BMI: body mass index; HD: hemodialysis; DP: peritoneal dialysis; CMV: *Cytomegalovirus*; ATG: Antithymocyte globulins

## Intestinal barrier integrity in ESRD and after KT

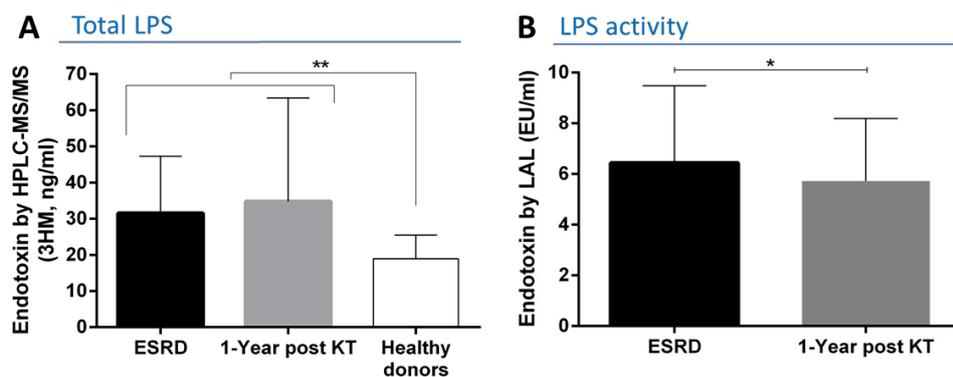
Circulating iFABP concentrations significantly decreased one year post-transplant ( $3.51 \pm 2.06$  vs.  $1.90 \pm 1.34$  ng/ml;  $p < 0.0001$ ), but remained higher than in HD ( $1.90 \pm 1.34$  vs.  $0.52 \pm 0.57$  ng/ml;  $p < 0.0001$ ), (**figure 23A**). Circulating iFABP concentrations one year post-transplant were inversely correlated with glomerular filtration rate (GFR) ( $r = -0.36$ ;  $p = 0.0002$ ), (**figure 23B**).



**Figure 23: Exploration of gut epithelial barrier integrity by measurement of intestinal Fatty Acid Protein (iFABP).** Evolution of iFABP concentrations between ESRD and one year after transplantation ( $n=146$ ) for RTR population, and the comparison with the healthy donors ( $n=11$ ) (A). Spearman correlation between iFABP concentrations and MDRD, one year after transplantation (B). Only significant  $p$  values between groups are represented, \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

## Circulating lipopolysaccharides in ESRD and after KT

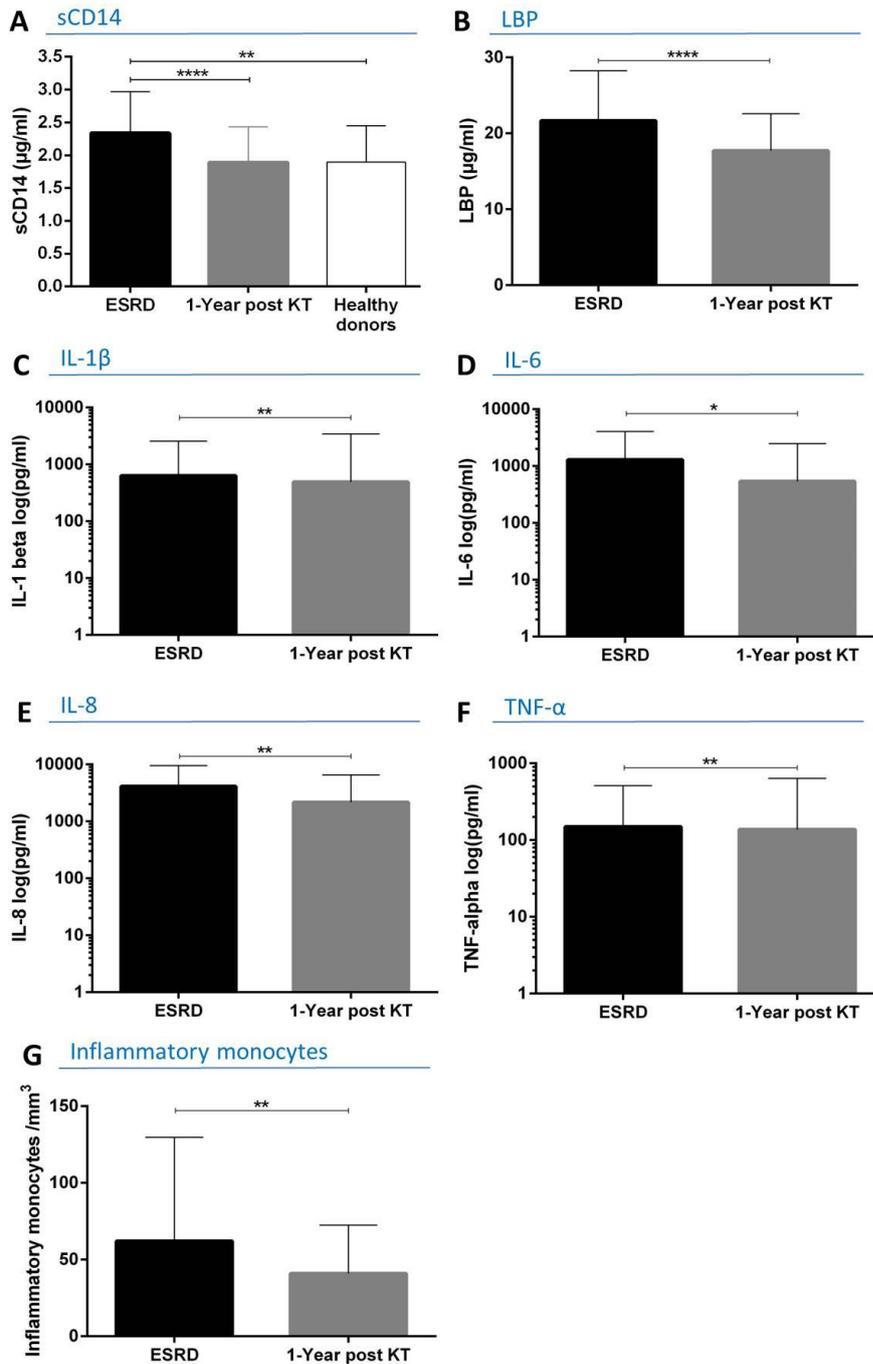
ESRD had higher total LPS concentrations when compared to HD ( $31.51 \pm 15.79$  vs.  $18.95 \pm 6.51$  ng 3-hydroxymyristate (3-HM)/ml;  $p = 0.002$ ), (**figure 24A**). KT was not associated with a decrease in GBT (as assessed by LPS), since total LPS remained stable without any significant variation before and after transplantation ( $31.51 \pm 15.79$  vs.  $34.81 \pm 28.57$  ng 3HM/ml;  $p = 0.92$ ), (**figure 24A**). However, there was a concomitant significant decrease in the LAL assay evaluating circulating level of biologically active LPS ( $6.44 \pm 3.04$  vs.  $5.72 \pm 2.47$  EU/ml;  $p = 0.03$ ), (**figure 24B**) suggesting a better neutralization of LPS activity after KT by potential carriers.



**Figure 24: Total LPS quantity and LPS activity prior and 1-year after kidney transplantation.** Comparison of total circulating LPS concentrations between ESRD patients (n=146) and healthy donors (n=11) (A). Evolution of total circulating LPS concentrations between ESRD and one year after transplantation (n=146) (B). Evolution of the activity of LPS measured by the LAL assay between ESRD and one year after transplantation (n=89) (C). Only significant p values between groups are represented, \*\*p<0.01 and \*p<0.05.

### LPS-induced inflammation in ESRD and after KT

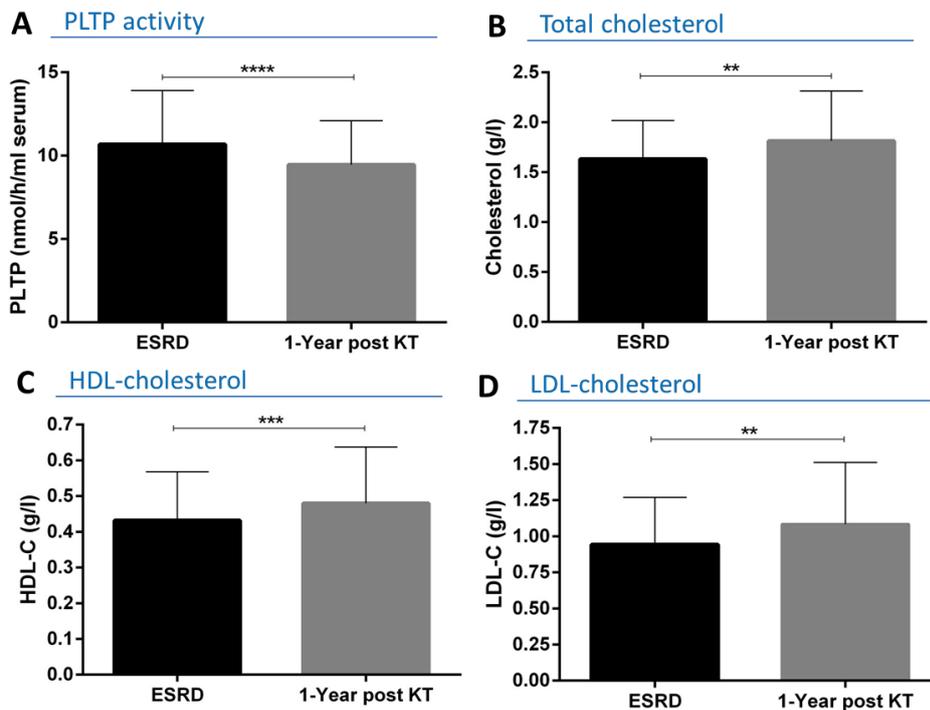
ESRD patients had increased concentrations of sCD14 when compared to HD ( $2.34 \pm 0.63$  vs.  $1.89 \pm 0.55$   $\mu\text{g/ml}$ ;  $p = 0.007$ ), (**figure 25A**). After transplantation, we observed a significant decrease in sCD14 ( $2.34 \pm 0.63$  vs.  $1.89 \pm 0.54$   $\mu\text{g/ml}$ ;  $p < 0.0001$ ), (**figure 25A**). Moreover, LBP ( $21.65 \pm 6.57$  vs.  $17.72 \pm 4.87$   $\mu\text{g/ml}$ ;  $p < 0.0001$ ), (**figure 25B**) and all pro-inflammatory cytokines decreased simultaneously after transplantation (IL-1 $\beta$ :  $631.5 \pm 1926$  vs.  $491.7 \pm 2933$   $\text{pg/ml}$ ;  $p = 0.008$ ; IL-6:  $1290 \pm 2772$  vs.  $539.7 \pm 1945$   $\text{pg/ml}$ ;  $p = 0.04$ ; IL-8:  $4108 \pm 5392$  vs.  $2162 \pm 4377$   $\text{pg/ml}$ ;  $p = 0.002$  and TNF- $\alpha$ :  $148.9 \pm 362.8$  vs.  $137.6 \pm 497.4$   $\text{pg/ml}$ ;  $p = 0.001$ ), (**figure 25C, D, E, F**). At the cellular level, monocyte activation –that may be related to increased LPS levels– seemed to be downregulated as inflammatory monocyte count decreased one year post-transplant ( $61.61 \pm 67.27$  vs.  $43.70 \pm 60.66$   $/\text{mm}^3$ ;  $p = 0.002$ ), (**figure 25G**). Overall, these data suggest a concomitant decrease of pro-inflammatory mediators after transplantation.



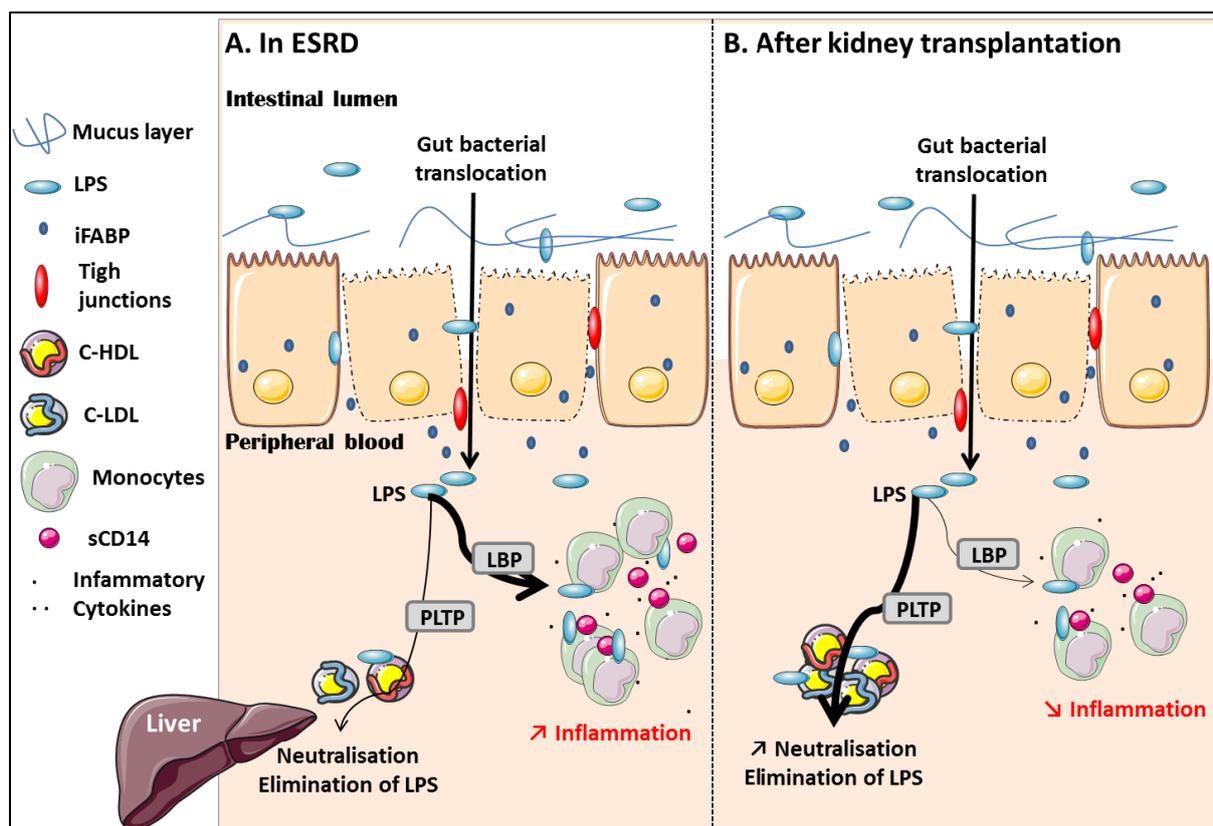
**Figure 25: TLR-4 inflammation pathway and pro-inflammatory cytokines.** Evolution of sCD14 concentrations between ESRD and one year after transplantation (n=146) for RTR population, and the comparison with the healthy donors (n=11) (A). Evolution of LBP concentrations between ESRD and one year after transplantation (n=57) (B). Evolution of IL-1 $\beta$  concentrations between ESRD and one year after transplantation (n=89) (C). Evolution of IL-6 concentrations between ESRD and one year after transplantation (n=89) (D). Evolution of IL-8 concentrations between ESRD and one year after transplantation (n=89) (E). Evolution of TNF- $\alpha$  concentrations between ESRD and one year after transplantation (n=89) (F). Evolution of inflammatory monocytes/mm<sup>3</sup> concentrations between ESRD and one year after transplantation (n=74) (A). Only significant p values between groups are represented, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*\*p<0.0001.

## Cholesterol and PLTP activity in ESRD and after KT

Total LPS remained higher in RTR, but the decrease in the LAL assay and LPS-induced inflammation suggests a better assimilation of circulating LPS into carriers. Hence, we also explored the elimination pathway of LPS by quantifying lipoproteins and PLTP activity. PLTP activity decreased one year after transplantation ( $10.68 \pm 3.23$  vs.  $9.45 \pm 2.64$  nmol/h/ml serum;  $p < 0.0001$ ), (**figure 26A**). Conversely, there was an increase in total cholesterol ( $1.63 \pm 0.38$  vs.  $1.81 \pm 0.50$  g/l;  $p = 0.001$ ), C-HDL concentrations ( $0.43 \pm 0.14$  vs.  $0.48 \pm 0.16$  g/l;  $p = 0.0002$ ), and C-LDL ( $0.94 \pm 0.33$  vs.  $1.08 \pm 0.43$  g/l;  $p = 0.004$ ), (**figure 26B, C, D**). This suggests a higher availability of lipoproteins potentially capable to bind and neutralize LPS (**figure 27**).



**Figure 26: Evolution of PLTP activity and cholesterol after transplantation.** Evolution of PLTP activity between ESRD and one year after transplantation (n=89) (A). Evolution of cholesterol concentrations between ESRD and one year after transplantation (n=89) (B). Evolution of C-HDL concentrations between ESRD and one year after transplantation (n=89) (C). Evolution of C-LDL concentrations between ESRD and one year after transplantation (n=89) (D). Only significant p values between groups are represented, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  and \*\*\*\* $p < 0.0001$ .



**Figure 27: Description of the effect of GBT on inflammation before and after kidney transplantation.** In CKD, the disruption of gut barrier allows the passage of bacterial products (LPS) into peripheral blood. LPS was supported by LBP to promote the development of chronic inflammation. Elimination pathway was minority because of dyslipidemia (A). After KT, the increase of lipoproteins could improve the availability to bind and neutralize LPS. It was associated with a decrease in inflammation one year after transplantation (B).

## Acute rejection

Fifty-seven patients (39%) experienced at least one episode of acute cellular rejection (AR) during the first year after transplantation in our study population, while there was 18% AR in the rest of the whole ORLY-EST cohort (SuppTable1). To test whether circulating LPS or inflammation biomarkers prior to transplantation were associated with acute rejection, we performed a logistic regression including potential factors associated with AR. Univariate analysis (**table 2**) revealed that pretransplant sCD14 (OR = 0.65 [0.37-1.14],  $p = 0.135$ ), immunosuppressive drugs (MMF: OR = 0.25 [0.08-0.76],  $p = 0.015$  and corticoids: OR = 0.29 [0.08-1.01],  $p = 0.051$ ), cytomegalovirus prophylaxis (OR = 0.40 [0.19-0.84],  $p = 0.016$ ), gender (OR = 0.55 [0.27-1.10],  $p = 0.091$ ), body mass index (OR = 1.05 [0.98-1.12],  $p = 0.152$ ), proportion of CD8<sup>+</sup> effector T cells (OR = 1.00 [0.98-1.00],  $p = 0.112$ ) and of naive

CD45RA<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells (OR = 1.02 [1.00-1.05], p = 0.046), delayed graft function (OR = 3.27 [1.41-7.60], p = 0.006), new onset diabetes mellitus (OR = 2.60 [1.17-5.78], p = 0.019), severe bacterial infections (OR= 2.24 [1.11-4.54], p = 0.025) and opportunistic infections (OR = 2.06 [1.01-4.21], p = 0.048) were associated with AR. In multivariate analysis, sCD14 (OR, 0.43 [0.20-0.90], p = 0.025), MMF treatment (OR, 0.14 [0.04-0.53], p = 0.004), naive CD45RA<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T cell levels (OR, 1.06 [1.02-1.10], p = 0.001) were associated with AR. Additionally, we found pretransplant low sCD14 and low values obtained with the LAL assay were associated with better survival without AR (p = 0.090 and p = 0.036; Kaplan-Meier test), (SuppFigure1).

Thus, we considered separately patients according to sCD14 median in ESRD (2.26 µg/ml) (low and high sCD14 group). Total LPS concentrations were higher in high sCD14 group (34.4 ± 15.9 vs. 28.7 ± 15.9 ng 3HM/ml; p = 0.02) whereas the LAL assay data were marginally lower (6.01 ± 2.82 vs. 6.65 ± 3.15 EU/ml; p = 0.052). No other differences were observed, especially for inflammatory cytokines which were comparable in both groups. Nevertheless, the rate of AR was marginally higher in low sCD14 group than in high sCD14 group (24.0% vs. 15.1%; p = 0.052).

**Table 2: Association between sCD14 and acute rejection: univariate and multivariate analysis**

Logistic regression, associated factors with acute rejection		Univariate analysis			Multivariate analysis		
Variable at ESRD	N	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p
Sex	146	0.55	0.27-1.10	0.091			
BMI	143	1.05	0.98-1.12	0.152			
Anti-CMV prophylaxis	142	0.40	0.19-0.84	0.016			
MMF	146	0.25	0.08-0.76	0.015	0.14	0.04-0.53	<b>0.004</b>
Corticoids	146	0.29	0.08-1.01	0.051			
% naive CD45RA <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> T cells	145	1.02	1.00-1.05	0.046	1.06	1.02-1.10	<b>0.001</b>
CD8 <sup>+</sup> T cells	145	1.00	0.98-1.00	0.112			
sCD14	145	0.65	0.37-1.14	0.135	0.43	0.20-0.90	<b>0.025</b>
Early clinical events	N	OR	IC 95%	p	OR	IC 95%	p
Delayed graft function	146	3.27	1.41-7.60	0.006			
NODAT	141	2.60	1.17-5.78	0.019	6.36	2.31-17.52	<b>&lt; 0.0001</b>
Severe bacterial infection	146	2.24	1.11-4.54	0.025	2.31	0.94-5.70	0.068
Opportunistic infection	146	2.06	1.01-4.21	0.048			

## DISCUSSION

This is, to the best of our knowledge, the first study exploring both GBT –assessed by quantification of circulating biological activity and total mass LPS levels– and the LPS elimination pathway in ESRD, and the impact of KT on these phenomena. We confirmed the existence of an important GBT in ESRD associated with an inflammation status. The recovery in renal function after KT was associated with better gut integrity, yet remaining altered when compared with HD. However, even when total circulating LPS does not decrease after transplantation, our data clearly demonstrate down-regulation of LPS activity measured by the LAL assay, and its association with a decrease in systemic chronic inflammation. The increase in cholesterol and lipoproteins after transplantation pleads for a higher neutralization capacity of circulating LPS and may contribute to the improvement of ESRD-associated inflammatory status (**figure 27**). Finally, high sCD14 concentration before transplantation was protective for AR, suggesting a state of strong endotoxin tolerance and immunosuppression.

High serum concentrations of total LPS, iFABP and sCD14 suggested the existence of GBT in ESRD. Kidney transplantation allowed weaning of dialysis and is supposed to decrease uremic toxin concentrations and to improve renal and intestinal perfusion (Vaziri 2014, Andersen *et al.* 2016). In our study, we chose to evaluate the integrity of the gut epithelium barrier with iFABP. This biomarker is a sensitive and specific 14-15 kDa cytoplasmic protein highly expressed in the enterocytes, normally undetectable in serum, but fast released after intestinal damage before urine secretion (Piton *et al.* 2016). High iFABP concentrations, which could reflect significant gut barrier impairment in CKD, decreased after transplantation but remained higher than in HD. iFABP was the only marker significantly correlated with GFR, suggesting that ESRD could promote its accumulation. Hence, decrease in iFABP may rather reflect an improvement in molecule glomerular filtration following recovery of renal function than a real improvement in gut barrier integrity after KT because levels remained higher than HD. This may explain why we did not observe a concomitant decrease in total endotoxemia as illustrated by the absence of total LPS variation following KT.

Until now, GBT has been assessed by identification of the same bacterial species in the intestine microbiota and in the peripheral blood of ESRD patients (Wang *et al.* 2012). This hypothesis was later confirmed in dialysis populations: bacterial species found in dialysates were different from those identified in patients' blood (Bossola *et al.* 2009), suggesting that

the detected species did not translocate from dialysate. Hence, most bacterial species originate from the intestine flora (Shi *et al.* 2014). GBT can also be attested by the LAL assay (measuring LPS) (McIntyre *et al.* 2011) or by detection of circulating bacterial-derived DNA fragments (*16S rDNA*) (Shi *et al.* 2014, Szeto *et al.* 2015). The novelty and difference of our study reside in the contemporary measurement of the LAL assay and total circulating LPS by chromatography (Pais de Barros *et al.* 2015). This latter method brings new perspectives in the exploration of GBT and provides new evidence for the intrinsic capacity of circulating lipoproteins and PLTP to neutralize the activity of LPS. Indeed, we observed distinct variations of total LPS and active LPS measured by the LAL assay, suggesting a persistent GBT with a decrease in circulating LPS activity.

The biological impact of persistent GBT after transplantation seems to be minimized, since we observed a decrease in the LAL assay associated with a down-regulation of inflammation biomarkers, in particular those related to TLR-4 activation (LBP, sCD14, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$ ). In accordance with this decrease in innate immune pro-inflammatory cytokines, we observed a decrease in inflammatory monocyte counts. Nevertheless, inherent anti-inflammatory properties of immunosuppressive drugs used to prevent kidney transplant rejection, especially corticosteroids, calcineurin inhibitors and antimetabolites, could not be excluded from the observed decrease in inflammation. Yet, while inflammatory biomarkers of innate immune system decreased after transplantation, those derived from T helper cell polarization did not decrease (IL-2, IL-10 and IL-15 did not vary and IL-7 and IL-22 increased, data not shown). This could suggest that the down-regulation of the inflammation pathway may be independent from the lymphocyte anti-proliferative effects of maintenance immunosuppressive drugs. Conversely, corticosteroids have an impact on monocytes and on pro-inflammatory cytokine gene transcription and could explain the decrease in inflammation. However, these drugs are mainly used at high doses in the first 3 or 6 months after KT, while we measured inflammation markers one year after KT.

Endotoxemia, *i.e.*, accumulation of LPS in blood, may result from the altered intestinal permeability and the ability of neutralization and elimination of circulating LPS by lipoproteins (Munford 2016). PLTP activity decreased one year after KT. Although PLTP may accelerate the 'reverse LPS transport' pathway, it belongs to a family of lipid transfer/LBP family. Hence, while PLTP activity could be down-regulated like the other inflammation biomarkers, cholesterol, particularly C-HDL (complex structures with surface

lipids), are able to bind and detoxify LPS. Galbois *et al* showed that incubation of recombinant HDL with whole blood prevented LPS-induced TNF- $\alpha$  and IL-6 overproduction in patients with cirrhosis (Galbois *et al.* 2009). Accordingly, we found higher concentrations of total cholesterol, C-LDL and C-HDL in RTR while the LAL assay and inflammation biomarkers decreased. Dialysis patients present a particular dyslipidemia with hypertriglyceridemia, elevated lipoprotein-a, low-HDL and reduced apoC-1 (Dautin *et al.* 2007, Maheshwari *et al.* 2010). The increase in C-HDL concentrations after KT can be explained by the improvement in quality of life (Lim *et al.* 2016, Rao *et al.* 2016), nutrition status and statin prescription. This increase in lipoproteins could improve binding of circulating LPS, and thus contribute to the improvement of ESRD-associated inflammatory status (Lagrost *et al.* 2014, Foit *et al.* 2016).

We found that elevated sCD14 in ESRD was protective for AR after KT. T and B cells are considered as central effectors in AR, but the role of myeloid cells may be underappreciated (Rekers *et al.* 2016). Chronic stimulation of myeloid cells by bacterial products has been associated with endotoxin tolerance, a phenomenon whereby prior exposure of organisms or cells to low concentrations of endotoxin causes them to become refractory to further endotoxin stimulation (Biswas *et al.* 2009, Leentjens *et al.* 2013). The persistent TLR stimulation induced a subsequent refractory state in which immunostimulation and immunosuppression coexist. Multiple factors were implicated in endotoxin tolerance as dysfunction of lymphocytes and neutrophils; lymphocyte apoptosis; anti-inflammatory cytokine release and monocyte deactivation, rendering them unable to react and perform normal cellular functions (Li *et al.* 2016). Similarly, in CKD/ESRD, the concomitant systemic inflammation and acquired immunodeficiency exist but has not yet been solved (Anders *et al.* 2013). In ESRD high sCD14 group, even when total LPS was elevated, we observed a lower LAL signal and absence of increase in proinflammatory cytokines. Taken together these results could suggest endotoxin tolerance in this group. One could extrapolate that repeated exposure to LPS in ESRD reduces the sensitivity to LPS, facilitates suppression of innate and adaptive immunity after KT and limits AR. Endotoxin tolerance has been reported in several pathologies such as sepsis, cystic fibrosis, acute coronary syndrome, trauma, and pancreatitis (Lopez-Collazo *et al.* 2013). In solid organ transplantation, Testro *et al* (Testro *et al.* 2011) showed that patients who experienced liver AR had higher levels of TLR-4 expression and also greater capacity to produce proinflammatory cytokines following TLR-4 stimulation prior to transplantation. In HIV-infected liver recipients, Balagopal *et al* (Balagopal *et al.*

2015) showed that higher log<sub>10</sub> sCD14 levels were associated with a 90% reduced risk of graft loss. TLR-4 polymorphism could also play an important role in this phenomenon. Indeed, we previously reported that TRL-4 polymorphisms decreased the risk of AR in RTR (Ducloux *et al.* 2005). Moreover, LPS has different potential for immune stimulation depending on the bacterial genus and LPS structure. Vatanen *et al* showed that LPS from *Bacteroidetes* possess less immunostimulatory activity than *Escherichia coli* (Vatanen *et al.* 2016). Data to support this concept in CKD and KT remain to be determined.

Our study has some limitations. Lack of enough serum quantity prevented us to perform all assays on all samples. Moreover, the limited number of inclusion and the short-term follow-up did not allow us to better evaluate the long-term clinical impact of GBT. Underreporting of events, particularly AR, is unlikely in the early post-transplant period when all patients are still followed in the transplant center. Clearly, findings of this preliminary study need now to be validated in larger series. Finally, we evaluated LPS which is representative of Gram negative bacteria but not Gram positive bacteria. It is generally admitted that Gram-negative facultative anaerobic bacteria and opportunistic pathogens translocate easily than Gram-positive anaerobic bacteria, yet further investigation of intestinal and blood microbiota compositions in RTR remained to be explored (Fricke *et al.* 2014, Vindigni *et al.* 2015). Indeed, a disruption in microbiota composition –dysbiosis- could promote loss of gut barrier integrity (Anders *et al.* 2013) and be one of the causes of persistent GBT after KT. Lee et al recently showed dysbiosis in RTR (Lee *et al.* 2014) and started to evaluate the impact of immunosuppressive drugs on this phenomenon (Lee *et al.* 2015). Immunosuppression may have an impact on the gut immunity mucosa (Malinowski *et al.* 2009, Malinowski *et al.* 2011) and participate to GBT after KT.

Our study is the first to combine total circulating LPS quantification and evaluation of LPS activity to better report GBT *in vivo*. Moreover, it is the first study exploring evolution of GBT after KT. We did not observe any resolution of GBT following transplantation, but rather a better neutralization of total circulating LPS involving increase in cholesterol and resulting in the improvement of GBT-associated chronic inflammation. We observed a significant reduced risk of AR after KT in RTR with high pretransplant sCD14 concentration. We hypothesized that LPS repeated exposure in CKD/ESRD patients could promote endotoxin tolerance and immune suppression protecting patients from acute rejection after transplantation. Yet larger prospective cohorts are needed to validate this hypothesis.

## **METHODS**

### **Patient population and samples**

Research has been conducted on biological samples collected in 146 incident renal transplant recipients (RTR) from the ORLY-Est study (Bamoulid *et al.* 2016). As we hypothesized a relationship between GBT and AR, we included more patients with acute rejection: each patient with a history of AR was matched for the main demographical characteristics, with 2 patients free from AR (SuppTable1). For each patient, blood samples were collected prior to transplantation (ESRD) and one year after. Sera were isolated by centrifugation and cryopreserved. Samples collection was performed after regulatory approval by the French ministry of health (agreement number # DC-2008-713, June 11 2009). The ethic committee of Franche-Comté has approved the study (2008). Patients enrolled in the ORLY-EST study gave their written informed consent. Clinical data were prospectively collected. For details, see the Methods in the Supporting Information section. Sera were also collected from 11 healthy anonymous volunteer donors at the Etablissement Français du Sang (EFS, Besançon, France).

### **Immunostaining**

Absolute numbers of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were determined on fresh samples by a single platform flow cytometry approach using the TetraCXP method, Flow-Count fluorospheres, and FC500 cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) according to the manufacturer's recommendations. Pro-inflammatory monocytes were stained on fresh samples with the following conjugated antibodies directed against CD45 (APC, Pharmingen), CD14 (ECD, Immunotech), CD16 (PC-7, Immunotech), HLA-DR (FITC, Pharmingen), CD86 (PE, Immunotech) according to the manufacturer's recommendations. Staining was analyzed on FC500 cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France). Pro-inflammatory monocyte percentages and counts were performed on 74 samples.

### **Endotoxemia**

Endotoxin levels were evaluated by both circulating LPS activity and total LPS quantity measured as described in Pais de Barros JP *et al.* (Pais de Barros *et al.* 2015). Biological activity of LPS was quantified in serum of 89 RTR by the end-point chromogenic Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay (QCL-1000 kit; Lonza, Walkersville, MD USA) which gives a magenta color when positive. Briefly, 50 µl of diluted plasma (1:20 dilution in endotoxin-free

water) were dispensed in each well of a 96-well plate. At the initial time point, 50µl of the LAL reagent were added to each well. The plate was shaken and incubated at 37°C for 10 minutes. Then, 100 µl of chromogenic substrate warmed to 37°C was added to each well and incubation was extended for an additional 6 minutes at 37°C. The reaction was stopped by adding 100 µl of a 25% solution of glacial acetic acid. Absorbance was measured at 405 nm on a spectrophotometer (Victor3, Perkin Elmer). Total LPS concentration was determined in serum of all 146 RTR by direct quantitation of 3-hydroxytetradecanoic acid (or 3HM) by high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry (HPLC/MS/MS). 3HM is a fatty acid of A lipid, component of LPS.

### **Soluble factors**

iFABP, LBP and sCD14 were measured in serum using enzyme-linked immunosorbent assay kits, according to the manufacture's recommendations. iFABP serum levels were diluted 1:3 and measured in 146 RTR with Hycult Biotech kit (Uden, Netherlands). LBP serum levels were diluted 1:1000 and measured in 57 RTR with Hycult Biotech kit (Uden, Netherlands). Soluble CD14 serum levels were diluted 1:400 and measured in 146 RTR with Quantikine ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN).

### **Pro-inflammatory cytokines**

The concentrations of IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, and TNF- $\alpha$  were determined in serum of 89 RTR by using a Milliplex MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel kit (Millipore, Billerica, MA). The assays were performed according to the manufacturer's instructions. Standards and samples were analyzed on a LuminexR<sup>®</sup> apparatus (Bio-Plex 200, BioRad, München, Germany) using the BioPlex Manager Software (Version 5, BioRad, Hercules, CA).

### **PLTP activity and lipoproteins**

PLTP activity was measured in serum of 89 RTR using a commercially available fluorescence activity assay from Roar Biomedical (New York, NY, USA), according to the manufacturer's instructions. This fluorimetric assay measures the transfer (unquenching) of fluorescent phospholipids from donor to acceptor synthetic liposomes. Phospholipid transfer rates were calculated using the initial slope of the phospholipid transfer curve, and were expressed as initial phospholipid transfer rate (*i.e.*, nmol/h/ml serum). Serum lipoproteins were assayed in

89 RTR using commercially available kits (Cholesterol, HDL-cholesterol and Triglycerides, Thermo Fisher Scientific, Finland) on an Indiko Clinical Chemistry analyzer (Thermo Fisher Scientific, Finland) according to the manufacturer's instructions.

### **Clinical outcomes**

Clinical outcomes occurring during the year period following KT were prospectively collected and registered by an independent committee. Definitions are available in the supplementary text in the Supporting Information section. CMV disease, opportunistic infections, severe bacterial infections, acute rejection, new onset diabetes mellitus, atherosclerotic events, graft loss, and death were defined prospectively in the ORLY-Est study.

### **Statistical analysis**

Data were expressed as means  $\pm$  SD or as percentages. Study values at transplant and one year after were compared using Wilcoxon paired t-test, others values using Mann-Whitney unpaired t-test. Spearman rank test was used to determine correlations. Discontinuous variables were compared using Khi 2 test. All p-values below 0.05 were considered statistically significant. Logistic regression was used to determine variables associated with acute rejection. We selected variables with a p value less than or equal to 0.20 to be included in the multivariate analysis. Results were expressed as Odds ratio (OR) with 95% confidence interval [CI]. Therefore when the p value was less than 0.05 after multivariate analysis, the OR was significantly different from 1, either greater than 1 (*i.e.*, risk of acute rejection is increased) or less than 1 (*i.e.*, risk of acute rejection is decreased). All statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA) and SPSS Statistics 23.0 (IBM, Chicago, USA).

### **DISCLOSURE**

The authors declared no competing interests.

## BIBLIOGRAPHY

1. Honda H, Qureshi AR, Heimbürger O, *et al.* Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD. *Am J Kidney Dis.* 2006; 47: 139-148.
2. Heine GH, Ortiz A, Massy ZA, *et al.* Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol.* 2012; 8: 362-369.
3. Carrero JJ, Stenvinkel P. Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: a hypothesis proposal. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009; 4 Suppl 1: S49-55.
4. Gansevoort RT, Correa-Rotter R, Hemmelgarn BR, *et al.* Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention. *Lancet.* 2013; 382: 339-352.
5. Sabatino A, Regolisti G, Brusasco I, *et al.* Alterations of intestinal barrier and microbiota in chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant.* 2015; 30: 924-933.
6. Estes JD, Harris LD, Klatt NR, *et al.* Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PLoS Pathog.* 2010; 6: e1001052.
7. Vaziri ND, Zhao YY, Pahl MV. Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: the nature, mechanisms, consequences and potential treatment. *Nephrol Dial Transplant.* 2016; 31: 737-746.
8. Kwan BC, Chow KM, Leung CB, *et al.* Circulating bacterial-derived DNA fragments as a marker of systemic inflammation in peritoneal dialysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2013; 28: 2139-2145.
9. Vaziri ND. Gut microbial translocation in the pathogenesis of systemic inflammation in patients with end-stage renal disease. *Dig Dis Sci.* 2014; 59: 2020-2022.
10. Andersen K, Kesper MS, Marschner JA, *et al.* Intestinal Dysbiosis, Barrier Dysfunction, and Bacterial Translocation Account for CKD-Related Systemic Inflammation. *J Am Soc Nephrol.* 2016.
11. Grant CJ, Harrison LE, Hoad CL, *et al.* Patients with CKD have abnormal upper gastrointestinal tract digestive function: a study of uremic enteropathy. *J Gastroenterol Hepatol.* 2016.
12. Magnusson M, Magnusson KE, Sundqvist T, *et al.* Impaired intestinal barrier function measured by differently sized polyethylene glycols in patients with chronic renal failure. *Gut.* 1991; 32: 754-759.
13. Park BS, Lee JO. Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes. *Exp Mol Med.* 2013; 45: e66.
14. Gautier T, Lagrost L. Plasma PLTP (phospholipid-transfer protein): an emerging role in 'reverse lipopolysaccharide transport' and innate immunity. *Biochem Soc Trans.* 2011; 39: 984-988.
15. Munford RS. Endotoxemia-menace, marker, or mistake? *J Leukoc Biol.* 2016.
16. Wong J, Vilar E, Farrington K. Endotoxemia in end-stage kidney disease. *Semin Dial.* 2015; 28: 59-67.
17. McIntyre CW, Harrison LE, Eldehni MT, *et al.* Circulating endotoxemia: a novel factor in systemic inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2011; 6: 133-141.
18. Shi K, Wang F, Jiang H, *et al.* Gut bacterial translocation may aggravate microinflammation in hemodialysis patients. *Dig Dis Sci.* 2014; 59: 2109-2117.
19. Wang F, Jiang H, Shi K, *et al.* Gut bacterial translocation is associated with microinflammation in end-stage renal disease patients. *Nephrology (Carlton).* 2012; 17: 733-738.

20. Bohrer D, Horner R, do Nascimento PC, *et al.* Interference in the Limulus amoebocyte lysate assay for endotoxin determination in peritoneal dialysis fluids and concentrates for hemodialysis. *J Pharm Biomed Anal.* 2001; 26: 811-818.
21. Pais de Barros JP, Gautier T, Sali W, *et al.* Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amoebocyte lysate assay. *J Lipid Res.* 2015; 56: 1363-1369.
22. Piton G, Capellier G. Biomarkers of gut barrier failure in the ICU. *Curr Opin Crit Care.* 2016; 22: 152-160.
23. Man AL, Bertelli E, Rentini S, *et al.* Age-associated modifications of intestinal permeability and innate immunity in human small intestine. *Clin Sci (Lond).* 2015; 129: 515-527.
24. Valentini L, Ramming S, Haas V, *et al.* Small intestinal permeability in older adults. *Physiol Rep.* 2014; 2: e00281.
25. Saltzman JR, Kowdley KV, Perrone G, *et al.* Changes in small-intestine permeability with aging. *J Am Geriatr Soc.* 1995; 43: 160-164.
26. Bossola M, Sanguinetti M, Scribano D, *et al.* Circulating bacterial-derived DNA fragments and markers of inflammation in chronic hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2009; 4: 379-385.
27. Szeto CC, Kwan BC, Chow KM, *et al.* Circulating bacterial-derived DNA fragment level is a strong predictor of cardiovascular disease in peritoneal dialysis patients. *PLoS One.* 2015; 10: e0125162.
28. Galbois A, Thabut D, Tazi KA, *et al.* Ex vivo effects of high-density lipoprotein exposure on the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in patients with severe cirrhosis. *Hepatology.* 2009; 49: 175-184.
29. Maheshwari N, Ansari MR, Darshana MS, *et al.* Pattern of lipid profile in patients on maintenance hemodialysis. *Saudi J Kidney Dis Transpl.* 2010; 21: 565-570.
30. Dautin G, Soltani Z, Ducloux D, *et al.* Hemodialysis reduces plasma apolipoprotein C-I concentration making VLDL a better substrate for lipoprotein lipase. *Kidney Int.* 2007; 72: 871-878.
31. Lim HJ, Koo TY, Lee J, *et al.* Health-Related Quality of Life of Kidney Transplantation Patients: Results from the KoreaN Cohort Study for Outcome in Patients With Kidney Transplantation (KNOW-KT) Study. *Transplant Proc.* 2016; 48: 844-847.
32. Rao S, Ghanta M, Moritz MJ, *et al.* Long-Term Functional Recovery, Quality of Life, and Pregnancy After Solid Organ Transplantation. *Med Clin North Am.* 2016; 100: 613-629.
33. Foit L, Thaxton CS. Synthetic high-density lipoprotein-like nanoparticles potentially inhibit cell signaling and production of inflammatory mediators induced by lipopolysaccharide binding Toll-like receptor 4. *Biomaterials.* 2016; 100: 67-75.
34. Lagrost L, Girard C, Grosjean S, *et al.* Low preoperative cholesterol level is a risk factor of sepsis and poor clinical outcome in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. *Crit Care Med.* 2014; 42: 1065-1073.
35. Rekers NV, Bajema IM, Mallat MJ, *et al.* Beneficial Immune Effects of Myeloid-Related Proteins in Kidney Transplant Rejection. *Am J Transplant.* 2016; 16: 1441-1455.
36. Leentjens J, Kox M, van der Hoeven JG, *et al.* Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis: from immunosuppression to immunostimulation. Time for a paradigm change? *Am J Respir Crit Care Med.* 2013; 187: 1287-1293.
37. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* 2009; 30: 475-487.
38. Li P, Liu H, Zhang Y, *et al.* Endotoxin Tolerance Inhibits Degradation of Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 3 by Suppressing Pellino 1 Expression and the K48 Ubiquitin Ligase Activity of Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2. *J Infect Dis.* 2016; 214: 906-915.
39. Anders HJ, Andersen K, Stecher B. The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease. *Kidney Int.* 2013; 83: 1010-1016.

40. Lopez-Collazo E, del Fresno C. Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences. *Crit Care*. 2013; 17: 242.
41. Testro AG, Visvanathan K, Skinner N, *et al*. Acute allograft rejection in human liver transplant recipients is associated with signaling through toll-like receptor 4. *J Gastroenterol Hepatol*. 2011; 26: 155-163.
42. Balagopal A, Barin B, Quinn J, *et al*. Immunologic Predictors of Liver Transplantation Outcomes in HIV-HCV Co-Infected Persons. *PLoS One*. 2015; 10: e0135882.
43. Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, *et al*. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int*. 2005; 67: 2454-2461.
44. Vatanen T, Kostic AD, d'Hennezel E, *et al*. Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans. *Cell*. 2016; 165: 842-853.
45. Fricke WF, Maddox C, Song Y, *et al*. Human microbiota characterization in the course of renal transplantation. *Am J Transplant*. 2014; 14: 416-427.
46. Vindigni SM, Surawicz CM. The gut microbiome: a clinically significant player in transplantation? *Expert Rev Clin Immunol*. 2015; 11: 781-783.
47. Lee JR, Muthukumar T, Dadhania D, *et al*. Gut microbial community structure and complications after kidney transplantation: a pilot study. *Transplantation*. 2014; 98: 697-705.
48. Lee JR, Muthukumar T, Dadhania D, *et al*. Gut microbiota and tacrolimus dosing in kidney transplantation. *PLoS One*. 2015; 10: e0122399.
49. Malinowski M, Martus P, Neuhaus P, *et al*. The influence of commonly used immunosuppressive drugs on the small bowel functions - a comparative experimental study. *Ann Transplant*. 2009; 14: 38-44.
50. Malinowski M, Martus P, Lock JF, *et al*. Systemic influence of immunosuppressive drugs on small and large bowel transport and barrier function. *Transpl Int*. 2011; 24: 184-193.
51. Bamoulid J, Courivaud C, Crepin T, *et al*. Pretransplant thymic function predicts acute rejection in antithymocyte globulin-treated renal transplant recipients. *Kidney Int*. 2016; 89: 1136-1143.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by grants from the Fondation Transplantation, the PHRC 2005 and 2011 (to DD), the Fondation de France (Appel d'offre "Maladies Cardiovasculaires" 2007 No. 2007 001859 [to PS]), the DHOS/INSERM/INCa (Appel d'offre Recherche Translationnelle 2008 [to DD and PS]), and the APICHU 2010 (to JB), from the Agence Nationale de la Recherche (Labex LipSTIC, ANR-11-LABX-0021) and the Région de Franche-Comté (support to Labex LipSTIC [to PS] 2016). JB received financial support from the Fondation Transplantation (No. ET-031211 and No. ET-050320). This work is a part of the RIALTO (Research in Immunology of Atherosclerosis after TransplantatiOn) program. This work is supported by the Fédération hospitalo-universitaire INCREASE (INtegrated Centre for Research in Inflammatory DisEASEs).

## **SUPPLEMENTARY DATA**

### **Methods**

#### **Description of the ORLY-EST study**

The ORLY-Est study is a prospective observational study designed to assess immunologic factors predictive of post-transplant atherosclerotic events. Seven French transplant centers (Besançon, Dijon, Nancy, Kremlin-Bicetre, Clermont-Ferrand, Reims and Strasbourg) participate in this study. To date, 934 patients have been enrolled. Samples were collected and sent to the Biomonitoring Platform (CIC-BT506, EFS Besançon, France) for processing and storage.

### **Clinical outcomes**

#### ***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.

#### ***Acute rejection***

Acute rejection was considered in the presence of serum creatinine elevation. All episodes of treated acute rejection and biopsy-proven acute rejection were considered separately. Acute rejection was defined according to the Banff classification (2). Systematic biopsies were not performed at any time of the study period.

#### ***Severe bacterial infections***

Diagnosis of severe bacterial infections required bacterial infection-related hospitalization.

### ***CMV disease***

Diagnosis of CMV disease required the presence of viral replication and a treatment by ganciclovir.

### ***Opportunistic infections***

Occurrence of opportunistic infections (*Pneumocystis carinii*, tuberculosis, Epstein-Barr virus, toxoplasmosis, aspergillosis, zoster infection, *Legionella pneumophila*) was recorded.

### ***New onset diabetes mellitus (NODAT)***

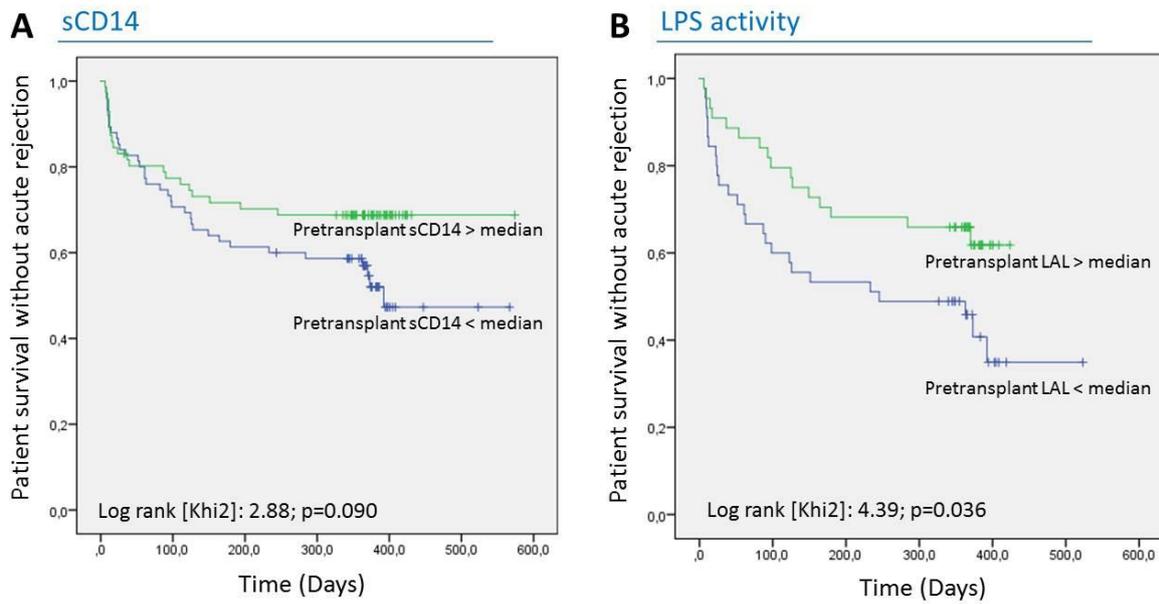
NODAT was defined according to the 2003 International Consensus Guidelines on Diabetes Mellitus in Transplantation (3). This definition is based on the currently accepted criteria proposed by the Canadian Diabetes Association. In summary, diabetes is defined by a casual glucose value of  $\geq 11.1$  mmol/L, or a fast plasma glucose (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.

### ***Graft Loss***

Graft loss was defined as a continuous recourse to dialysis above a 3 months period.

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

**Figure**



**Supplementary Figure 1: Patient survival without acute rejection.** Survival without acute rejection according to pretransplant concentrations of sCD14 separated by the median (2.26  $\mu\text{g/ml}$ ) (A). Survival without acute rejection according to pretransplant concentrations of LPS activity measured by the LAL assay separated by the median (5.83 EU/ml) (B). Statistical analyses were performed by Kaplan Meier test.



## 2. Discussion de l'article

### 2.1. **Prise en charge du LPS circulant**

Cette étude montre que la transplantation rénale ne semble corriger que partiellement la TBD puisque nous rapportons des concentrations d'iFABP et de LPS total significativement plus importantes que chez les donneurs sains à un an de la transplantation rénale. Néanmoins, l'activité du LPS mesurée par la technique LAL diminue un an après transplantation ce qui suggère une meilleure prise en charge du LPS après transplantation. Nous avons observé une augmentation des lipoprotéines après transplantation qui pourrait augmenter la capacité de neutralisation du LPS expliquant la diminution de son activité (LAL) et la diminution de toute la cascade inflammatoire associée (diminution de LBP, sCD14, cytokines inflammatoires et monocytes inflammatoires). Les patients insuffisants rénaux chroniques avant transplantation présentent une dyslipidémie avec une hypertriglycéridémie, une augmentation des lipoprotéines-a et une diminution du HDL et de l'apoC-1 (Dautin *et al.* 2007, Maheshwari *et al.* 2010). Cette dyslipidémie se corrige après transplantation, probablement en association avec l'amélioration de la qualité de vie, de la nutrition et la prescription de statines (Lim *et al.* 2016, Rao *et al.* 2016).

Nous n'avons pas montré directement que l'endotoxémie contribue à l'inflammation chronique puisque nous n'avons pas retrouvé de corrélations entre le LPS et les marqueurs d'inflammation. Dans une étude chez les hémodialysés, Terawaki *et al* ont décrit une association entre le LPS et la CRP (Terawaki *et al.* 2010). L'impact biologique du LPS circulant est dépendant de sa disponibilité. Ce travail souligne donc l'importance d'étudier à la fois la voie de l'inflammation, activée consécutivement à la présence de LPS dans la circulation, et la voie de neutralisation du LPS par les lipoprotéines, mais également l'intérêt de réaliser à la fois un dosage quantitatif du LPS total, mesuré par spectrophotométrie, et un dosage de son activité biologique, mesurée par le test LAL. En effet, dans le sérum, les lipoprotéines et d'autres types de protéines sont capables de prendre en charge le LPS et de diminuer l'activité du LPS dosée par le test LAL (Pais de Barros *et al.* 2015). Nous n'avons pas réalisé un dosage du gène l'*ARNr 16S*, ce qui permettrait d'évaluer non seulement la présence de bactéries à Gram négatif mais aussi à Gram positif. Dans notre projet, nous pourrions aussi évaluer la différence

de capacité de neutralisation du LPS dans le sérum, entre les patients insuffisants rénaux chroniques, les patients transplantés et les donneurs sains, par ajout d'une concentration connue de LPS dans les différents sera. Si les résultats montrent qu'il y a autant de LPS total dans tous les échantillons mais que le dosage d'activité diminue dans les échantillons des transplantés, cela pourraient nous permettre de confirmer que le LPS est mieux pris en charge après transplantation.

## **2.2. Implication clinique de la translocation bactérienne digestive**

Au niveau clinique, nous nous sommes intéressés à l'impact du LPS circulant sur le rejet aigu. Le rejet aigu est un événement clinique dont l'incidence est relativement précoce, dès les premiers jours de la transplantation. Le LPS pourrait être une source de stimulation antigénique à l'origine d'une réactivation de l'immunité du receveur favorisant le rejet aigu. Cependant, notre étude a montré qu'un taux élevé de sCD14 avant transplantation est associé à une diminution du risque de rejet aigu à un an. Nous suggérons l'hypothèse de l'existence d'un phénomène de tolérance aux endotoxines pour expliquer ce résultat. Il semble qu'une habitude progressive à l'exposition aux endotoxines puisse permettre au système immunitaire de s'adapter et de devenir plus tolérant [revue, (Lopez-Collazo *et al.* 2013)]. La stimulation persistante de TLR induit un état réfractaire subséquent dans lequel coexistent l'immunostimulation et l'immunosuppression. La tolérance aux endotoxines a été rapportée dans plusieurs pathologies telles que la fibrose kystique, le syndrome coronarien aigu, les traumatismes et la pancréatite, mais plus largement décrit dans le cadre du sepsis [revue, (Lopez-Collazo *et al.* 2013)]. En effet, la première phase de l'infection est associée à une hyper-inflammation aiguë. Cette hyper-réaction a pour but d'éliminer le pathogène. Plus tardivement, des signes d'immunosuppression associés à une réaction anti-inflammatoire secondaire sont repérés [revue, (Biswas *et al.* 2009)]. De multiples mécanismes sont impliqués : (i) le dysfonctionnement des neutrophiles et la perte de l'expression membranaire de HLA-DR diminuent leur capacité à s'activer ; (ii) l'expression de récepteurs inhibiteurs par les lymphocytes tels que PD-1 (*programmed death-1*) ou CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) favorise l'apoptose des LT ; (iii) la libération de cytokines anti-inflammatoires [revue, (Leentjens *et al.* 2013)]. Ces dysfonctionnements entraînent une « immunoparalyse » et une immunosuppression pouvant rendre les patients plus sensibles aux infections opportunistes (Landelle *et al.*

2010). Ainsi, les patients ayant été exposés de façon chronique au LPS avant transplantation rénale, seraient moins sensibles aux stimulations antigéniques après transplantation, suite à une diminution de la présentation des antigènes par les monocytes et à la présence d'un environnement cytokinique tolérogène, préservant les patients du rejet aigu [revue, (Biswas *et al.* 2009)]. Le rôle de l'immunité innée dans le rejet de greffe d'organes solides n'est pas encore bien caractérisé, mais elle semble fortement impliquée. L'ischémie-reperfusion au moment de la greffe libère des molécules capables d'activer l'inflammation et les molécules d'adhésion, ce qui amplifie la présentation des antigènes et la stimulation de l'immunité adaptative à l'origine du rejet. Une faible réactivité de l'immunité innée par la voie des TLR après ischémie-reperfusion pourrait prévenir la réaction immunitaire et diminuer le développement d'une réponse allogénique et ainsi du rejet aigu [revue, (Braza *et al.* 2016)]. Par ailleurs, une étude a montré que les Treg expriment TLR-4 et que la présence du LPS favorise leur survie, leur prolifération et leurs fonctions suppressives, ce qui peut participer à la prévention du rejet chez nos patients (Caramalho *et al.* 2003). Nous n'avons pas, dans notre étude, les éléments cellulaires et mécanistiques nous permettant de soutenir clairement notre hypothèse. Cependant, des résultats similaires ont été retrouvés en transplantation du foie où de fortes concentrations de sCD14 ou une faible capacité d'activation de TLR-4 étaient associées à moins de rejet aigu (Testro *et al.* 2011, Balagopal *et al.* 2015). La capacité d'activation de TLR-4 peut également venir du polymorphisme que l'on observe pour ce récepteur (Read *et al.* 2001, Agnese *et al.* 2002). Le polymorphisme Asp299Gly est responsable d'une réactivité altérée de TLR4 au LPS, suite à une diminution de la phosphorylation de NF- $\kappa$ B (Long *et al.* 2014). Notre équipe a précédemment rapporté une diminution des rejets chez les patients transplantés présentant un polymorphisme Asp299Gly ou Thr399Ile de TLR-4 (Ducloux *et al.* 2005). Une étude complète de la présence d'une immunosuppression et de la capacité de réponse au LPS *via* TLR-4 serait indispensable pour tester précisément les hypothèses émises. Par ailleurs, la capacité du LPS à activer les monocytes ne vient pas seulement de la fonctionnalité du récepteur mais de la structure même du LPS. Les différents LPS peuvent entrer en compétition au niveau des récepteurs à l'origine d'une diminution de la signalisation des LPS les plus antigéniques. En effet, dans une récente étude, Vatanen *et al* montrent que le microbiote est différent dans 3 pays assez proches géographiquement : la Finlande, l'Estonie et la Russie. Les enfants habitant dans les pays

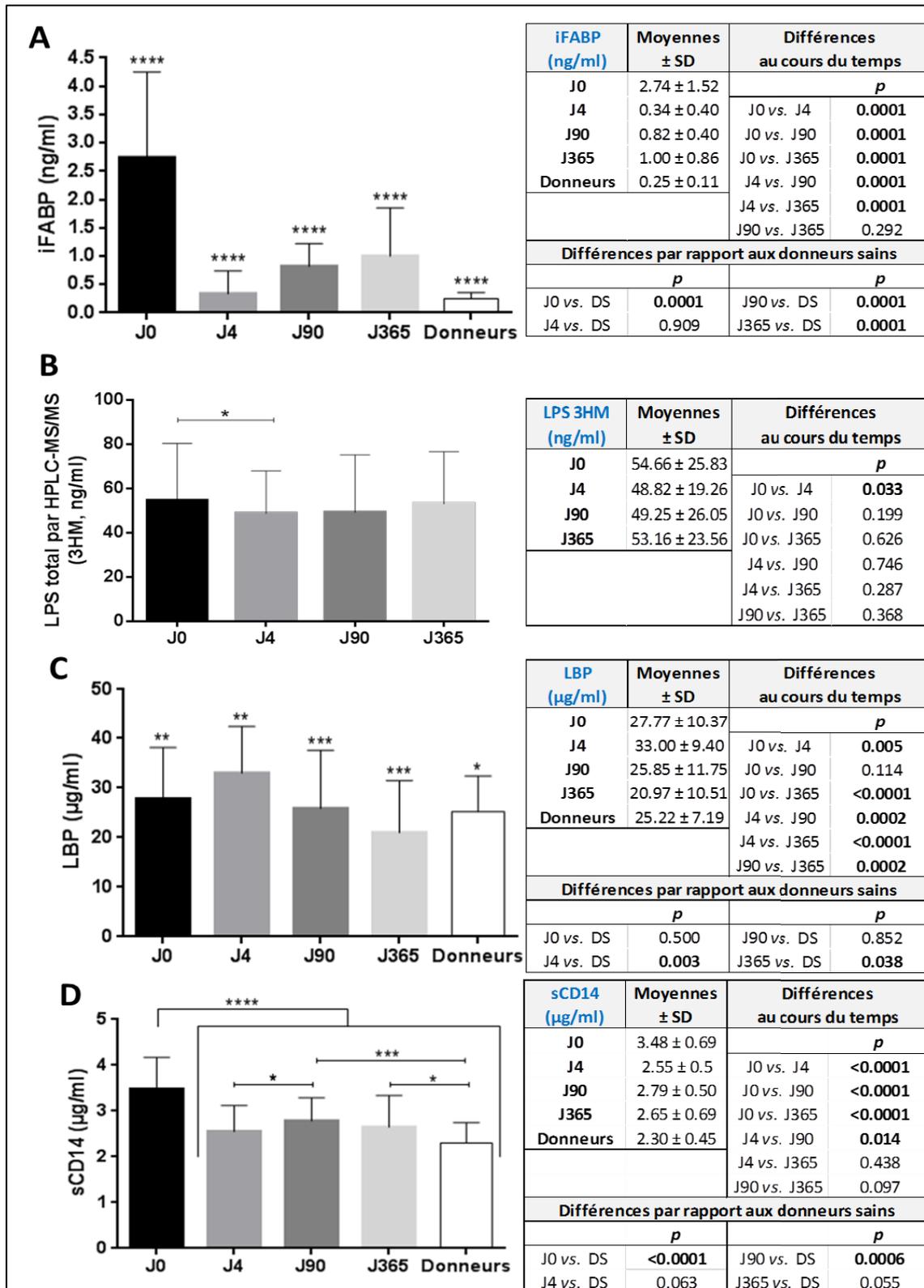
à plus haut niveau de vie, à savoir la Finlande et l'Estonie, ont présentés une plus forte proportion de *Bacteroidetes* que les enfants vivant en Russie, pays avec un moins bon niveau de vie. En parallèle, ils ont pu s'apercevoir que la prévalence de maladies auto-immunes et allergiques est plus importante en Finlande et en Estonie qu'en Russie. Les auteurs montrent que le LPS extrait des *Bacteroides* inhibe la puissante stimulation immunitaire induite par le LPS dérivé d'*E. coli*, ce qui favoriserait l'auto-immunité (Vatanen *et al.* 2016). Une étude de la composition du microbiote serait donc intéressante pour déterminer quels genres bactériens et donc quels sous-types de LPS sont majoritairement présents. Cependant, certaines bactéries ont une meilleure capacité à transloquer; un séquençage des gènes bactériens retrouvés dans la circulation sanguine pourrait permettre de mieux définir le type de LPS présent. Dans le cadre de notre projet, nous aimerions analyser par spectrophotométrie les sous-types de LPS circulants en fonction du nombre de carbones présents dans leurs structures du lipide A, leurs conférants un caractère plus ou moins activateur de la réponse immunitaire.

Après transplantation, l'amélioration de la survie sans maladies cardiovasculaires, par rapport à l'IRC, pourrait être en partie liée à la diminution de l'inflammation chronique, observée dans ce travail ainsi que dans les travaux de Simmons *et al* (Simmons *et al.* 2005). L'infection VIH est associée à une élévation de l'IL-6, du sCD14 et des D-dimères, qui sont à leur tour associés à la mortalité (So-Armah *et al.* 2016). Aussi, une diminution de la survie des insuffisants rénaux chroniques est relative à l'augmentation des concentrations en sCD14 (Raj *et al.* 2009, Poesen *et al.* 2015). L'incidence des maladies cardio-vasculaires est fréquente mais assez tardive après transplantation rénale (Prakash *et al.* 2012); ce qui pourrait expliquer le fait que nous n'avons pas observé d'effet de la TBD sur ces pathologies dans notre étude sur les transplantés. Aussi, l'endotoxémie a été décrite comme facteur de risque de l'incidence du diabète (Lassenius *et al.* 2011). Il serait donc intéressant d'étudier à plus long terme l'impact de ces phénomènes sur l'incidence de ces événements cliniques. Kane *et al* ont rapporté les incidences des infections, du besoin d'hémodialyse et la perte du greffon post-transplantation rénale en fonction de la présence d'une TBD chez les donneurs, évaluée par culture bactérienne des ganglions iléo-caecaux. Aucune différence significative n'a été retrouvée. Un état de translocation chez le donneur ne semble pas prédictif d'une TBD chez le receveur après sa transplantation (Kane *et al.* 1997).

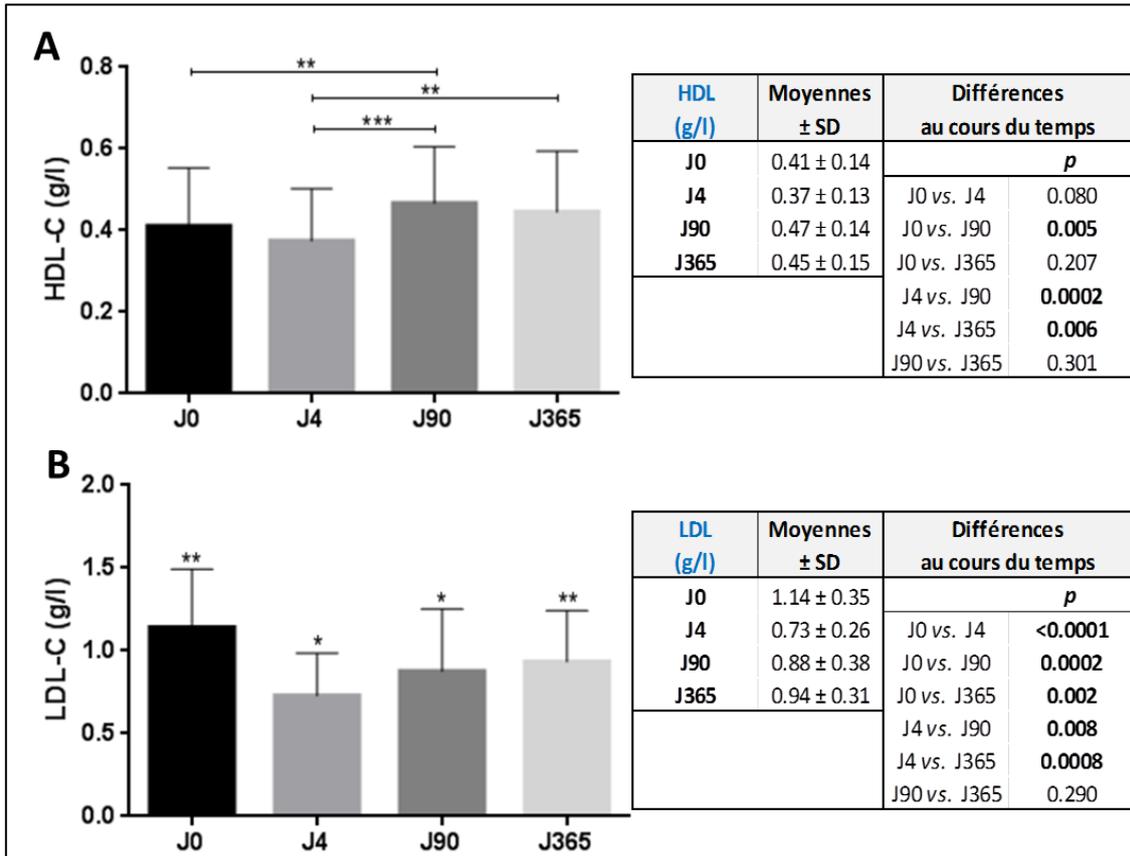
### **2.3. Cinétique des biomarqueurs relatifs à la translocation bactérienne digestive au cours de la première année après transplantation**

D'autres événements cliniques et des changements thérapeutiques se produisent durant la première année après transplantation c'est pourquoi il serait également intéressant de réévaluer les biomarqueurs de TBD à des temps plus précoces. Nous avons des résultats préliminaires des dosages d'iFABP, de la quantité de LPS, de la LBP, de sCD14 et des lipoprotéines, à des temps plus précoces (J4 et J90) sur 46 patients de l'étude GABII (données non publiées) (**figure 28 et 29**). Les dosages ont été réalisés avec les mêmes techniques que celles décrites dans la publication précédente. Les autres biomarqueurs non présentés à ce jour seront dosés tous ensemble à la fin de l'étude afin d'éviter les biais d'interprétation possibles.

Globalement, les résultats préliminaires obtenus à J0 et un an dans l'étude GABII, ont confirmé ce que nous avons précédemment décrit dans l'étude publiée. Les concentrations en iFABP, de LBP, sCD14 et LDL sont plus faibles un an après transplantation. Les concentrations de LDL ont diminuées entre J0 et un an dans cette étude alors qu'elles augmentaient dans l'étude réalisée sur les patients d'ORLY-Est. Le LPS total ne varie pas après transplantation alors que le HDL est présent à des taux plus élevés à un an qu'à J0. Nous avons pu observer que les variations des marqueurs au cours de la première année étaient importantes. A J4, nous avons observé une nette amélioration de la TBD. En effet, à l'exception de l'augmentation de la LBP, nous avons retrouvé une diminution de l'ensemble des marqueurs, même du LPS total. Généralement, les niveaux de concentrations à J4 étaient similaires à ceux retrouvés chez les donneurs sains. Par contre, il semble que cette amélioration n'est pas définitive. En effet, à J90 nous avons noté une ré-ascension de l'ensemble des marqueurs qui restaient stables jusqu'à un an après transplantation. Seule la LBP présente des concentrations décroissantes de J4 à un an (**figure 28 et 29**).



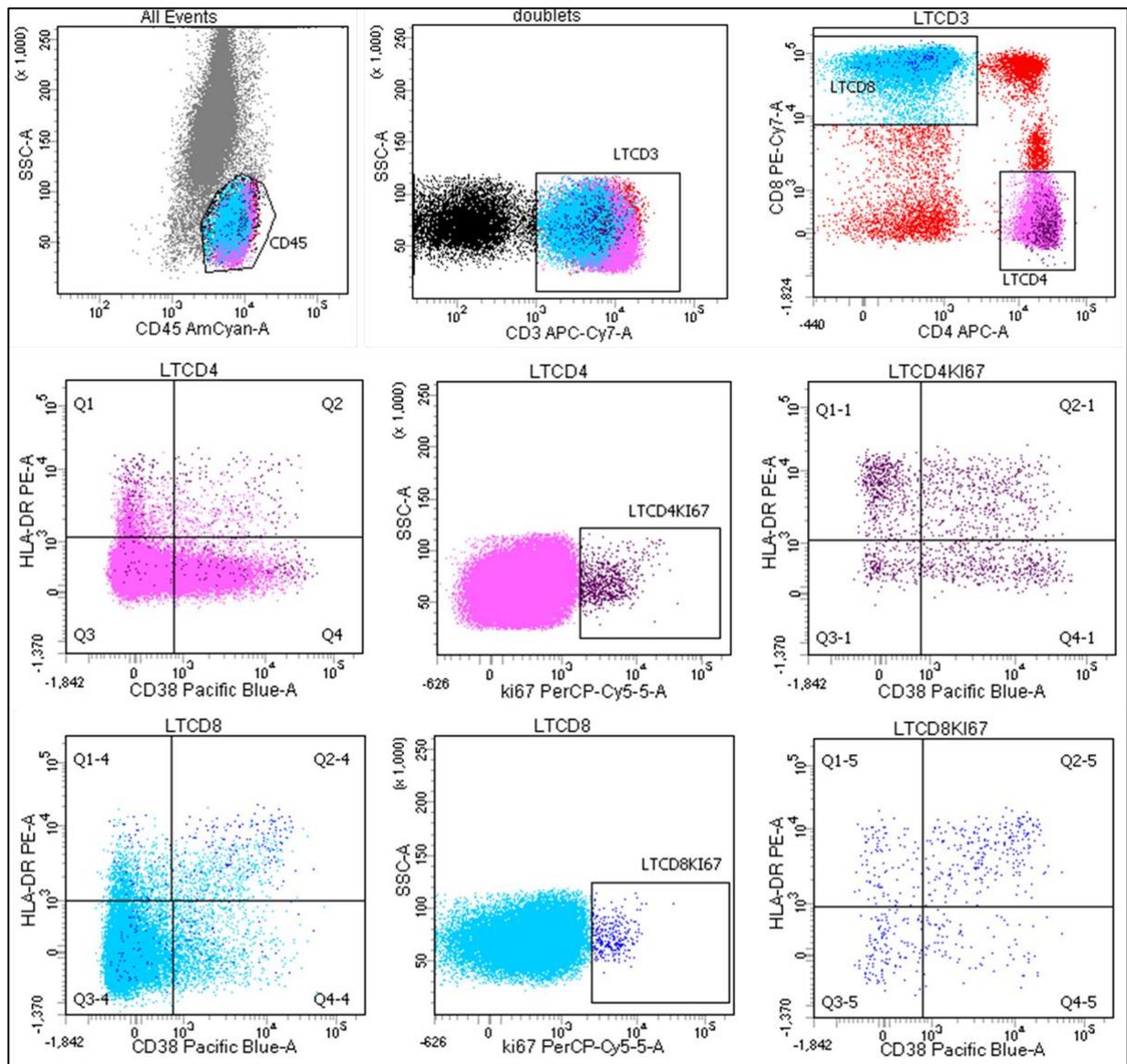
**Figure 28 :** Concentrations des biomarqueurs relatifs à la translocation bactérienne digestive avant et après transplantation rénale dans la cohorte GABII. Concentrations d'iFABP en ng/ml avant et après transplantation rénale en comparaison aux donneurs sains (A). Concentrations de LPS total en ng/ml avant et après transplantation rénale (B). Concentrations de LBP et de sCD14 en µg/ml avant et après transplantation rénale en comparaison aux donneurs sains (C et D). Les moyennes sont rapportées dans le tableau de droite. NS= non significatif ; \*p<0.05.



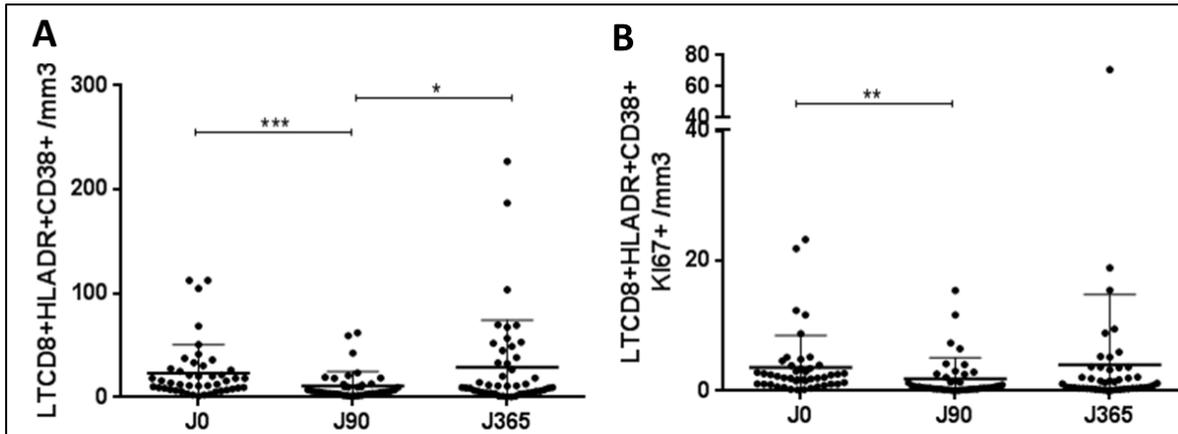
**Figure 29: Concentrations des biomarqueurs relatifs à la translocation bactérienne digestive avant et après transplantation rénale dans la cohorte GABII (2).** Concentrations de HDL (A) et de LDL (B) cholestérol en g/l avant et après transplantation rénale. Les moyennes sont rapportées dans les tableaux de droite. NS= non significatif ; \*p<0.05

Ces résultats montrent que la transplantation améliore rapidement la TBD mais de manière transitoire. En effet, à 3 mois et un an après transplantation, il semble que l'on observe à nouveau un état de translocation et d'inflammation. La diminution des marqueurs à J4 pourrait témoigner d'une dilution sérique des marqueurs suite à l'hypervolémie induite par le remplissage hydroélectrolytique en période post-opératoire. Cependant, la LBP augmente à J4, ce qui ne semble pas conforter l'hypothèse de la dilution des marqueurs. La LBP est une protéine inductible, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la LBP consécutive et rapide après transplantation. L'inflammation engendrée par la chirurgie et l'ischémie-reperfusion serait indépendante de l'activation de l'inflammation par le LPS mais capable de déclencher la synthèse de LBP et d'autres protéines inductibles telles que la PLTP [revue, (Braza *et al.* 2016)]. L'ensemble de ces résultats devront être interprétés dans leur globalité à l'issue de l'étude GABII.

Le LPS est un PAMP, il peut donc être reconnu par les CPA et favoriser la stimulation et l'activation des LT envers ces antigènes. De nombreuses études ont montré que la TBD est associée à une activation immunitaire traduite notamment par l'augmentation des LT activés. Dans l'étude GABII, nous avons pu réaliser le marquage des LT activés (HLA-DR<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) et de la capacité de prolifération des LT (marqueur Ki67) (**figure 30**), à J0, J90 et J365. Nous avons observé une diminution significative de la proportion et du nombre de LT CD8<sup>+</sup> activés à J90 comme nous l'avons observé pour les LT sénescents, alors qu'entre J90 et un an, le nombre de LT activés augmente à nouveau (**figure 31**). Par ailleurs, aucune différence significative de proportions ou de nombre de LT activés n'a été observée en fonction du traitement d'induction utilisé (données non montrées). L'interprétation de l'activation T après transplantation peut être discutée compte-tenu de l'utilisation de traitements immunosuppresseurs qui pourrait bloquer cette population. Chez des patients transplantés rénaux traités par ATG, l'équipe de Lorio *et al* a montré des résultats similaires aux nôtres. Ils ont d'abord rapporté que les LT CD3<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> étaient plus importants chez les patients VIH<sup>+</sup> avant transplantation que chez les patients séronégatifs. Dans les deux populations, les auteurs ont observé une diminution des LT CD3<sup>+</sup>HLADR<sup>+</sup> à 3 mois puis une augmentation progressive entre 3 et 6 mois puis jusqu'à un an après la transplantation. L'immunosuppression ne semble pas diminuer la présence de LT activés (Lorio *et al.* 2016). Ce résultat pourrait s'expliquer par l'activation des LT périphériques secondairement à la déplétion lymphocytaire ou également par une activation des LT par les endotoxines ou les autres infections retrouvées après transplantation rénale. Nous n'avons pas retrouvé de corrélations entre les LT activés et le LPS et les marqueurs d'inflammation, ni avant ni au décours de la transplantation. Dans une autre étude chez les patients VIH<sup>+</sup>, Wittkop *et al* n'ont pas retrouvé de corrélation entre les LT CD8<sup>+</sup>HLA-DR<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> et l'endotoxémie. C'est la maladie à CMV qui est associée à l'activation immunitaire (Wittkop *et al.* 2013). Les études sur l'implication de la TBD dans l'activation lymphocytaire doivent être poursuivies en prenant en compte le statut CMV après transplantation.



**Figure 30 : Stratégie d'analyse des LT activés en cytométrie en flux à partir de sang total.** Exemple chez un patient. Le CD45 permet la sélection des cellules leucocytaires du sang total. Ensuite nous avons éliminé les doublets et sélectionné les LT CD3<sup>+</sup> au sein desquels nous avons fait une séparation des LT CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> et CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. Ensuite à la fois parmi les CD4 et parmi les CD8, nous avons analysé les sous-populations lymphocytaires selon leurs phénotypes caractéristiques de l'activation (HLADR<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>) et de la prolifération (Ki67<sup>+</sup>) et l'activation et la prolifération cumulées (HLADR<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>Ki67<sup>+</sup>). Le sang total a été lysé pour éliminer les globules rouges. Le marquage a été réalisé en incubant les cellules d'abord avec les anticorps membranaires puis intracellulaires après perméabilisation (kit ebiosciences). Les cellules ont été analysées sur le FACSCantoII (BD Biosciences) et les données ont été analysées avec le logiciel DIVA.

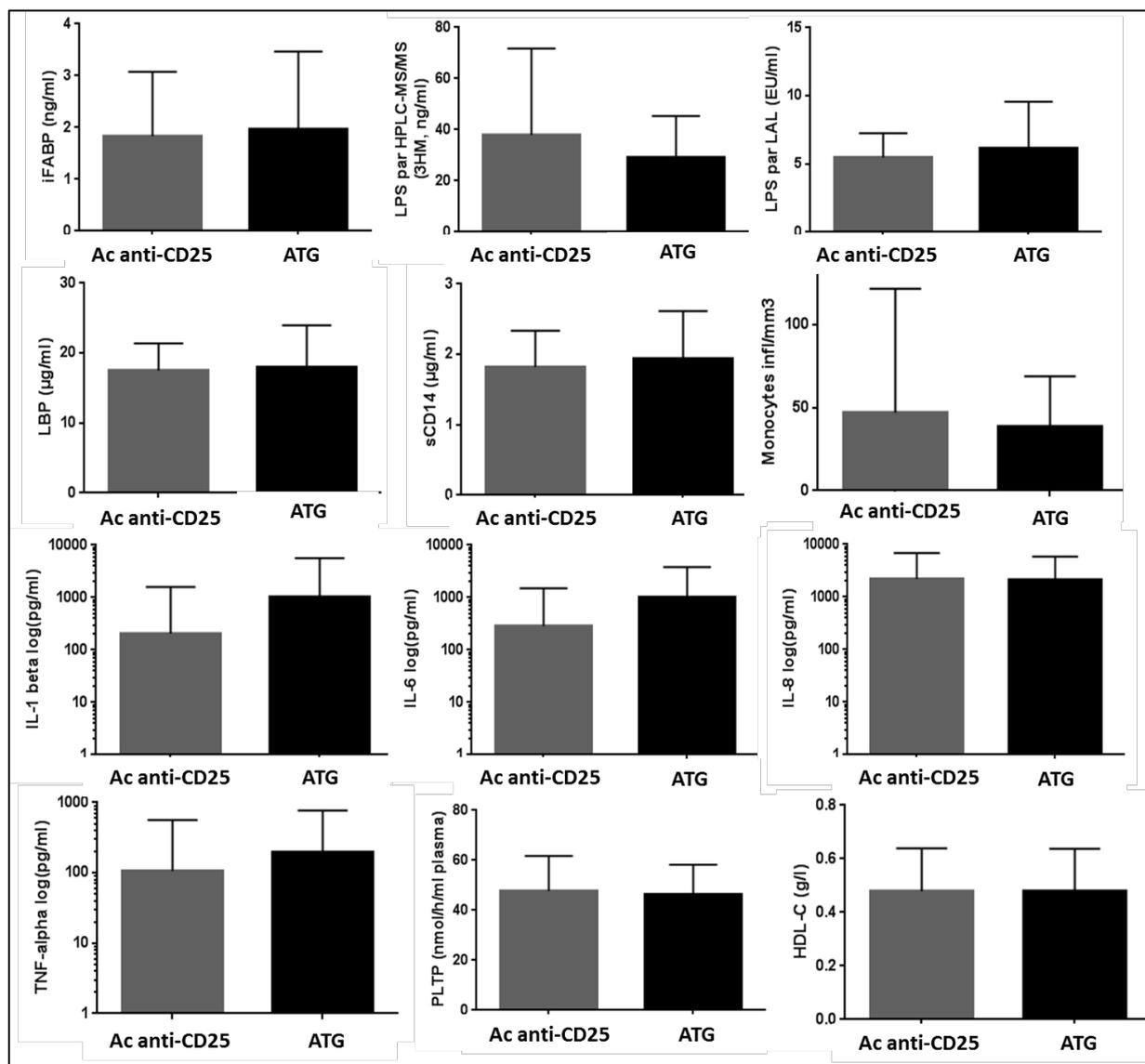


**Figure 31 :** LT circulants de phénotype activé après transplantation rénale. Evolution du nombre de LT CD8+HLADR+CD38+ après transplantation (A). Evolution du nombre de LT CD8+HLADR+CD38+ Ki67+ après transplantation (B). Les barres représentent les moyennes, \*p<0.05, \*\*p<0.01 et \*\*\*p<0.001.

### 2.3. Effet des GALP sur la translocation bactérienne digestive

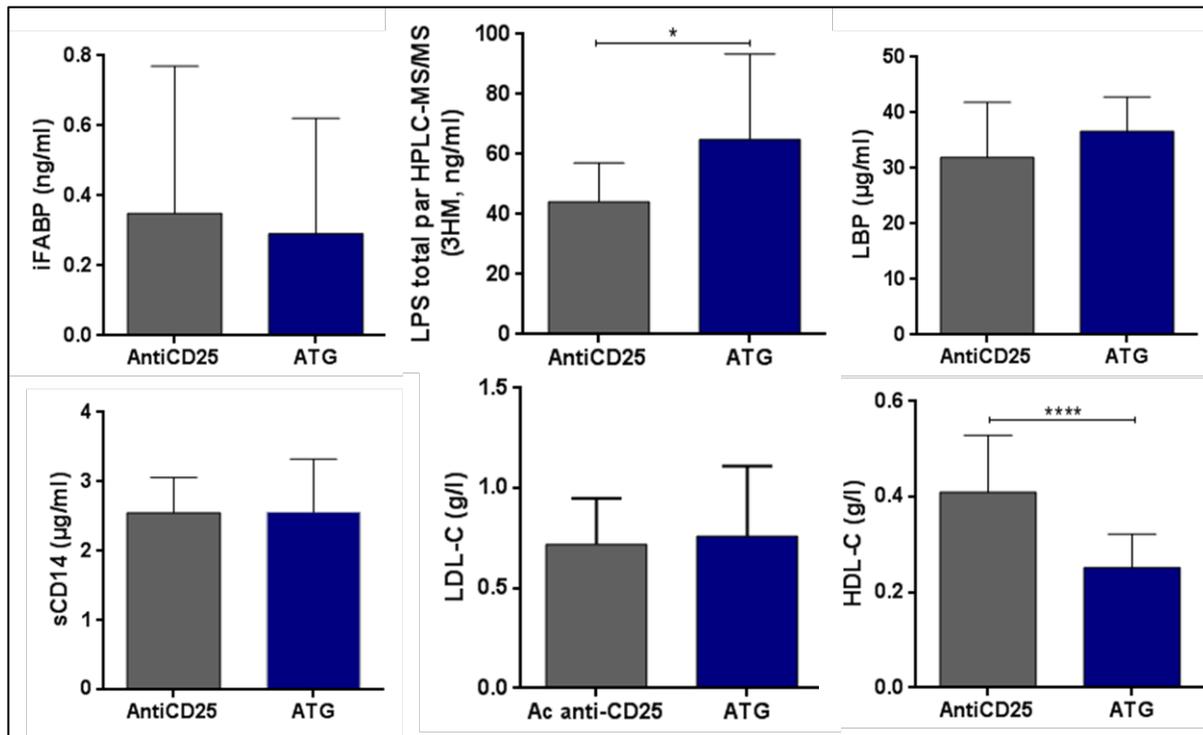
Nous avons suggéré l'hypothèse de l'existence d'une toxicité digestive des GALP sur les cellules immunitaires de la muqueuse intestinale, favorisant la rupture de la barrière intestinale et potentialisant la TBD et la sénescence observées après GALP en transplantation rénale. Nous avons donc analysé les différences de concentrations des biomarqueurs relatifs à la TBD et à l'inflammation en fonction de l'induction. Nous avons séparés les patients que nous avons sélectionnés pour la publication en 2 groupes en fonction du traitement d'induction : 56 patients ont reçus des GALP et 89 patients ont été traités avec l'Ac anti-CD25. La comparaison entre les 2 groupes a d'abord été réalisée à J0. Avant transplantation, les concentrations de cytokines proinflammatoires étaient significativement plus faibles dans le groupe Ac anti-CD25 que dans le groupe GALP (respectivement,  $338 \pm 1329$  vs.  $1180 \pm 2655$  pg/ml,  $p=0,003$  pour IL-1 $\beta$  ;  $663 \pm 2015$  vs.  $2144 \pm 3305$  pg/ml,  $p=0,0001$  pour IL-6 ;  $3362 \pm 5509$  vs.  $5503 \pm 4252$  pg/ml,  $p=0,015$  pour IL-8 ; et  $94 \pm 328$  vs.  $252 \pm 406$  pg/ml,  $p<0,0001$  pour TNF- $\alpha$ ). La comparaison entre les 2 groupes a ensuite été réalisée à J365. A un an de la transplantation, nous n'avons observé aucune différence sur l'ensemble des biomarqueurs de TBD de l'inflammation entre les groupes GALP et Ac anti-CD25 (**figure 32**). Les cytokines inflammatoires ne sont pas différentes à un an alors qu'elles l'étaient à J0. Cela ne semble pas traduire un effet potentialisant des Ac anti-CD25 sur l'inflammation car ce

résultat est dû à une diminution de la concentration des cytokines pro-inflammatoires dans le groupe GALP un an après transplantation (effet décrit dans toute la population après transplantation), et non pas à une augmentation de l'inflammation dans le groupe Ac anti-CD25. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent l'absence de potentialisation de la TBD par les GALP.



**Figure 32 :** Comparaison à un an des marqueurs de translocation bactérienne digestive selon le traitement d'induction reçu à J0 par les patients de l'étude ORLY-Est, Ac anti-CD25 vs. GALP (ATG). Aucune différence significative n'a été observée un an après transplantation suite à une comparaison des concentrations de chacun des marqueurs selon le traitement d'induction.

Cependant, l'implication des GALP dans la TBD pourrait être plus précoce, au moment de l'induction, c'est pourquoi nous avons effectué les mêmes comparaisons sur les patients issus de l'étude GABII. Sur les 46 patients étudiés, nous avons pu comparer 10 patients ayant reçus des GALP contre 36 ayant reçus l'Ac anti-CD25. A J90 ainsi qu'à un an après transplantation, nous n'avons pas retrouvé de différence significative de concentrations entre les groupes (y compris pour les LT activés). Cependant, à J4, nous avons observé des concentrations plus importantes de LPS et des concentrations plus faibles de HDL dans le groupe traité par ATG (respectivement,  $65.0 \pm 28.5$  vs.  $44.2 \pm 12.9$  ng3HM/ml,  $p=0.014$  et  $0.25 \pm 0.07$  vs.  $0.41 \pm 0.12$ ,  $p<0.0001$ ) (**figure 33**). Les autres marqueurs n'étaient pas différents entre les groupes à J4. Ces résultats suggèrent que les GALP pourraient avoir une implication sur la translocation du LPS mais uniquement au moment de l'induction. L'augmentation du LPS dans le groupe GALP semble assez isolée et non associée à une augmentation de l'inflammation. La diminution des HDL en regard de l'augmentation du LPS pourrait traduire une augmentation de l'élimination des HDL pour augmenter la neutralisation du LPS. Un potentiel impact des GALP au moment de leur administration sur la TBD devra être confirmé par des mesures directes de la perméabilité par des tests aux sucres ou des tests sur des biopsies. Pour le moment, aucune conclusion ne peut être tirée quant à l'effet des GALP sur la barrière immunitaire intestinale.



**Figure 33 :** Comparaison à J4 des marqueurs de translocation bactérienne digestive selon le traitement d'induction reçu à J0 par les patients de l'étude GABII, Ac anti-CD25 vs. GALP (ATG). Nous avons observé à J4 des concentrations plus importantes de LPS et des concentrations plus faibles de HDL dans le groupe traité par ATG. \*p<0.05



### **Partie 3 : Modifications du microbiote en transplantation rénale, en fonction du temps et des immunosuppresseurs**

Le microbiote serait la source principale du LPS circulant retrouvé chez les insuffisants rénaux et chez les transplantés. Une modification du microbiote en faveur d'une augmentation globale des phyla *Actinobacteria*, *Firmicutes* et *Proteobacteria* ainsi qu'une diminution des familles *Lactobacillaceae* et *Prevotellaceae* a été décrite en cas d'IRC. Nous souhaitons étudier la composition du microbiote et vérifier si l'on observe des modifications après transplantation rénale. Afin de mieux interpréter les modifications potentiellement retrouvées, nous voulons voir si la dysbiose peut être déclenchée par un facteur environnemental tel que l'utilisation de traitements immunosuppresseurs ou antibiotiques utilisés en transplantation rénale.

#### **1. Matériels et méthodes**

- **Stockage des échantillons**

Tout de suite après défécation, les prélèvements de selles des patients ont été mis à +4°C. Ils ont été récupérés dans les 24 heures et homogénéisés à quantité égale avec de l'eau physiologique et mis en ampoules pour une congélation immédiate à -80°C.

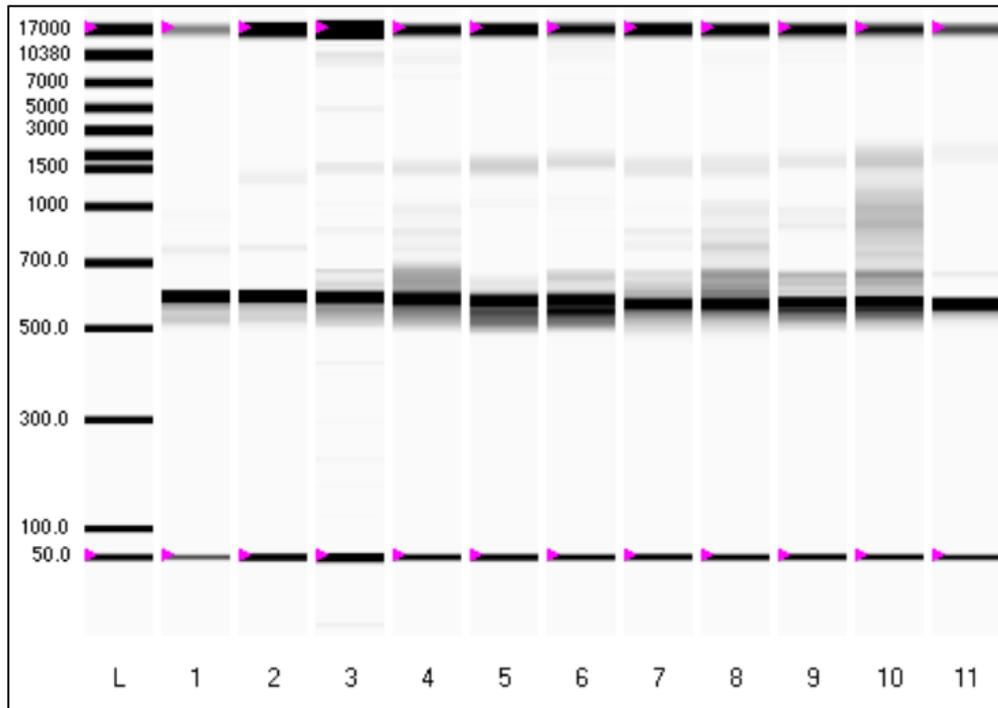
- **Extraction d'ADN**

L'extraction d'ADN a été réalisée à l'aide du kit « *QiAMP DNA stool Mini Kit* » (Qiagen) selon les recommandations du protocole « SOP 6 » de l'IHMS. Nous avons ajouté 1 ml de tampon ASL sur les selles congelées puis transféré le mélange dans des tubes contenant des billes *Lysing Matrix B* Ø 0,1mm (2ml, MP Biomedicals) pour le broyage. Après une incubation de 15 minutes à 95°C, une lyse mécanique a été réalisée à l'aide du broyeur FastPrep. Les échantillons ont ensuite été refroidis 2 minutes dans la glace puis centrifugés 5 minutes à 14 000 rpm à +4°C. Les surnageants ont été récupérés dans un nouveau tube dans lequel on a ajouté 260 µl d'acétate d'ammonium 10M. Après une nouvelle centrifugation de 5 minutes à 14 000 rpm à +4°C, les surnageants ont été récupérés dans un nouveau tube dans lequel on a ajouté volume à volume de l'isopropanol. Après une incubation de 30 minutes à +4°C, les échantillons ont été centrifugés 5 minutes à 14 000 rpm à +4°C et les surnageants ont été retirés par aspiration à la pipette. Le culot d'acides nucléiques a été lavé avec 500 µl d'éthanol puis

séché 3 minutes sous-vide à 30°C et enfin, dissous dans 100 µl de buffer TE. Après ajout de 15 µl de protéinase K et 200 µl de buffer AL, les échantillons ont été incubés 10 minutes à 70°C. A l'issue de l'incubation, 200 µl d'éthanol absolu ont été ajoutés au mélange et l'ensemble a été transféré sur une colonne QIAMP. Ensuite, les étapes d'extraction d'ADN ont été réalisées selon les recommandations du fournisseur (kit Qiagen).

- **Amplification de la région V4-V6 du gène 16S rDNA par PCR**

La région V4-V6 du gène 16S rDNA (560 paires de bases (pb)) a été amplifiée par des réactions de PCR contenant 10 ng de l'ADN extrait, 25 µl de mix Multiplex (Qiagen), 20 µl d'eau et 2 µl d'amorces *forward* 515F [5'-NNNNNNNNNN-GYCAGCMGCCGCGGTA-3'] et *reverse* 1061R [5'-NNNNNNNNNN-CACGRCACGAGCTGACG-3'], spécifiques de chaque échantillon, à 10 µM. Les amorces contiennent un code barre unique de 10 bases pour l'identification spécifique de chacun des échantillons. L'amplification par PCR a été faite en suivant les conditions de températures suivantes : 1 minute à 94°C puis 35 cycles de 30 secondes à 94°C, 30 secondes à 60°C et 45 secondes 68°C. Les précautions standards de PCR ont été respectées afin d'éviter les cross-contamination entre les échantillons. Les produits de PCR ont ensuite été purifiés à l'aide du kit « PCR clean up nucleospin » (Macherey Nagel) selon les recommandations du fournisseur. Une migration et une quantification de ces produits de PCR purifiés a été réalisée à l'aide s'un système d'électrophorèse automatisée experion en utilisant le kit « DNA 12K » (Biorad) selon les recommandations du fournisseur (**figure 34**).



**Figure 34 :** Migration de l'ADN amplifié et purifié après PCR par experion. La séquence codant pour la région V4-V6 du gène *16S rDNA* fait 560 pb.

- **Séquençage haut-débit et analyses des séquences obtenues**

Les produits de PCR ont ensuite été traités par le laboratoire Genewiz qui a quantifié et contrôlé par Agilent Bioanalyzer et PicoGreen nos échantillons. La construction d'une bibliothèque a été réalisée par ligation d'adaptateurs de séquençages en utilisant le kit Illumina « *TruSeq Sample Preparation* ». Les produits de PCR ont ensuite été séquencés en utilisant un instrument Illumina Miseq avec un séquençage de 2 fois 300 pb.

Les séquences obtenues ne se chevauchaient pas. En l'absence de recouvrement, nous avons donc réalisé une sélection des séquences de la région V4 (175 pb) par recherche de motifs HMM. Les séquences aberrantes ont ensuite été filtrées à l'aide du logiciel Mothur. Les séquences trop courtes (<140 pb) ou trop longues (>180 pb) ont été éliminées, de même que les séquences contenant plus de 10 nucléotides homopolymères. Les séquences uniques ont ensuite été regroupées selon une analyse à 99% d'homologie d'identité et seules les séquences uniques répétées plus de deux fois dans deux groupes différentes ont été gardées pour l'analyse. Les séquences chimères ont été retirées en utilisant le programme Uchime.

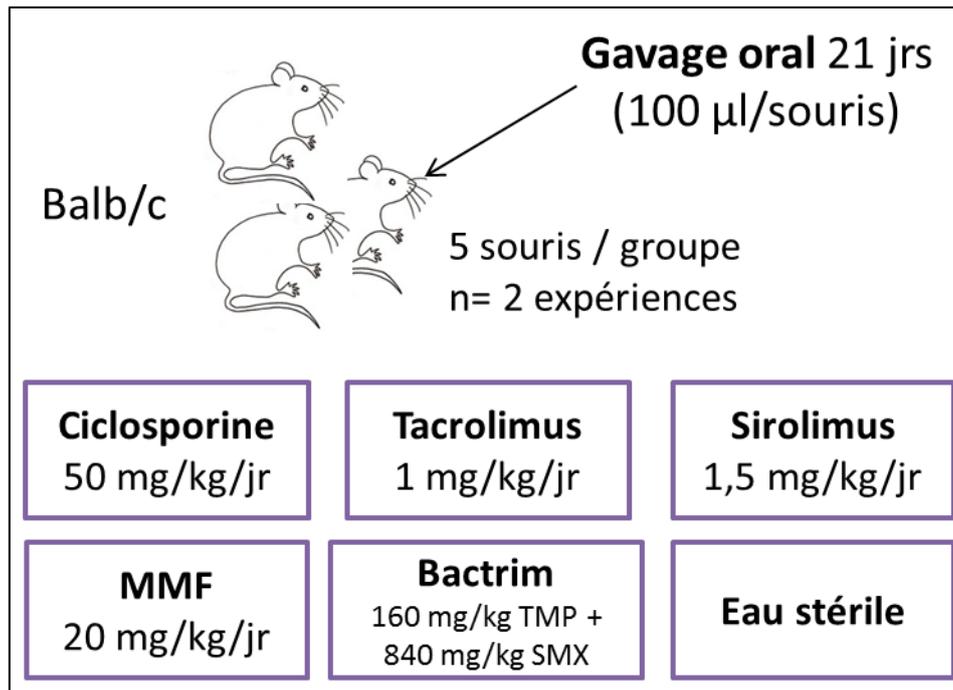
Les séquences ont été regroupées en OTU (*cf introduction, partie 1 microbiote, 3.4.3.*) sur la base d'une similitude à 97 % ou plus (Mothur). Les échantillons rares présentant moins de 10 000 lectures ont été retirés de l'analyse finale. La classification phylogénétique a également été réalisée à partir de la base de référence Silva.

- **Analyses statistiques**

Les indices de diversité de Shannon et de Simpson ont été mesurés en utilisant le logiciel Mothur. Pour comparer les taxons les plus courants, nous avons utilisé les tests de Mann-Whitney (pour les groupes non appariés) et de Wilcoxon (pour les groupes appariés). Les distances entre microbiotes ont été calculé avec la métrique *thetayc* (Yue & Clayton *measure of dissimilarity between the structures of two communities*). Celles-ci ont été utilisées pour une analyse en coordonnées principales (PcoA, pour *Principal Coordinates Analysis*). Les différences de communauté entre les groupes ont été évaluées par un test AMOVA. Les différences de variance au sein de chaque groupe ont été analysées en utilisant un test HOMOVA. Les corrélations selon les axes PcoA de chaque OTU ont été évaluées par une corrélation de Spearman. Les OTU ont été comparées entre elles par analyse Métastats après une correction de BonFeroni. L'ensemble de ces tests ont été réalisés avec le logiciel Mothur.

## **2. Etude de l'impact des traitements immunosuppresseurs d'induction sur le microbiote, à partir d'un modèle murin**

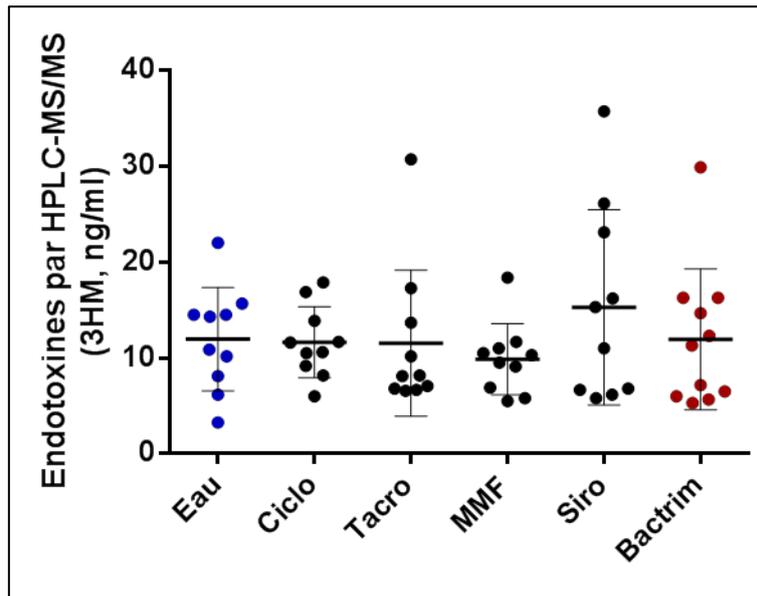
Nous avons voulu voir si les modifications que nous pourrions observer après transplantation pouvaient être finalement le reflet de l'impact sur le microbiote des traitements immunosuppresseurs d'entretien utilisés à vie, mais également de l'antibioprophylaxie par Sulfaméthoxazole/Triméthoprime (BACTRIM®) prescrite les 6 premiers mois après transplantation rénale. Pour cela nous avons utilisé un modèle murin chez lequel nous avons étudié le microbiote après administration séparée des traitements potentiellement utilisé en transplantation (**figure 35**).



**Figure 35:** Traitements immunosuppresseurs et antibiotique (BACTRIM) utilisés dans le modèle de souris.

A la fin du traitement, les souris ont été sacrifiées. Du sang total a été récupéré pour la vérification de l'imprégnation thérapeutique. Les plasmas ont été récupérés pour le dosage quantitatif du LPS (**figure 36**). Aucune différence significative n'a été retrouvée quant à la présence du LPS dans le plasma des souris en fonction du type de traitement reçus. De plus, les contenus de l'iléon ont été récupérés et conservés directement à -80°C pour l'étude du microbiote.

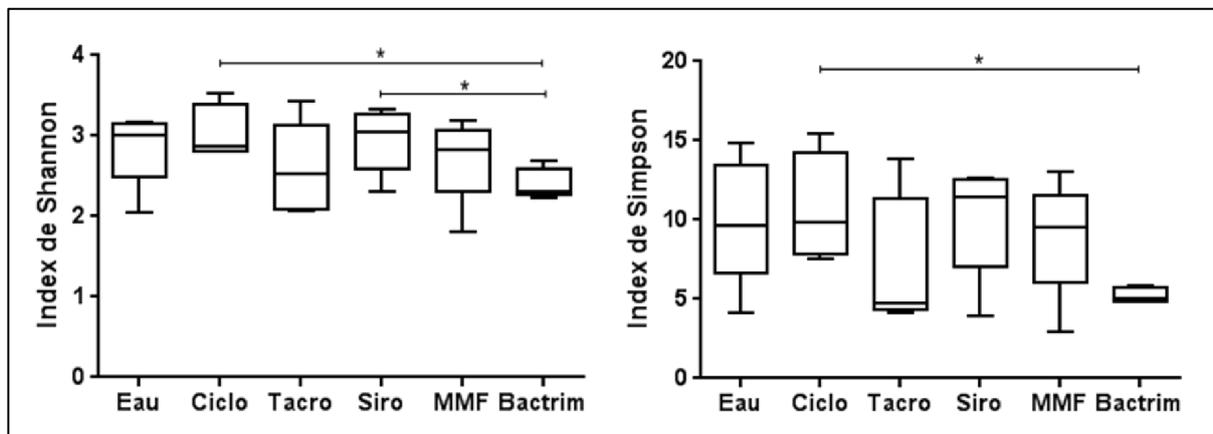
Nous avons réalisé l'étude du microbiote des souris sur une des deux expériences (5 souris par groupe) en réalisant un séquençage des ADN extraits à partir des contenus de l'iléon en utilisant la méthode décrite précédemment. Les échantillons qui présentaient moins de 10 000 séquences après filtration des données ont été éliminés de l'analyse, ce qui correspond à une souris. Nous avons décrits 784 OTU différentes.



**Figure 36: Dosage quantitatif du LPS.** Aucune différence significative n'a été retrouvée quant à la présence du LPS dans le plasma des souris en fonction du type de traitement reçus.

## 2.1. Diversité bactérienne

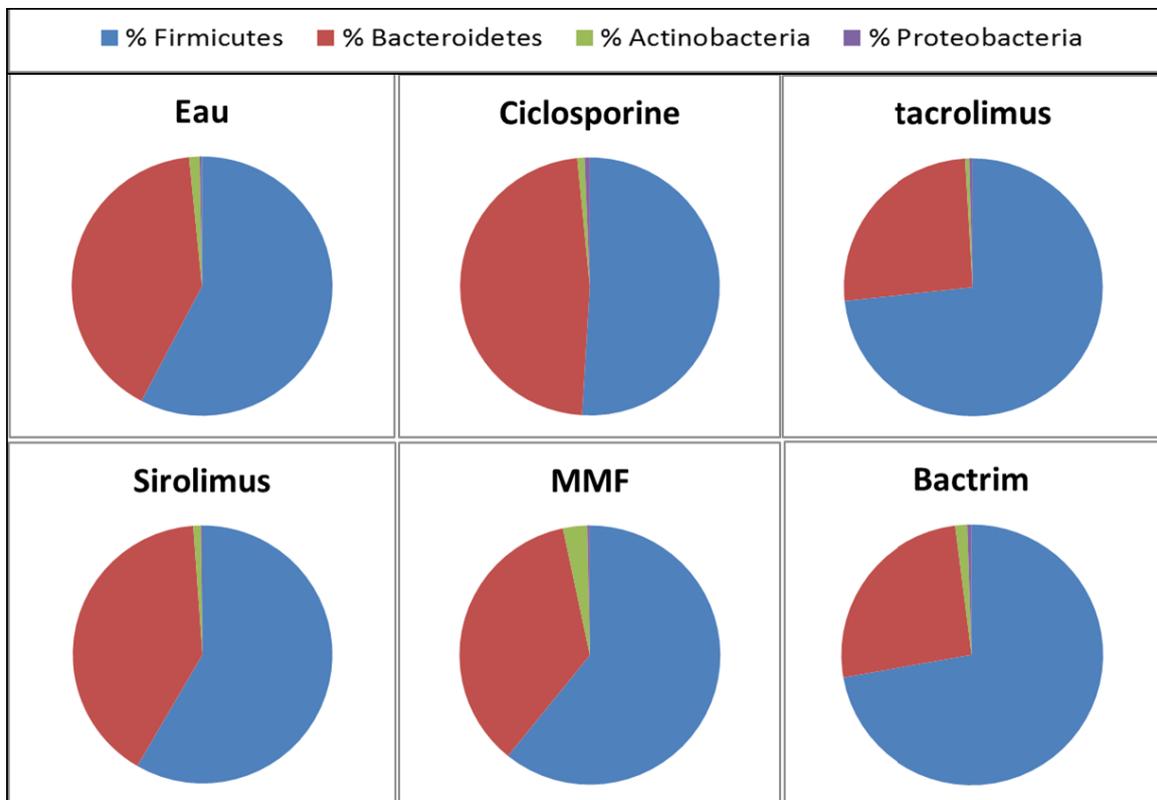
Les indices de diversité de Shannon et Simpson ont montré une diminution importante de la diversité dans le groupe BACTRIM et une tendance à la diminution dans la groupe tacrolimus mais ces observations ne sont pas significativement différentes de la diversité observée dans le groupe contrôle. Les autres immunosuppresseurs ne semblent pas entrainer de modifications de la diversité bactérienne (**figure 37**).



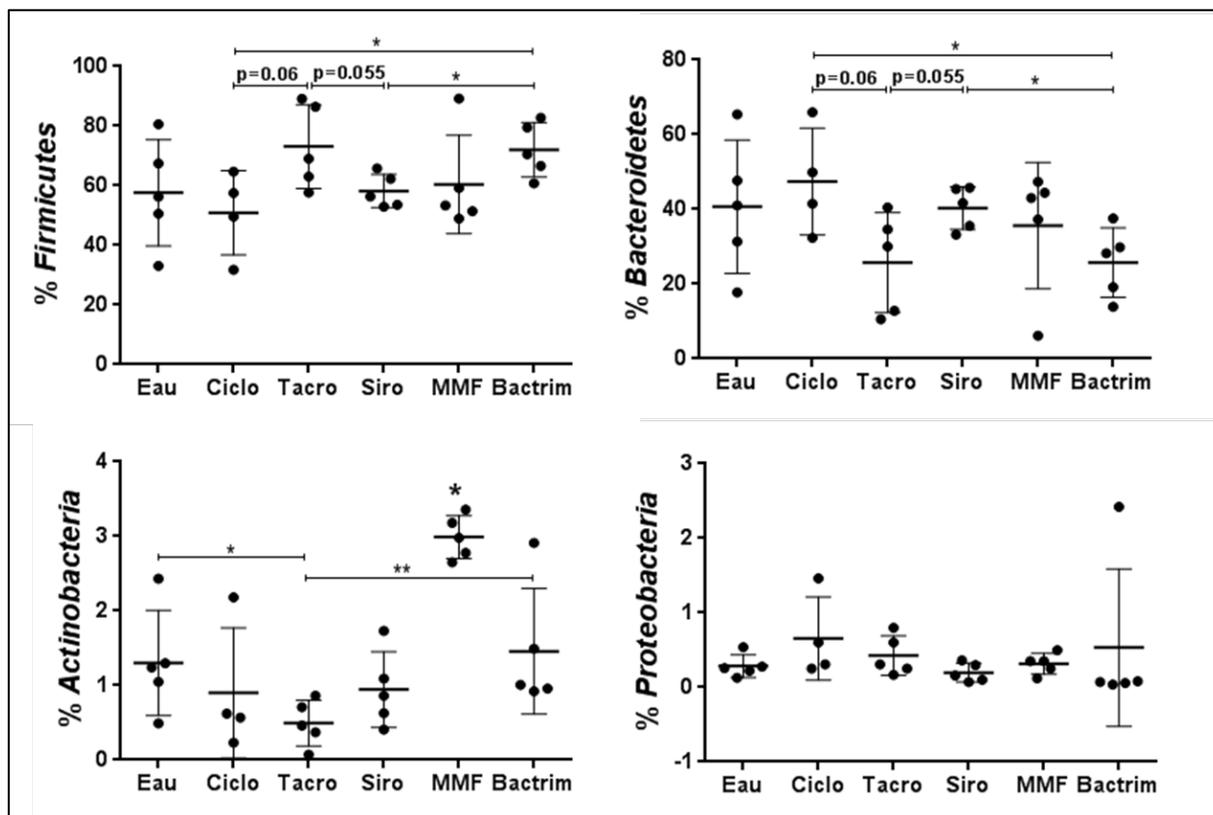
**Figure 37: Diversité bactérienne.** La diversité bactérienne est décrite selon les indices de Shannon et de Simpson, en fonction du traitement reçus par les souris. Une diminution significative de la diversité dans le groupe BACTRIM a été rapporté, \* $p < 0.05$ .

## 2.2. Distribution phylogénétique

Nous nous sommes intéressés à la distribution phylogénétique entre chaque groupe, en particulier à la proportion des 4 phyla les plus représentés c'est-à-dire *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria*. Nous avons retrouvé classiquement la prédominance des *Firmicutes* et *Bacteroidetes* au sein de chaque groupe (**figure 38**). Les souris des groupes BACTRIM et tacrolimus ont présentées une augmentation des *Firmicutes* [respectivement, 72,1 % et 73,1 % vs. 57,6 % (groupe eau), 50,9 % (groupe ciclo), 58,2 % (groupe siro) et 60,5 % (groupe MMF)]; ainsi qu'une diminution des *Bacteroidetes* [respectivement, 25,7 % et 25,7 % vs. 40,7 % (groupe eau), 47,4 % (groupe ciclo), 40,3 % (groupe siro) et 35,7 % (groupe MMF)] par rapport aux autres groupes. Une augmentation du phylum des *Actinobacteria* a été observée dans le groupe MMF comparé à tous les autres groupes [3,0 % vs. 1,3 % (groupe eau), 0,9 % (groupe ciclo), 0,5 % (groupe tacro), 0,5 % (groupe siro) et 1,5 % (groupe BACTRIM)]. Aucune variation de la proportion des *Proteobacteria* n'a été retrouvée [0,3 % (groupe eau), 0,7 % (groupe ciclo), 0,4 % (groupe tacro), 0,2 % (groupe siro), 0,3 % (groupe MMF) et 0,5 % (groupe BACTRIM)] (**figure 39**).



**Figure 38 :** Représentation graphique de la proportion de phyla selon les groupes.



**Figure 39 :** Comparaison des proportions de phyla bactériens entre les différents groupes.

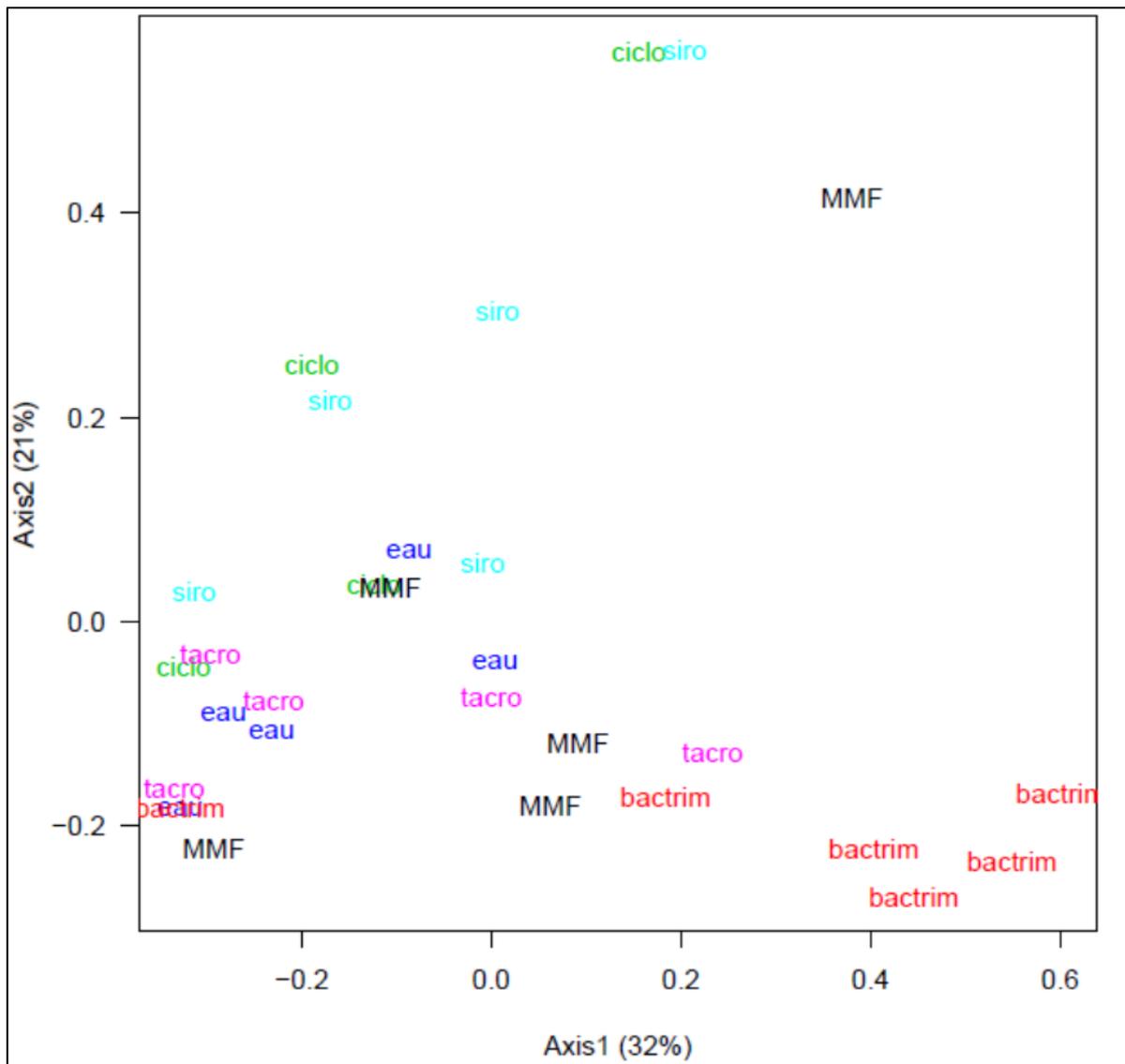
### 2.3. Représentation multidimensionnelle

La représentation des communautés bactériennes a été réalisée sur une projection à partir de l'analyse en coordonnées principales (PCoA). Graphiquement, nous avons retrouvé une répartition homogène du groupe BACTRIM, qui se détache des autres échantillons (**figure 40**). La répartition des autres échantillons représentant les souris contrôles et traitées par immunosuppresseurs étaient éparpillées. Les échantillons du groupe BACTRIM étaient significativement plus proches entre eux que les échantillons au sein d'un autre groupe (test AMOVA significatif). De plus, seuls les échantillons du groupe BACTRIM ont présenté une plus faible dispersion entre eux (test HOMOVA significatif).

Nous avons recherché ensuite, les OTU associées à nos différences entre communautés. Nous nous sommes particulièrement intéressés aux OTU corrélées aux axes 1 et 2 en test de Spearman par rapport à la projection en PCOA. La projection des échantillons du groupe BACTRIM en PCOA était positivement associée à l'axe 1 et

négativement associée à l'axe 2. Neuf OTU étaient significativement corrélées positivement avec l'axe 1 et négativement avec l'axe 2 (OTU 2-24-37-55-57-68-217-366-580). Sur ces 9 OTU, 2 étaient associées à des bactéries non classées et 1 était associée à des bactéries du phyla *Bacteroidetes*, mais les 6 autres appartenait au phylum des *Firmicutes* et plus précisément à la famille bactérienne des *Erysipelotrichaceae*. En opposition, nous avons également regardé les OTU associées négativement à l'axe 1 et positivement à l'axe 2. Une OTU était significativement corrélée négativement à l'axe 1 et positivement à l'axe 2 (OTU 15). Cette OTU appartenait au phylum *Bacteroidetes* et plus précisément à l'ordre des *Bacteroidales*.

Enfin, les analyses Métastats entre le groupe BACTRIM et les autres groupes ont fait ressortir les OTU 2, 7 et 13 significativement différentes. Dans le groupe BACTRIM, l'OTU 2 représentait 38 % des lectures, alors que les OTU 7 et 13 ne représentaient respectivement que 0,01 et 0,07 % des lectures. Comme nous l'avons vu, l'OTU 2 appartenait à la famille des *Erysipelotrichaceae* alors que les OTU 7 et 13 appartenait au phylum *Bacteroidetes* et plus précisément à l'ordre des *Bacteroidales*. Par conséquent, nous retrouvons les mêmes résultats qu'avec le test Spearman, à savoir une forte prédominance des *Firmicutes* et une diminution de l'abondance des *Bacteroidetes* dans le groupe BACTRIM.



**Figure 40 :** Représentation en PCoA des échantillons selon les groupes de souris.

## 2.4. Discussion

L'antibioprophylaxie par BACTRIM entraîne une diminution de la diversité bactérienne qui semble associée à une inversion du rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* en faveur d'une augmentation des *Firmicutes* et d'une diminution des *Bacteroidetes*. Cette inversion a été confirmée par l'ensemble des analyses réalisées sur projection PCOA puisque des différences significatives ont été observées entre le groupe BACTRIM et les autres groupes. Les souris ayant reçu l'antibiotique sont plus homogènes et stables en termes de communauté bactérienne avec une prédominance des OTU du phyla des *Firmicutes* et une plus faible présence des *Bacteroidetes*. L'OTU 2 serait celui le plus largement associé à la modification du microbiote après BACTRIM par sa prédominance. La séquence de l'OTU traduirait la présence des bactéries du genre *Faecalibacterium*.

L'impact direct de la prise d'antibiotique sur le microbiote est un effet connu. Il a été décrit un phénomène de résilience du microbiote qui montre qu'après une antibiothérapie, les individus retrouvent quasiment un microbiote semblable à celui observé à l'état initial. La récupération du microbiote peut être relativement rapide, en quelques mois après un traitement antibiotique de courte durée (De La Cochetiere *et al.* 2005), mais cela peut prendre jusqu'à deux ans en cas d'antibiothérapie prolongée [revue, (Jernberg *et al.* 2010)]. La diminution de la diversité que l'on a observé est un effet généralement retrouvé après tout type d'antibiothérapie [revue, (Modi *et al.* 2014)]. Par contre, les modifications du microbiote sont différentes en fonction de la sensibilité des espèces à l'antibiothérapie [revue, (Jernberg *et al.* 2010)]. Panda *et al* ont montré une inversion du rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* en faveur d'une diminution des *Firmicutes* et d'une augmentation des *Bacteroidetes* après traitement par fluoroquinolones ou  $\beta$ -lactames (Panda *et al.* 2014). A l'inverse, nous avons observé après BACTRIM, une augmentation des *Firmicutes*, qui sont des bactéries à Gram positif, et une diminution des *Bacteroidetes*, qui sont des bactéries à Gram négatif. Le BACTRIM pourrait donc avoir un effet positif sur la concentration du LPS potentiellement capable de transloquer dans le sang, puisqu'il provient des bactéries à Gram négatif. Il existe peu de données dans la littérature sur l'impact du BACTRIM sur le microbiote. Chez les patients VIH+, ce traitement peut être utilisé en prophylaxie des infections à *Pneumocystis jiroveci*. Vesterbacka *et al* ont comparé des patients sous traitement antirétroviraux plus ou moins BACTRIM pour étudier les marqueurs de TBD. Ils ont

observé une diminution de la LBP dans le groupe avec BACTRIM pendant la première année suivant l'initiation du traitement. Cependant, les concentrations de LBP au départ de l'étude étaient significativement plus hautes dans le groupe BACTRIM que dans le groupe sans antibiotique. Par ailleurs, ils ont observé une augmentation du LPS à un mois du début de l'étude dans le groupe sans antibioprofylaxie, mais là encore les concentrations de LPS au départ étaient différentes entre les groupes (plus hautes dans le groupe sans antibioprofylaxie) (Vesterbacka *et al.* 2015). Nous avons montré que l'augmentation des *Firmicutes* après BACTRIM semble être principalement due à la prédominance des bactéries du genre *Faecalibacterium*. *Faecalibacterium prausnitzii* est une espèce capable d'augmenter les Treg et les cytokines anti-inflammatoires et de favoriser la production de mucus (Qiu *et al.* 2013, Wrzosek *et al.* 2013). Ces résultats suggèrent que le BACTRIM pourrait avoir un effet bénéfique sur la diminution de la TBD et de l'inflammation mais ces résultats restent à confirmer. Il a été montré que les modifications du microbiote après antibiothérapie pouvaient être associées au développement des espèces bactériennes pathogènes telles que *Clostridium difficile* ou *Salmonella typhimurium* (Ng *et al.* 2013). De plus, le LPS de ces bactéries a un plus fort pouvoir antigénique que celui de certaines bactéries du genre des *Bacteroides* (Vatanen *et al.* 2016). En effet, dans une autre étude, la modification du microbiote par les antibiotiques est associée à une augmentation de l'activité du LPS dans le sang. Dans un modèle murin, Jin *et al.* ont retrouvé une augmentation des *Firmicutes* et une diminution des *Bacteroidetes* après traitement par pénicilline G ou érythromycine, de même que dans notre étude après BACTRIM. Les auteurs rapportent une augmentation du LPS sérique, et également une augmentation des marqueurs inflammatoires (Jin *et al.* 2016). Ils supposent que c'est l'augmentation de la mort des bactéries à Gram négatif appartenant au phyla *Bacteroidetes* qui favorise la libération et l'augmentation du LPS. Dans cette même étude, les auteurs ont observé une diminution des peptides antimicrobiens au niveau de l'iléon qui pourrait soutenir cette idée. Les résultats semblent encore controversés quant à l'effet protecteur ou inducteur des antibiotiques sur les modifications du microbiote, la TBD et l'inflammation. Certaines études ont été réalisées chez l'homme, d'autres chez la souris, c'est pourquoi, il faut rester prudent quant à l'interprétation d'une modification retrouvée au sein du microbiote et son implication clinique sur l'organisme. D'un point de vue clinique, une modification du rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* est largement impliquée dans l'obésité.

L'antibioprophylaxie pourrait peut-être jouer un rôle dans le développement des maladies métaboliques observées après transplantation rénale. Il serait également intéressant de comparer les modifications du microbiote chez les transplantés rénaux ayant reçu une antibioprophylaxie par BACTRIM ou Pentamidine isétionate PENTACARINAT, utilisé en cas d'intolérance ou de contre-indication au BACTRIM. Le PENTACARINAT est un aérosol, ainsi son administration se fait par voie nasale et occasionne peut-être moins de troubles au niveau du microbiote intestinal.

Par ailleurs, l'ensemble de nos résultats montrent que les immunosuppresseurs d'entretien ne semblent pas induire de modifications majeures du microbiote. Nous avons observé une tendance à la diminution de la diversité bactérienne et une augmentation de la proportion des *Firmicutes* après tacrolimus, ainsi qu'une augmentation de la proportion des *Actinobacteria* après MMF, mais les analyses en projection PCOA ne sont pas significatives. L'impact des immunosuppresseurs d'entretien utilisés en transplantation sur le microbiote est très peu étudié. Lee *et al* ont montré une association entre l'abondance de *Faecalibacterium prausnitzii* et la dose de tacrolimus administrée (Lee *et al.* 2015). Dans notre étude, le tacrolimus semble avoir un impact modéré mais similaire à celui obtenu après BACTRIM. L'abondance des bactéries du genre *Faecalibacterium* augmentait après BACTRIM lui conférant des propriétés plutôt protectrices. Il se pourrait que le tacrolimus ait un effet similaire.

Certaines études ont montré un impact des immunosuppresseurs d'entretien sur la barrière intestinale. Malinowski *et al* ont testé, dans un modèle de rats, l'impact de la ciclosporine A, du tacrolimus, du MMF, de l'acide mycophénolique (MPA), du sirolimus, et de l'évérolimus sur l'intestin grêle et le colon et la barrière intestinale par la méthode de la chambre d'Ussing. L'évérolimus, le tacrolimus et le MPA à fortes doses entraînent une altération de la barrière intestinale, uniquement au niveau de l'intestin grêle (Malinowski *et al.* 2011). Dans une autre étude, Tourret *et al* ont testé, dans un modèle murin, l'impact des corticoïdes, et notamment la prednisolone utilisée en transplantation rénale, du tacrolimus, du MMF et de l'évérolimus sur le microbiote et la barrière intestinale (Tourret *et al.* 2016). De même que Malinowski, ils ont retrouvé une altération de la barrière intestinale au niveau de l'iléon après évérolimus (diminution des peptides antimicrobiens). En adéquation avec nos résultats, ils n'ont pas observé de modifications de la composition du microbiote après tacrolimus, MMF ou évérolimus.

Dans notre étude, nous n'avons pas testé l'effet des corticoïdes. Cependant, Tourret *et al* ont retrouvé des modifications du microbiote, en faveur d'une diminution des *Bacteroidetes* et d'une augmentation des *Firmicutes*, ainsi qu'une diminution des peptides antimicrobiens après administration de prednisolone (Tourret *et al.* 2016). Chez l'homme, Kubler *et al* ont montré, à partir de biopsies intestinales obtenues chez 75 patients atteints de maladie de Crohn, que l'administration par voie orale de corticoïdes ou d'azathioprine n'a pas d'impact majeur sur la synthèse de défensines antimicrobiennes au niveau de l'iléon et du colon (Kubler *et al.* 2009).

La prise en compte de l'impact des traitements couramment utilisés en transplantation rénale sur le microbiote pourra nous aider à mieux appréhender les éventuelles modifications du microbiote que l'on pourra retrouver dans notre étude chez l'homme. Les effets précis de ces traitements doivent encore être élucidés.

### **3. Modifications du microbiote après transplantation rénale**

#### **3.1. Description de la population étudiée**

Nous avons travaillé sur les premiers patients de l'étude GABII pour lesquels nous avons tous les prélèvements de selles. Les échantillons de selles ont été prélevés et traités comme décrit précédemment dans le matériel et méthodes. Ces données préliminaires présentent l'étude du microbiote de 16 patients pour lesquels nous avons tous les prélèvements à J0, J4 et J90 après transplantation. Six de ces 16 patients ont également un prélèvement à J365. Les caractéristiques de ces patients sont décrites dans le **tableau 6**. Cinq patients ont reçu un traitement d'induction par GALP.

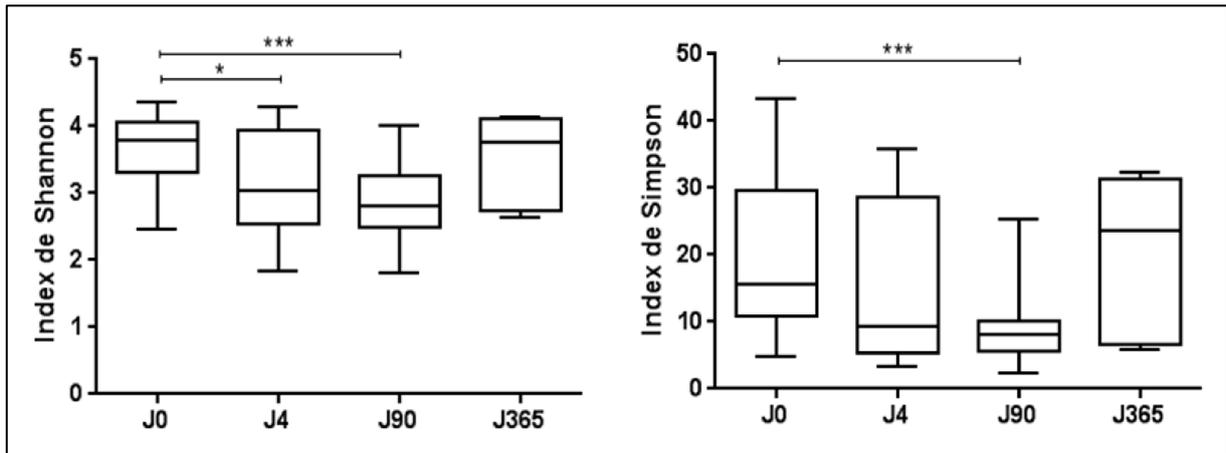
Les échantillons qui présentaient moins de 8 000 séquences après filtration des données ont été éliminés de l'analyse, ce qui représente 3 échantillons (un à J4, un à J90 et un à J365). Nous avons décrits 1445 OTU différentes.

**Tableau 6 : Caractéristiques de la population d'étude du microbiote. Seize patients ont été issus de la cohorte GABII.**

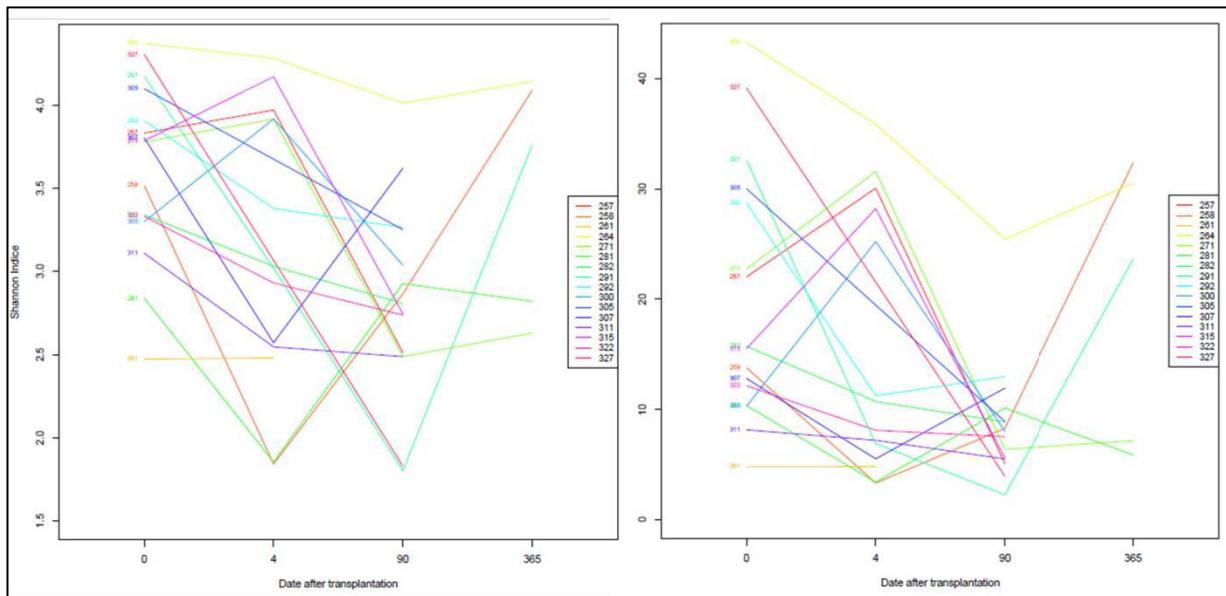
Variable	Population étudiée	Variable	J4	J90	J365
n	16	Bactrim n. (%)	16 (100)	14 (87,5)	0 (0)
Age, moyenne en années	51	Pentacarinat n. (%)	0 (0)	3 (18,8)	1 (6,3)
Sexe ratio (H/F)	3	Rejet Aigu n. (%)	1 (6,3)	1 (6,3)	ND
IMC (kg/m <sup>2</sup> ), moyenne	25,2	Diabète post-transplantation n. (%)	3 (18,8)	0 (0)	ND
Tabagisme actif n. (%)	2 (12,5)	Maladie à CMV n. (%)	0 (0)	0 (0)	ND
Dialysés n. (%)	14 (87,5)	Infections opportunistes n. (%)	0 (0)	0 (0)	ND
Durée de la dialyse, moyenne en mois	35,6	Infections bactériennes sévères n. (%)	6 (37,5)	6 (37,5)	8 (50)
Première transplantation rénale n. (%)	12 (75)	Antibiothérapie n. (%)	5 (31,2)	6 (37,5)	7 (43,8)
Présence d'anticorps anti-HLA n. (%)	4 (25)	Diarrhées sévères n. (%)	0 (0)	2 (12,5)	2 (12,5)
Exposition au CMV n. (%)	11 (68,8)	Événements éthéromatheux n. (%)	0 (0)	0 (0)	ND
Diabète avant transplantation n. (%)	2 (12,5)	Rapport CD4/CD8 <1 n. (%)	1 (6,3)	3 (18,8)	3 (18,8)
HTA n. (%)	9 (56,3)				
Anti-CD25 n. (%)	11 (68,8)				
ATG n. (%)	5 (31,2)				
Corticostéroïdes n. (%)	16 (100)				
Tacrolimus n. (%)	13 (81,3)				
Ciclosporine n. (%)	0 (0)				
Sirolimus/Everolimus n. (%)	0 (0)				
Mycophenolate mofetil n. (%)	16 (100)				
Rapport CD4/CD8 <1 n. (%)	2 (12,5)				

### 3.1. Diversité bactérienne

Les indices de diversité de Shannon et Simpson ont montré une diminution importante de la diversité à J4 et J90 après transplantation. Un an après transplantation, la diversité a augmenté et les niveaux de diversité étaient aussi (indice de Shannon) voire plus importants (indice de Simpson) que ceux rapportés avant transplantation (**figure 41**). L'analyse de la variation de la diversité patient par patient selon le temps a révélé une hétérogénéité entre nos patients. Certains patients ont présenté une augmentation de la diversité à J4 puis une diminution à J90 alors que la plupart ont présenté une diminution de la diversité à J4 puis une stabilité ou une augmentation à J90. Cependant, les 5 patients ayant un point à J365 ont présenté une augmentation de la diversité un an après transplantation (**figure 42**).



**Figure 42 : Diversité bactérienne.** La diversité bactérienne est décrite selon les indices de Shannon et de Simpson, en fonction temps après transplantation rénale chez les transplantés. Une diminution significative de la diversité à J4 et J90 après transplantation a été rapporté, \* $p < 0.05$  et \*\*\* $p < 0.001$ .

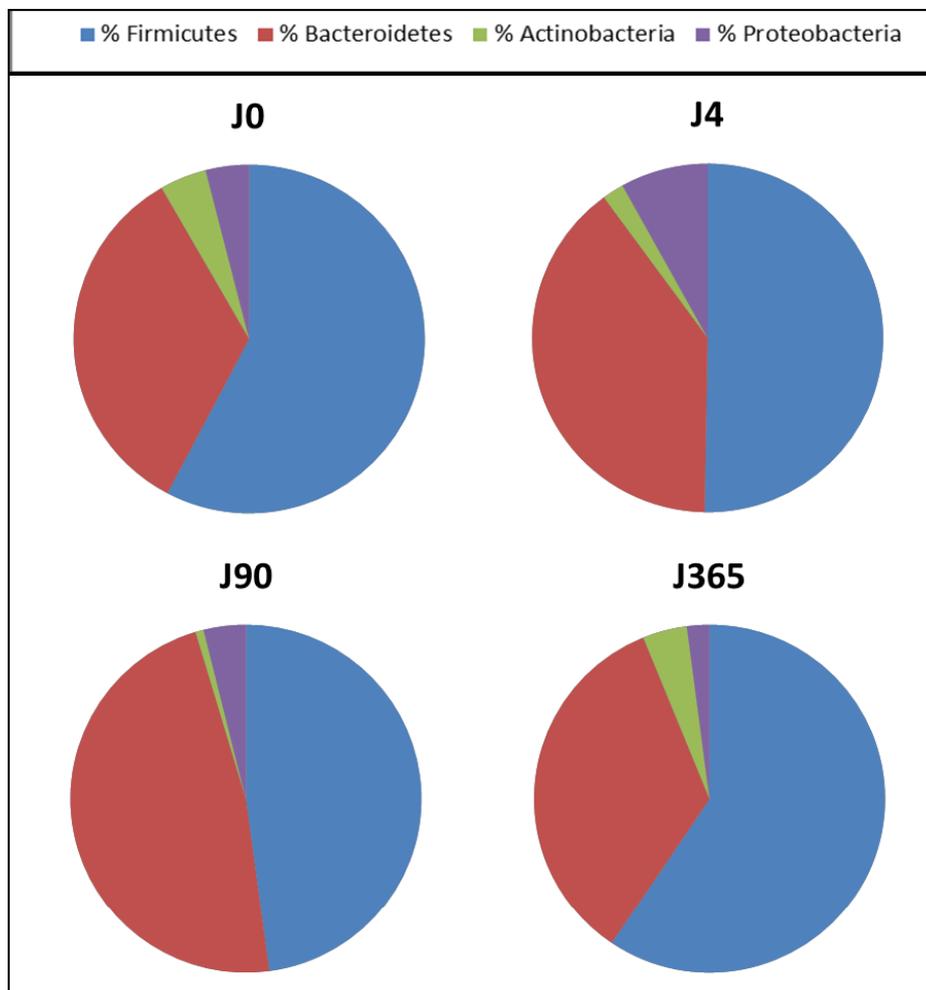


**Figure 41 : Variations de la diversité bactérienne au cours du temps pour chaque individu de l'étude.** Chaque couleur représente un patient de l'étude.

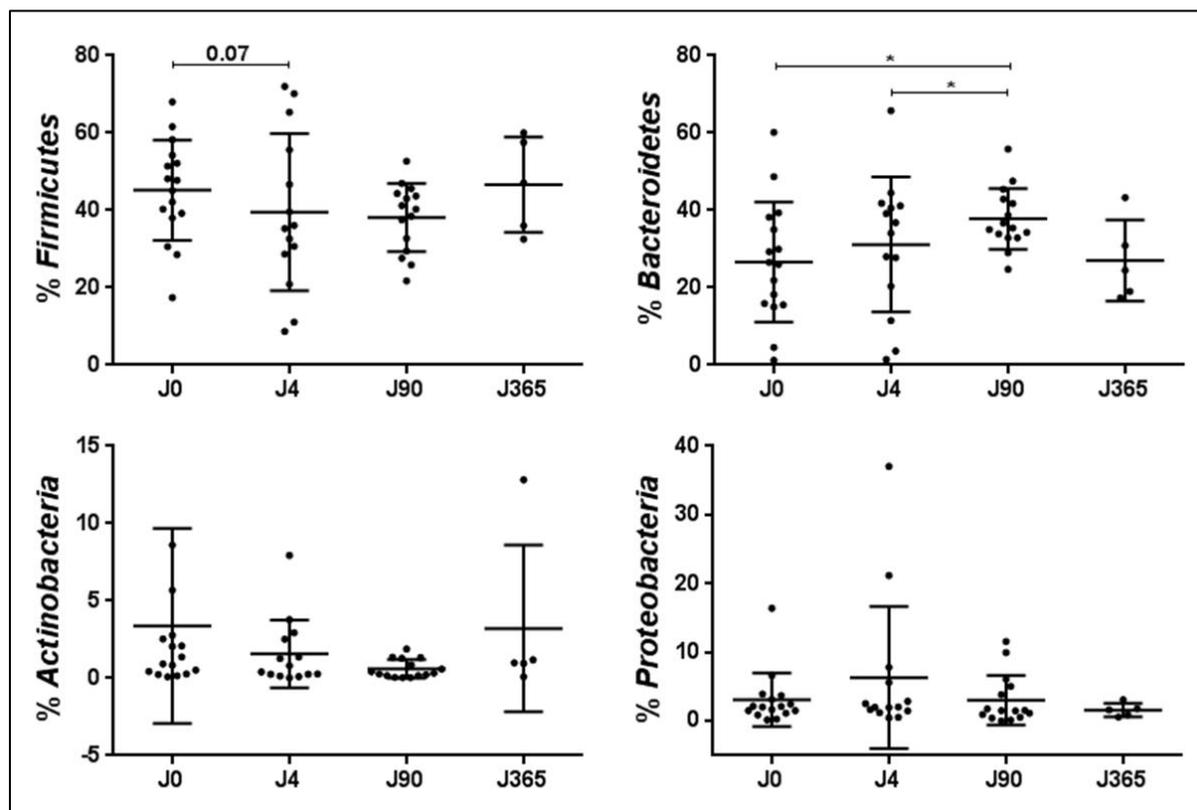
### 3.2. Distribution phylogénétique

Nous nous sommes intéressés à la distribution phylogénétique avant et à différents temps après transplantation, en particulier à la proportion des 4 phyla les plus représentés c'est-à-dire *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Proteobacteria*. Nous avons retrouvé classiquement la prédominance des *Firmicutes* et *Bacteroidetes* au sein

de chaque groupe (**figure 43**). A J4 et J90, nous avons observé une diminution des *Firmicutes* (39,5 % à J4 et 38,1 % à J90 vs. 45,2 % à J0) et une augmentation des *Bacteroidetes* par rapport à J0 (31,2 % à J4 et 37,8 % à J90 vs. 26,6 % à J0). A un an, les proportions de ces phyla semblaient revenues similaires à celles observées à J0 mais les différences ne sont pas significatives (46,7 % de *Firmicutes* et 27,0 % de *Bacteroidetes*) (**figure 44**). Une augmentation non significative de la proportion des *Proteobacteria* a été observée à J4 (6,3 % à J4 vs. 3,1 % à J0, 3,1 % à J90 et 1,6 % à J365). Aucune variation significative de la proportion des *Actinobacteria* n'a été retrouvée (3,4 % à J0, 1,6 % à J4, 0,6 % à J90 et 3,2 % à J365).



**Figure 43:** Représentation graphique de la proportion des principaux phyla selon le temps après transplantation rénale.

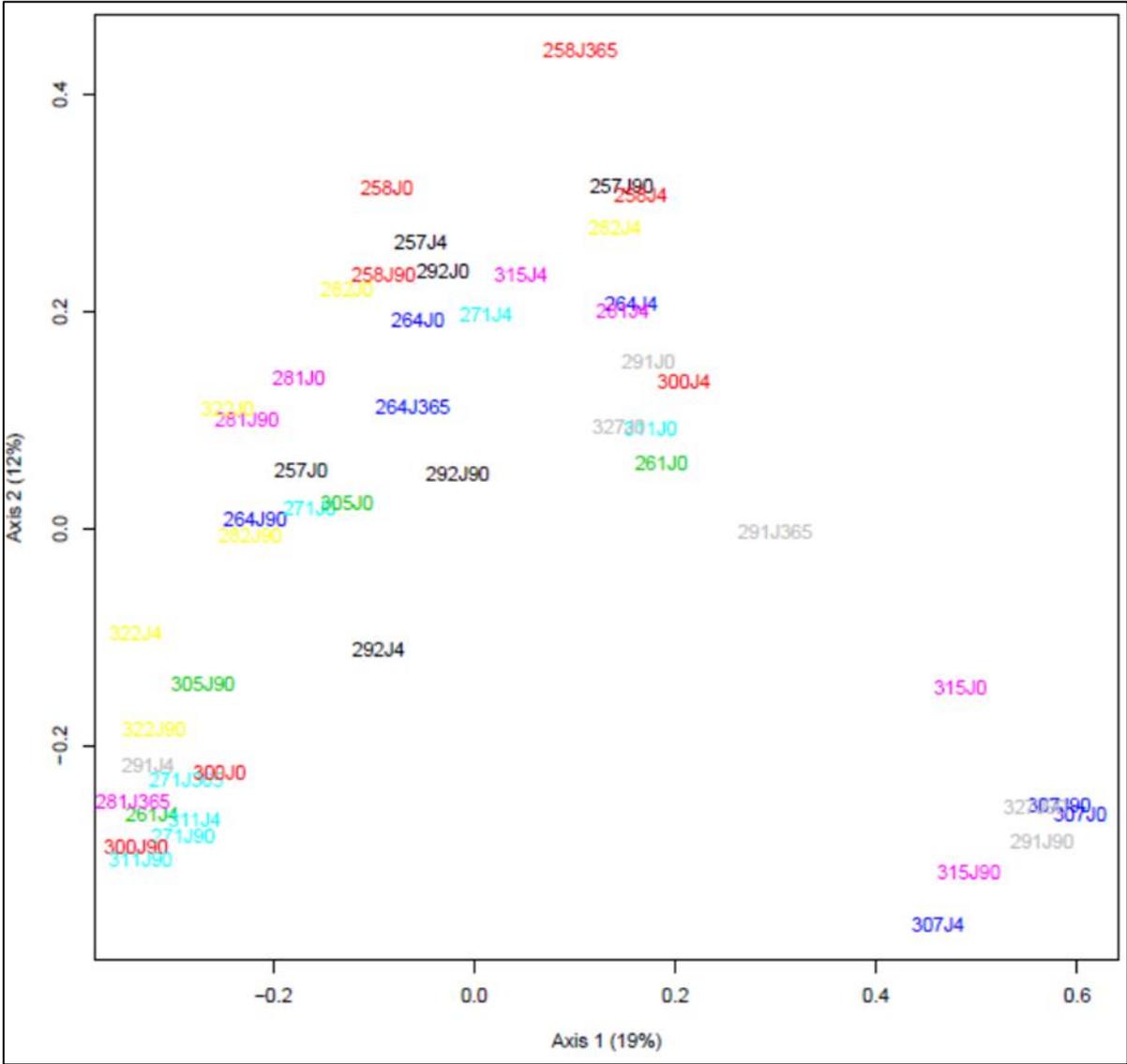


**Figure 44 :** Comparaison des proportions des principaux phyla bactériens aux différents temps.

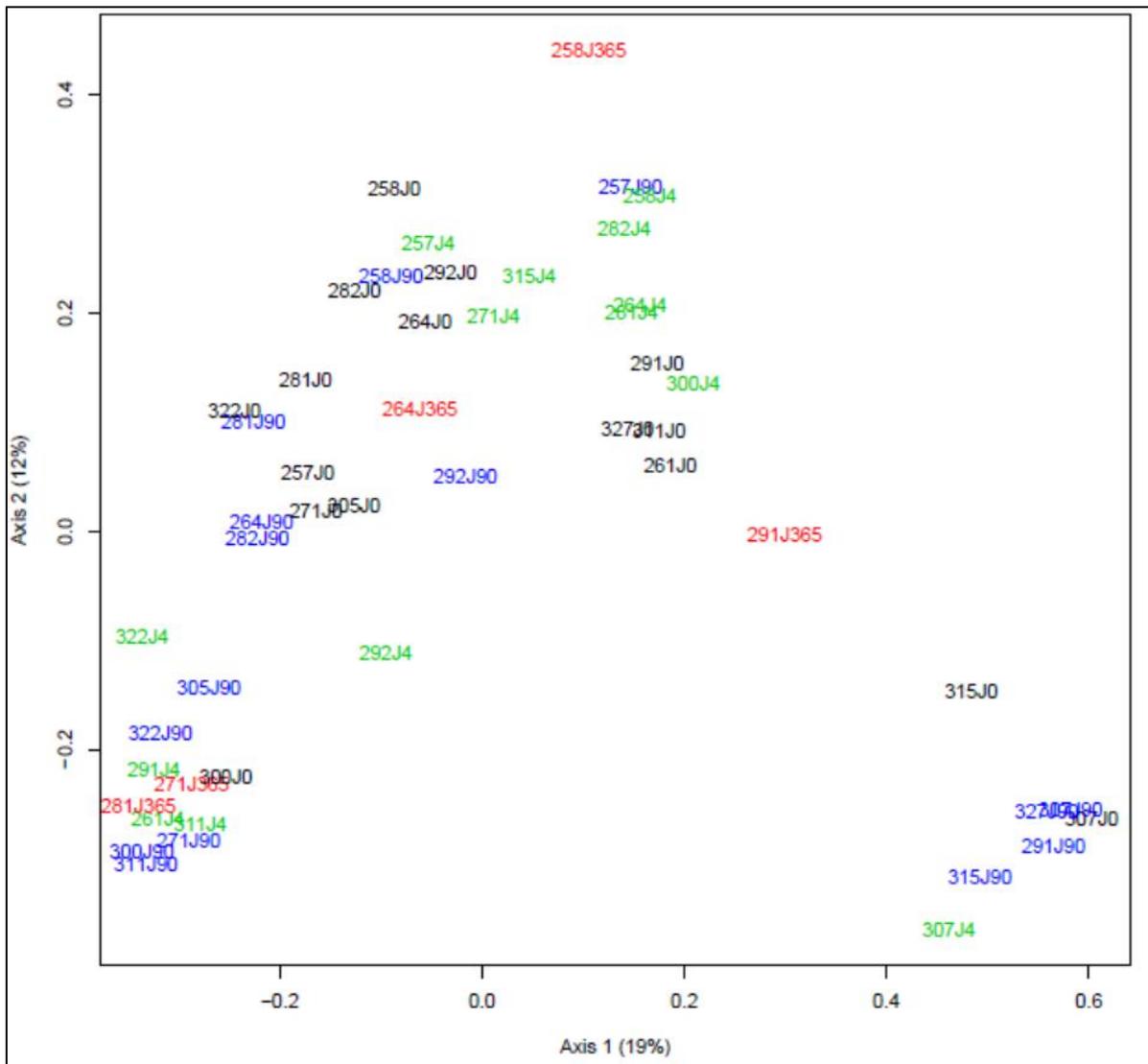
### 3.3. Représentation multidimensionnelle

La représentation des communautés bactériennes a été réalisée sur une projection à partir de l'analyse en coordonnées principales (PCoA). Graphiquement, nous avons retrouvé une répartition élatée des échantillons selon les patients ou selon le temps après transplantation. Deux patients (258 et 264) présentaient des microbiotes significativement plus proches entre eux dans le temps que les autres patients (test AMOVA significatif). De plus, les échantillons de ces patients aux 4 temps ont présenté une plus faible dispersion entre eux (test HOMOVA significatif) (**figure 45**). Les analyses AMOVA et HOMOVA de tous les échantillons en fonction du temps n'ont révélées aucune différence significative (**figure 46**). Nous avons noté un groupe qui se détachait en analyse PCoA, principalement composé d'échantillons au temps J90. Ce groupe est positivement associé à l'axe 1 et négativement associé à l'axe 2. Nous avons retrouvé 8 OTU (OTU 3-55-157-212-367-414-788-1191) corrélées aux axes 1 et 2 en test de Spearman par rapport à la projection en PCOA. Sur ces 8 OTU, 2 étaient associées à des bactéries du phyla *Firmicutes* et 1 était associée à des bactéries non classées, mais les 5

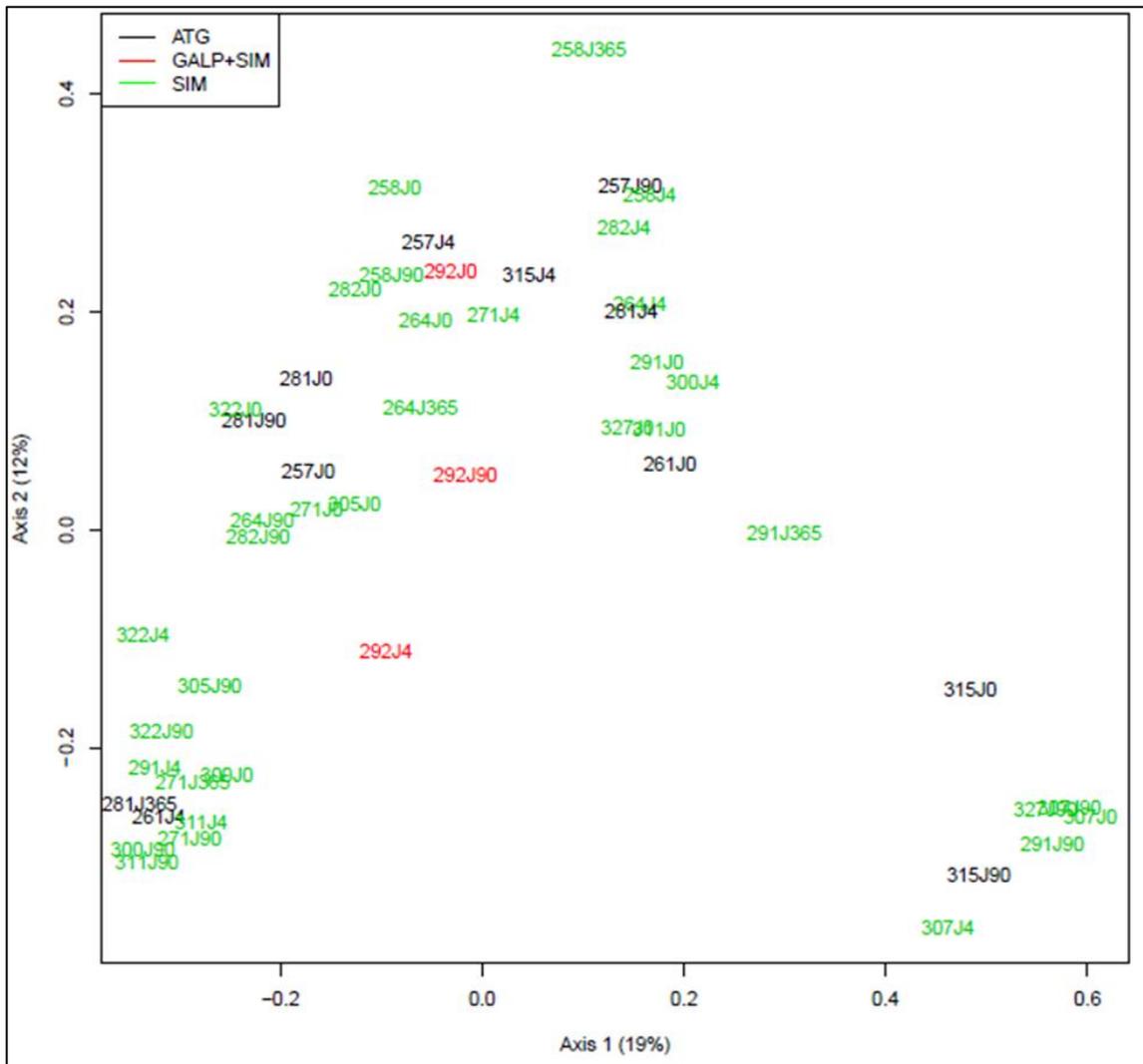
autres appartenait au phylum des *Bacteroidetes* et plus précisément à l'ordre des *Bacteroidales*. Enfin, nous avons réalisé une représentation des patients en PCoA en fonction du traitement d'induction qu'ils ont reçu (**figure 47**). Aucune différence représentative n'a été observée entre les patients traités par GALP et ceux traités par Ac anti-CD25. L'allure de la représentation graphique est similaire à celle obtenue quand on analyse les patients eux-mêmes.



**Figure 45 :** Représentation en PCoA des échantillons, comparaison entre les patients.



**Figure 46:** Représentation en PCoA des échantillons, comparaison entre les temps après transplantation.



**Figure 47 : Représentation en PCoA des échantillons en fonction du traitement d'induction.** En noir sont représentés les patients ayant reçu des GALP, en rouge sont représentés les patients ayant reçu des GALP et l'Ac anti-CD25 et en vert sont représentés les patients ayant reçu l'Ac anti-CD25.

### 3.4. Discussion

Nous avons montré que la diversité bactérienne diminue après transplantation à J4 et J90. Cependant, à un an, la diversité est aussi élevée que celle observée avant transplantation. Nous avons observé des modifications de la composition du microbiote après transplantation mais ces différences ne sont pas significatives en projection PCoA. Nous avons observé une diminution des *Firmicutes*, qui sont des bactéries à Gram positif, et une augmentation des *Bacteroidetes*, qui sont des bactéries à Gram négatif, à J4 et J90. Une augmentation non significative de la proportion des *Proteobacteria* a été observée à J4. Les profils bactériens à J0 et un an sont plus similaires entre eux. En analyse par projection, l'ensemble des patients étudiés est très hétérogène. Lorsqu'on analyse en projection PCoA les échantillons en fonction du temps ou en fonction du traitement d'induction, le profil graphique est le même que celui observé lorsqu'on fait la projection des patients.

Dans l'IRC, des modifications du microbiote principalement attribuées à l'accumulation de toxines urémiques ont été décrites [revue, (Sampaio-Maia *et al.* 2016)]. Vaziri *et al* ont comparé le microbiote issu des selles de 24 patients en IRC à celui de 12 volontaires sains. L'analyse globale des phyla ne montrent pas de différence entre les insuffisants rénaux et les donneurs sains. Cependant, l'analyse des sous-familles a montré une expansion des familles bactériennes appartenant au phylum des *Actinobacteria* (*Actinobacteridae*), au phylum des *Firmicutes* (*Clostridia*) et au phylum des *Proteobacteria* (*Delta* et *gammaproteobacteria*). En particulier, une expansion des espèces bactériennes possédant de l'uréase, de l'uricase, des enzymes formant l'indol et le p-crésol a été démontrée (Wong *et al.* 2014, Barrios *et al.* 2015). En parallèle, ils observent une diminution, non significative, des bactéries du phylum *Bacteroidetes* et des bactéries de la famille des *Lactobacillaceae* (*Firmicutes*). Dans un modèle complémentaire chez le rat, les auteurs ont retrouvés globalement une richesse bactérienne plus importante chez les rats insuffisants rénaux et ils ont retrouvés les mêmes variations de la composition du microbiote (Vaziri *et al.* 2013). De façon similaire, Wang *et al* ont retrouvé une plus forte densité bactérienne chez les patients insuffisants rénaux que chez les individus contrôles. Ils décrivent également une expansion de 5 genres bactériens (*Klebsiella*, *Proteus ssp*, *E. coli*, *Enterobacter*, *Pseudomonas*) appartenant au phylum des *Proteobacteria* (Wang *et al.* 2012).

Les *Lactobacilles* ont un rôle important dans la protection contre les espèces pathogènes à Gram négatif ou contre les bactéries anaérobies facultatives par : compétition entre les espèces, sécrétion de mucines, protection des CEI et des TJ. C'est pourquoi, la diminution des *Lactobacillaceae* chez les patients insuffisants rénaux peut favoriser l'expansion de bactéries pathogènes et la TBD [revue, (Sampaio-Maia *et al.* 2016)]. Les *Enterobacteriaceae* et autres *Proteobacteria* sont des bactéries anaérobies facultatives à Gram négatif souvent douées d'une mobilité et largement impliquées dans la production d'endotoxines. Leur augmentation en cas d'IRC serait donc impliquée dans le développement de l'endotoxémie [revue, (Sampaio-Maia *et al.* 2016)].

L'évolution de la composition du microbiote après transplantation rénale reste peu décrite. Deux principales études pilotes ont été précédemment menées. Dans leur étude, Fricke *et al* ont travaillé entre autres sur des échantillons de selles récupérés chez 60 patients transplantés rénaux avant la transplantation, puis 1 et 6 mois après la transplantation. Ils ont réalisé un séquençage de la région V1-V3 du gène *ARNr 16S* par technique 454 (pyroséquençage). L'ensemble des patients a reçu une antibioprophylaxie au BACTRIM pendant 6 mois après la greffe. Une diminution de la diversité bactérienne (indice de Shannon) a été rapportée à un mois du jour de la transplantation. Cette observation semblait stable puisqu'il n'y a pas eu de changement de la diversité entre 1 et 6 mois après transplantation. Une diminution significative de la présence de *Firmicutes* a été observée entre J0 et 1 mois. Ensuite, l'abondance de certaines bactéries des *Firmicutes* est augmentée entre 1 et 6 mois. Aucune autre variation n'a été décrite en fonction du temps. D'un point de vue clinique, une plus faible abondance de *Firmicutes* avant transplantation serait associée à une diminution du risque de rejet aigu et du risque d'infections après transplantation (Fricke *et al.* 2014). Lee *et al*, quant à eux, ont travaillé sur des échantillons de selles récupérés chez 26 patients transplantés rénaux à au moins deux temps entre le jour de la transplantation et les 3 mois suivant la greffe. Ils ont réalisé un séquençage de la région V4-V5 du gène *ARNr 16S* par technique Illumina MiSeq (séquençage haut débit de fragment d'ADN plus court, 300 pb). L'ensemble des patients a reçu une antibioprophylaxie au BACTRIM après la greffe (durée non précisée). Sur les 26 patients, 5 patients, tous traités par GALP, ont fournis un échantillon de selles avant transplantation et un autre environ 2 semaines après. Chez ces patients, il a été décrit une forte abondance des *Firmicutes* et de *Bacteroidetes* avant transplantation.

Après transplantation, ils ont observé une augmentation significative des *Proteobacteria* (notamment des *Enterobacteria*). Ils décrivent également une augmentation des *Actinobacteria* et une diminution des *Firmicutes* (notamment des *Lactobacillus*) et des *Bacteroidetes*. Les auteurs ont comparé le microbiote de l'ensemble des 26 patients après transplantation, en fonction du traitement d'induction : GALP (n=15) vs. Ac anti-CD25 (n=3). Les patients traités par GALP présentaient une plus forte abondance d'*Actinobacteria* que ceux traités par Ac anti-CD25 mais la différence n'était pas significative. D'un point de vue clinique, une plus faible abondance de *Bacteroidetes* et une plus faible diversité bactérienne seraient associées à une diminution du risque de diarrhées (Lee *et al.* 2014).

En accord avec les résultats de Fricke *et al.*, nous avons retrouvé une diminution de la diversité bactérienne après transplantation. La diminution de la diversité bactérienne observée de façon transitoire dans notre étude pourrait être associée à l'effet de l'antibioprophylaxie. En effet, nous avons vu que ce traitement est à l'origine d'une diminution de la diversité bactérienne et son administration est prescrite dans les 6 premiers mois suivant la greffe, ce qui correspond aux temps auxquels la diversité est réduite. Cependant, la diversité bactérienne avant transplantation a été décrite comme anormalement haute. La transplantation en elle-même et le sevrage des toxines urémiques peuvent également jouer un rôle dans la diminution de la diversité. Si nous suggérons que la réduction de la diversité est associée à l'effet du BACTRIM, les modifications du microbiote observées après transplantation ne semblent, quant à elles, ne pas correspondre à celles induites par ce traitement. En effet, nous avons observé une augmentation des *Firmicutes* et une diminution des *Bacteroidetes* après BACTRIM dans notre étude murine. Dans cette étude chez l'homme, nous observons, à l'inverse, une diminution des *Firmicutes* et une augmentation des *Bacteroidetes* jusqu'à 3 mois après la transplantation. De plus, nous avons observé une augmentation des *Proteobacteria* précocement après la greffe. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment décrits en transplantation rénale. L'augmentation de l'abondance de ces bactéries pourrait favoriser l'endotoxémie et les complications post-transplantation. L'intérêt de notre étude est que nous avons un suivi à plus long terme (jusqu'à un an pour 5 patients/16) et un recueil de selles pour tous nos patients à J0 nous donnant la possibilité de réaliser une comparaison avant/après transplantation. Fricke *et al.* ont

montré que le microbiote est relativement stable après transplantation. Nos résultats montrent que le microbiote se modifie entre J0 et 3 mois mais qu'il se modifie à nouveau entre 3 mois et un an pour revenir à une composition similaire à celle observée à J0. Ces résultats tendent à aller dans le même sens que les marqueurs d'intégrité de la barrière épithéliale intestinale et de l'inflammation, à savoir une diminution précocement après transplantation suivi d'une ré-augmentation. Nous pourrions suggérer que la transplantation aurait un effet bénéfique sur la dysbiose et la TBD mais que cet effet est transitoire. Il pourrait ainsi être dû à un effet protecteur de l'antibiothérapie.

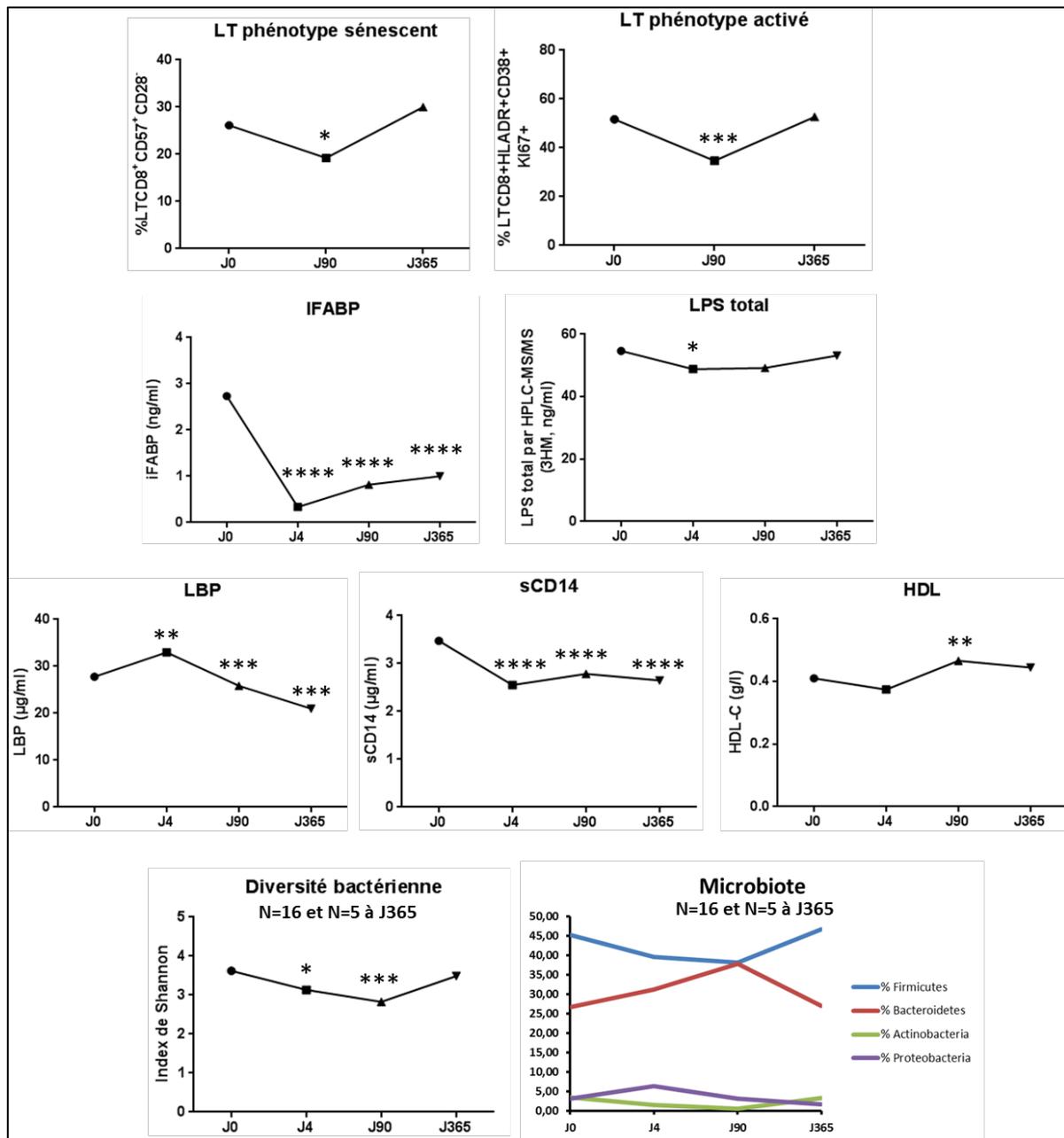
Nous devons rester prudents par rapport à l'interprétation des résultats de par l'hétérogénéité de nos patients et du faible nombre de patients pour lesquels nous avons un prélèvement à un an. Chaque patient doit être son propre témoin. En effet, lorsque nous réalisons des analyses en projection PCoA, aucune différence ni graphique ni statistique n'est retrouvée. Il semblerait que « l'effet patient » soit plus fort que l'effet du temps ou des traitements utilisés. La mise en évidence de profils de patients pourrait être intéressante pour les prochaines analyses.

### **3.5. Conclusion préliminaire : microbiote et inflammation chronique en transplantation rénale**

Dans l'étude GABII, nous avons dosé l'ensemble des marqueurs de la dysbiose jusqu'à la sénescence, mais le nombre de patients inclus dans cette étude est relativement faible. Les résultats préliminaires montrent que les sous-populations de LT de phénotypes activés et sénescents, l'iFABP, les marqueurs inflammatoires, la diversité bactérienne et le pourcentage de *Firmicutes* diminuent à J4 et J90 après transplantation rénale (et le LPS mais uniquement à J4). Le HDL et le pourcentage de *Bacteroidetes* augmentent aux mêmes temps. Ensuite, à partir de 3 mois et jusqu'à un an après transplantation, l'ensemble de ces marqueurs ont des concentrations qui augmentent, bien qu'elles restent pour la plupart, moins élevées que celles observées avant la transplantation (**figure 48**). Ces résultats pourraient suggérer que la transplantation rénale aurait un effet bénéfique, précoce et transitoire, sur l'ensemble des facteurs impliqués dans le développement de l'inflammation chronique.

La totalité des patients de la cohorte GABII n'a pas encore pu être étudiée et certains dosages sont actuellement en attente. De plus, les données cliniques ne sont pas

encore complètes pour le temps à un an après transplantation. C'est pourquoi, les analyses doivent être poursuivies. Nous aimerions également doser, en collaboration avec la plateforme lipidomique de Dijon, les sous-types de LPS circulant afin de mieux décrire et comprendre les mécanismes à l'origine de l'inflammation chronique après transplantation.



**Figure 48:** Représentation de la variation des moyennes de concentrations, en fonction du temps après transplantation rénale, des marqueurs dosés dans l'étude préliminaire de GABII (sur les 46 premiers patients de l'étude).

# **CONCLUSION & PERSPECTIVES**

---

---



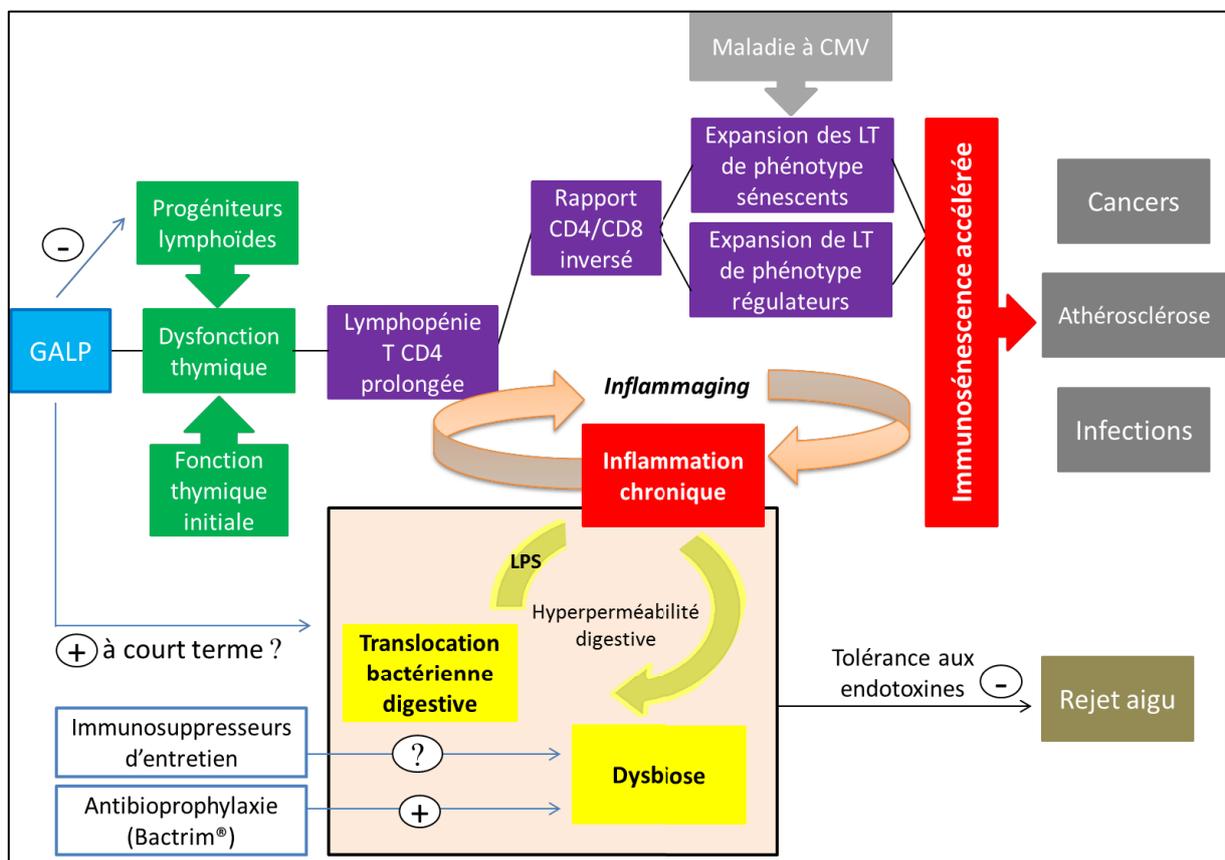
Les événements cardiovasculaires restent la première cause de décès chez le transplanté rénal et les facteurs de risque traditionnels ne peuvent à eux seuls expliquer cette surmortalité. L'ensemble de nos résultats montrent l'existence d'une immunosénescence accélérée chez certains patients transplantés rénaux pouvant expliquer l'incidence plus élevée de complications par rapport à la population générale et pour une même tranche d'âge. Les modifications du compartiment lymphocytaire T et l'inflammation chronique sont les deux pierres angulaires à l'origine de l'immunosénescence chez le transplanté rénal, et peuvent être reconnues comme des facteurs de risques non conventionnels des maladies cardio-vasculaires. Nous avons mis en évidence certains déterminants à l'origine de la sénescence et de l'inflammation chronique.

→ Les GALP peuvent entraîner une altération de la fonction thymique à l'origine de modifications immunitaires (décrites dans la figure X) contribuant à l'immunosénescence chez le transplanté rénal. Nous avons pu préciser un certain nombre de mécanismes sous-tendant cette altération thymique mais la toxicité des GALP sur les progéniteurs hématopoïétiques et sur le thymus restent à confirmer.

→ La stimulation immunitaire par le LPS circulant, issu d'une TBD secondaire à une rupture de la barrière intestinale, contribue au développement de l'inflammation chronique. Notre étude est la première à apporter des éléments de réponse sur l'évolution de la TBD après transplantation rénale, cependant, elle reste très descriptive quant à la présence et l'impact du LPS circulant. Les facteurs impliqués dans le déclenchement de la TBD et certains mécanismes de translocation après transplantation restent à élucider. *A priori*, les GALP n'ont pas d'effet direct sur la barrière immunitaire intestinale mais ces résultats restent à confirmer. Une modification de la composition du microbiote pourrait favoriser la TBD. Nous avons décrit une dysbiose après transplantation rénale. Les immunosuppresseurs d'entretien ne semblent pas entraîner de dysbiose, cependant, l'antibioprophylaxie semble pouvoir occasionner une dysbiose. Cependant, les modifications observées après transplantation ne semblent pas correspondre entièrement à celles observées après administration de cette antibiothérapie. Globalement nous devons poursuivre nos études afin de mieux caractériser l'implication d'une dysbiose et de la TBD en transplantation rénale sur l'inflammation chronique et la sénescence. Pris isolément, la dysbiose ne suffit pas à entraîner l'inflammation chronique systémique.

Elle doit être accompagnée d'une hyperperméabilité digestive et d'une augmentation de bactéries à Gram négatif possédant un LPS à fort pouvoir antigénique.

Ainsi l'ensemble de ces facteurs pourraient agir de manière synergique dans un modèle d'inflammation chronique et d'immunosénescence accélérée pouvant induire des complications couramment observée en transplantation rénale. La **figure 49** illustre ce modèle intégré, en tenant compte des différents déterminants qui régissent à la fois l'inflammation chronique et l'orientation de la reconstitution lymphocytaire après transplantation rénale.



**Figure 49 :** Modèle intégré des déterminants de l'inflammation chronique et de la reconstitution lymphocytaire après GALP potentiellement impliqués dans l'immunosénescence accélérée et de complications cliniques chez le transplanté rénal.

Dans le cadre de la transplantation rénale, le choix du traitement d'induction pourrait faire intervenir l'étude du degré d'immunosénescence pré-transplantation pour éviter d'exposer des patients à risque de présenter les complications d'une sur-immunosuppression après une transplantation aux effets des GALP. Dans la stratégie de minimisation des immunosuppresseurs, nous souhaiterions moduler les doses de GALP utilisées pour se rapprocher de la dose minimale efficace ayant un bon effet bénéfique/risque sur les sous-populations lymphocytaires et les événements cliniques induits par ce traitement [revue, (Bamoulid *et al.* 2016)].

La recherche des interactions entre le microbiote, la TBD et l'inflammation chronique chez les transplantés rénaux est importante puisqu'elle ouvre la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques visant à réduire l'activation immunitaire chronique [revue, (Koopen *et al.* 2016)].

→ L'administration d'agents capables de neutraliser les produits bactériens de la circulation sanguine peuvent permettre de diminuer l'activation de l'inflammation. Dans le cadre des essais cliniques pour le traitement du sepsis, des anticorps monoclonaux anti-LPS ont été développés, mais leur administration n'a eu aucun bénéfice sur la mortalité [revue, (Kell *et al.* 2015)]. Nos résultats suggèrent qu'une augmentation des concentrations plasmatiques de HDL pourrait offrir de nouvelles perspectives thérapeutiques pour détoxifier l'hôte du LPS. Galbois *et al* ont montré *ex vivo* que les patients atteints de cirrhose sévère présentaient un taux plasmatique de HDL et de cholestérol diminué et que l'administration de HDL recombinant diminuait l'inflammation induite par le LPS (Galbois *et al.* 2009). Cependant, ces études ont été réalisées dans des conditions d'inflammation aiguë, et non pas au cours d'inflammation chronique.

→ Une stratégie de modulation du microbiote par l'apport par voie orale de probiotiques (micro-organismes vivants non pathogènes) est démontrée comme bénéfique pour l'hôte. L'administration de *Lactobacillus rhamnosus* chez des patients VIH+ sous antirétroviraux a permis d'augmenter la reconstitution des LT CD4 [revue, (Brenchley *et al.* 2012)]. Dans une étude menée sur des rats malnutris, transplantés du foie, sous antibiotiques et ciclosporine, Ren *et al* ont montré qu'une supplémentation en probiotiques *Bifidobacterium* et *Lactobacillus* favorise la restauration partielle de la

microflore intestinale et améliore la fonction de barrière intestinale (réduction des taux d'endotoxine sérique et de TNF- $\alpha$  et augmentation des sIgA et des LT dans les plaques de Peyer) (Ren *et al.* 2011). Chez l'homme, Sawas *et al.* ont montré, dans une méta-analyse sur 246 patients transplantés du foie, que l'apport en probiotiques réduit significativement le nombre d'infections post-transplantation ainsi que la durée des hospitalisations et de l'utilisation des antibiotiques après infections (Sawas *et al.* 2015). De même, nous pourrions tester l'effet des probiotiques sur la TBD, l'inflammation et les événements cliniques en transplantation rénale. Les probiotiques peuvent être combinés à des prébiotiques (symbiotiques), des composants alimentaires non digestibles, utiles à la croissance ou l'activité de certaines populations bactériennes intestinales [revue, (Sampaio-Maia *et al.* 2016)].

→ Une « stérilisation » du microbiote par une antibiothérapie avant une chirurgie abdominale est associée à une diminution de l'incidence des infections et septicémies après la chirurgie. Certains antibiotiques, notamment la rifaximine, peuvent donc avoir un effet protecteur sur la TBD mais à long terme, ce n'est pas la meilleure approche thérapeutique à cause du développement de bactéries résistantes [revue, (Brenchley *et al.* 2012)]. Emal *et al.* ont montré, dans un modèle murin, qu'un appauvrissement du microbiote, réalisé par administration d'un cocktail d'antibiotiques (ampicilline, métronidazole, néomycine et vancomycine), atténuait significativement les lésions rénales, les dysfonctionnements et les lésions des organes distants et préservait l'intégrité tubulaire après une ischémie-reperfusion rénale (Emal *et al.* 2016). Un appauvrissement du microbiote en amont de la transplantation rénale pourrait ainsi avoir un intérêt.

→ A l'inverse, une transplantation fécale par sonde nasogastrique avec un microbiote sain permet de retrouver une homéostasie intestinale. Cette pratique est actuellement pratiquée dans les cas de *Clostridium difficile* résistants aux antibiotiques (Hagel *et al.* 2016).

→ La cytokine IL-22 a un rôle dans le maintien de la barrière épithéliale et la synthèse de peptides antimicrobiens. Dans des modèles murins, il a été montré que l'administration d'IL-22 peut améliorer l'inflammation au niveau intestinal en cas de

rectocolite ulcération ou au niveau du foie en cas d'hépatite [revue, (Brenchley *et al.* 2012)].

→ De nombreuses autres molécules peuvent avoir un effet sur le microbiote bénéfiques pour l'hôte, telles que le glucagon-like peptide qui améliore la structure de la barrière intestinale [revue, (Brenchley *et al.* 2012)], la berberine qui peut diminuer les toxines urémiques et l'hyperperméabilité intestinale (Yu *et al.* 2016).



# ANNEXES

---

---



## Implications cliniques de l'immunosénescence dans les maladies rénales chroniques

Jamal Bamoulid<sup>1,2</sup>, Clémence Carron<sup>1</sup>, Thomas Crépin<sup>1,2</sup>, Philippe Saas<sup>1</sup>, Didier Ducloux<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Inserm U1098, EFS B/FC, Université de Franche-Comté, LabEx LipSTIC, FHU INCREASE, 8, rue JFX Girod, F-25020 Besançon, France ;

<sup>2</sup>CHRU Besançon, néphrologie, F-25030 Besançon, France. [jbamoulid@chu-besancon.fr](mailto:jbamoulid@chu-besancon.fr)

► L'insuffisance rénale chronique (IRC) est caractérisée par une perte progressive de la capacité des reins à filtrer le sang avec pour conséquences une accumulation sanguine de toxines urémiques et l'apparition de troubles hydroélectrolytiques. Elle s'accompagne de la perte de certaines fonctions hormonales entraînant l'apparition de troubles phosphocalciques et d'une anémie. Les causes d'insuffisance rénale chronique sont multiples, mais les complications communes : anémie, œdèmes, ostéopathie, augmentation du risque de mortalité, notamment d'origine infectieuse et cardiovasculaire. Au stade d'insuffisance rénale terminale, deux traitements de suppléance sont disponibles : l'épuration extrarénale, encore appelée dialyse, et/ou la transplantation rénale. Alors que la dialyse s'accompagne d'une forte morbi-mortalité, la transplantation rénale améliore la qualité et l'espérance de vie des patients, et reste à ce jour le traitement de choix de l'insuffisance rénale terminale.

### Modifications du système immunitaire au cours de l'insuffisance rénale

Des travaux récents suggèrent que les modifications phénotypiques et fonctionnelles du système immunitaire au cours de l'insuffisance rénale chronique pourraient contribuer à l'état inflammatoire chronique décrit chez ces patients et expliquer en partie la surmortalité constatée. En effet, l'insuffisance rénale chronique s'accompagne d'une diminution de l'immunité adaptative dont témoignent la diminution de la réponse vaccinale et

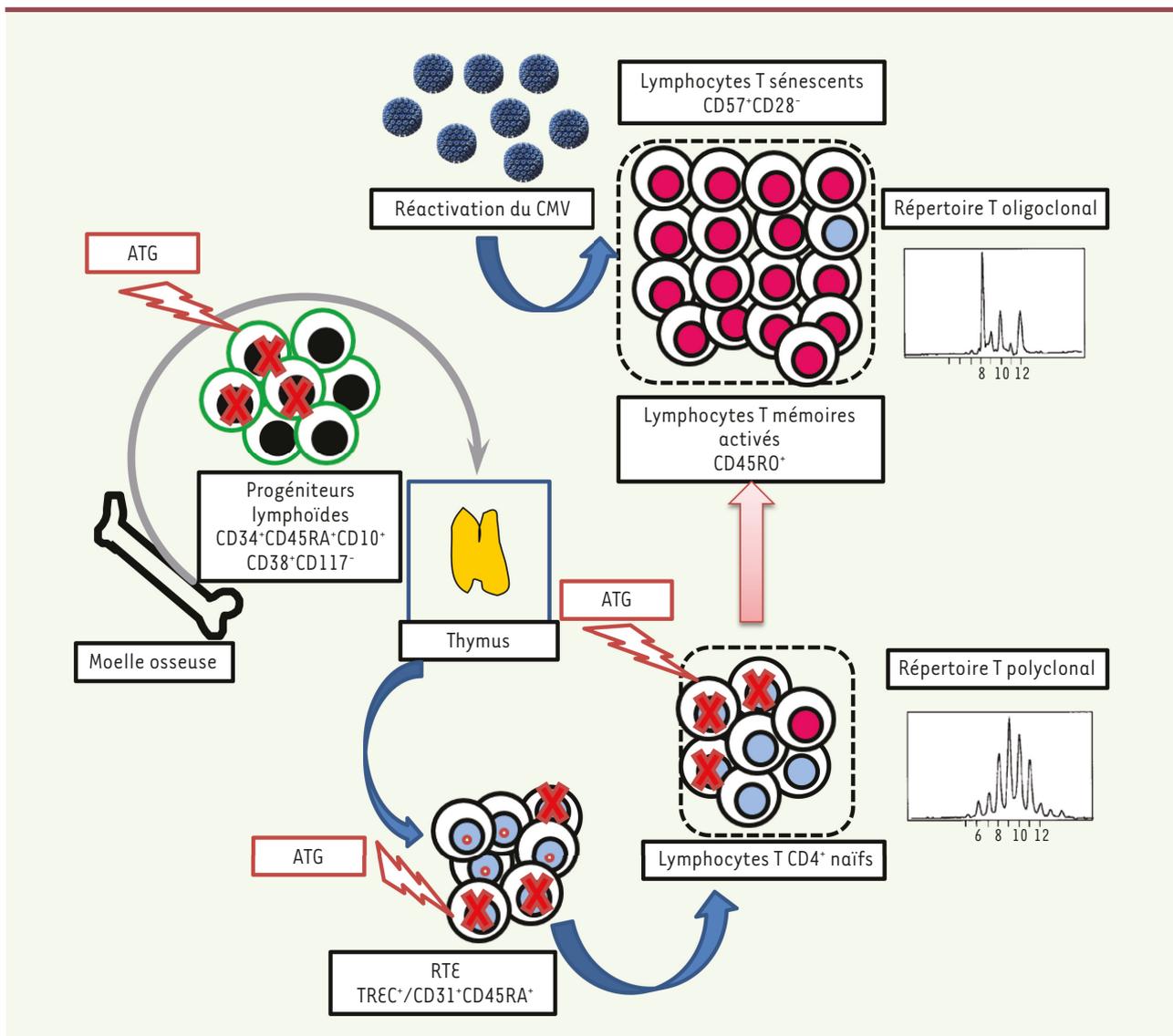
l'augmentation de la susceptibilité aux infections, toutes deux caractéristiques de ce que l'on observe chez les personnes âgées [1]. Carerro *et al.* [2] ont rapporté une augmentation des marqueurs d'immunosénescence (ce terme désigne le vieillissement du système immunitaire) chez les patients en hémodialyse. Cette immunosénescence prématurée serait secondaire au stress oxydatif et au statut inflammatoire chronique, induits à la fois par des facteurs « urémiques » et par les stimulations antigéniques répétées, liées aux matériaux bio-incompatibles utilisés en dialyse. Betjes *et al.* [3] ont confirmé cette association entre insuffisance rénale terminale et immunosénescence prématurée. En revanche, l'immunosénescence est très peu documentée chez les patients après une transplantation rénale. L'amélioration de la fonction rénale et le sevrage de la dialyse pourraient induire une réversibilité de l'immunosénescence après la transplantation.

### Immunosénescence : concept et marqueurs immunologiques

L'inflammation chronique et l'activation lymphocytaire sont deux pierres angulaires de l'immunosénescence liée à l'âge. Celle-ci contribue au risque accru de complications dégénératives (cancers, infections) et de mortalité caractérisant les personnes âgées.

L'involution thymique, ou perte de la fonction du thymus, organe impliqué dans l'éducation des lymphocytes T naïfs, est caractéristique de l'immunosénescence [4]. Elle débute dès l'adolescence et se poursuit tout au long de la vie adulte.

Histologiquement, elle se traduit par une transformation grasseuse du tissu thymique, expliquant la réduction constante de la capacité de ce tissu à produire des lymphocytes T naïfs et à maintenir un répertoire immunitaire T polyclonal, garant de l'efficacité de la réponse du système immunitaire à tout nouvel antigène. Cette involution s'accompagne d'altérations de la composition et de la fonction des lymphocytes T : réduction du compartiment de lymphocytes T naïfs, expansion de celui des lymphocytes T mémoires caractérisés par la capacité à produire des cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$  [interféron], TNF- $\alpha$  [*tumor necrosis factor*]), restriction oligoclonale du répertoire lymphocytaire T, raccourcissement de la taille des télomères des lymphocytes T (sénescence répllicative), diminution de la capacité fonctionnelle des lymphocytes T à contrôler les infections et à répondre aux vaccins [5]. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> deviennent plus sensibles à l'apoptose que les lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, ce qui conduit à une inversion du rapport CD4/CD8. Certaines données suggèrent également une expansion associée du compartiment des lymphocytes T régulateurs [6]. Les infections virales latentes, en particulier par le cytomégalovirus (CMV), contribuent à l'accélération du phénomène d'immunosénescence par la stimulation antigénique chronique qu'elles entretiennent et qui favorise l'expansion périphérique d'une population oligoclonale de lymphocytes T anti-CMV au détriment des autres populations lymphocytaires T, conduisant ainsi à la perte du caractère polyclonal du répertoire T [5].



**Figure 1. Facteurs contribuant à la persistance ou à l'aggravation de l'immunosénescence accélérée après transplantation rénale.** Rôle conjoint de l'ATG (globulines polyclonales antilymphocytaires) sur les progéniteurs lymphoïdes en amont du thymus, sur les RTE (*recent thymic emigrants*, lymphocytes T naïfs émigrant du thymus) et les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs et du CMV augmentant le *pool* de lymphocytes T mémoires, puis sénescents. TREC : *T cell receptor excision circles*.

### Immunosénescence accélérée et états pathologiques

Plusieurs travaux ont mis en évidence un phénomène d'immunosénescence accélérée dans des états pathologiques associés à une inflammation chronique et une morbi-mortalité élevée, proche de celle qui est observée dans la population âgée et la population dialysée. Les patients irradiés, survivants des catastrophes atomiques d'Hiroshima et de Nagasaki, développent une lymphopénie T CD4<sup>+</sup> prolongée associée à une

augmentation de l'incidence d'infarctus du myocarde [7]. L'analyse des lymphocytes T met en évidence un renouvellement faible des populations naïves et une restriction du répertoire entraînant une altération de l'immunité anti-infectieuse [8]. Le renouvellement à long terme du pool lymphocytaire se fait aux dépens de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> mémoires [9]. Cette reconstitution s'accompagne d'une augmentation des marqueurs d'inflammation (protéine C réactive, IL-6) [10]. Les mêmes observations cli-

niques et immunologiques ont été rapportées dans la lymphopénie induite par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) [11]. En outre, l'exposition chronique de cette population immunodéprimée à des pathogènes tels que le CMV accélérerait l'immunosénescence [12].

### Immunosénescence et transplantation d'organe

Nous avons récemment confirmé qu'une immunosénescence accélérée existait chez les patients atteints d'insuffisance

réale terminale au moment de la transplantation rénale [13]. On observe ainsi (1) une dysfonction thymique ; (2) une proportion élevée de lymphocytes T sénescents (CD57<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>) ; (3) un raccourcissement de la taille des télomères et une activité télomérase<sup>1</sup> lymphocytaire effondrée. L'amélioration de la fonction rénale et le sevrage de la dialyse induites par la transplantation permettent de corriger - au moins partiellement - l'immunosénescence chez un certain nombre de patients. En revanche, chez d'autres, paradoxalement, l'immunosénescence persiste, voire s'aggrave. Deux facteurs principaux semblent contribuer à ce phénomène : l'utilisation de globulines anti-lymphocytaires polyclonales ou ATG, un traitement de prévention du rejet aigu d'allogreffe qui entraîne une profonde lymphopénie T, et l'infection par le CMV. L'ATG induit : (1) une dysfonction thymique et une diminution du pourcentage des progéniteurs lymphoïdes circulants en amont du thymus ; (2) une augmentation de la proportion des lymphocytes T sénescents, accentuée par la séropositivité pour le CMV ; (3) une augmentation du pourcentage des lymphocytes T régulateurs d'origine périphérique, accentuée par la dysfonction thymique ; (4) la persistance d'un raccourcissement de la taille des télomères et d'une activité télomérase lymphocytaire effondrée (Figure 1). Ces anomalies ne sont pas observées chez des patients transplantés, mais qui ont reçu, comme alternative à l'ATG, un traitement d'induction par basiliximab,

un anticorps monoclonal anti-CD25 bloquant l'activation des lymphocytes T sans entraîner de lymphopénie. Les conséquences cliniques de la persistance ou de l'accélération de l'immunosénescence après l'administration d'ATG restent à éclaircir (toxicité thymique directe ou indirecte, myélotoxicité).

Notre travail montre également que, chez les patients traités exclusivement par ATG, une proportion élevée de lymphocytes T sénescents au moment de la transplantation est associée à un risque plus élevé de maladies à CMV et à une augmentation de l'incidence cumulée de rejets aigus. Ceci suggère que l'ATG accroît les conséquences de ces altérations immunologiques. Un travail récent suggère aussi que l'expansion des lymphocytes T sénescents après transplantation est associée à une dysfonction chronique du greffon rénal à long terme [14]. Le rôle pathogène des lymphocytes T sénescents reste controversé, même s'il est de plus en plus souvent décrit dans diverses maladies auto-immunes ou auto-inflammatoires [15]. Les mécanismes physiopathologiques impliquant ces lymphocytes sont encore mal connus, notamment en transplantation rénale. Enfin, si cette implication était avérée, il resterait néanmoins à découvrir comment prévenir ou inverser ce phénomène. ♦

### Clinical consequences of immunosenescence in chronic kidney diseases

#### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

#### RÉFÉRENCES

1. Verkade MA, van de Wetering J, Klepper M, et al. Peripheral blood dendritic cells and GM-CSF as an

adjuvant for hepatitis B vaccination in hemodialysis patients. *Kidney Int* 2004 ; 66 : 614-21.

2. Carrero JJ, Stenvinkel P, Fellstrom B, et al. Telomere attrition is associated with inflammation, low fetuin-A levels and high mortality in prevalent haemodialysis patients. *J Intern Med* 2008 ; 263 : 302-12.
3. Betjes MG, Langerak AW, van der Spek A, et al. Premature aging of circulating T cells in patients with end-stage renal disease. *Kidney Int* 2011 ; 80 : 208-17.
4. Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. *J Pathol* 2007 ; 211 : 144-56.
5. Derhovanessian E, Maier AB, Beck R, et al. Hallmark features of immunosenescence are absent in familial longevity. *J Immunol* 2010 ; 185 : 4618-24.
6. Wang L, Xie Y, Zhu LJ, et al. An association between immunosenescence and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells: a systematic review. *Biomed Environ Sci* 2010 ; 23 : 327-32.
7. Kusunoki Y, Kyoizumi S, Yamaoka M, et al. Decreased proportion of CD4 T cells in the blood of atomic bomb survivors with myocardial infarction. *Radiat Res* 1999 ; 152 : 539-43.
8. Kusunoki Y, Yamaoka M, Kasagi F, et al. Long-lasting changes in the T-cell receptor V beta repertoires of CD4 memory T-cell populations in the peripheral blood of radiation-exposed people. *Br J Haematol* 2003 ; 122 : 975-84.
9. Yamaoka M, Kusunoki Y, Kasagi F, et al. Decreases in percentages of naive CD4 and CD8 T cells and increases in percentages of memory CD8 T-cell subsets in the peripheral blood lymphocyte populations of A-bomb survivors. *Radiat Res* 2004 ; 161 : 290-8.
10. Hayashi T, Kusunoki Y, Hakoda M, et al. Radiation dose-dependent increases in inflammatory response markers in A-bomb survivors. *Int J Radiat Biol* 2003 ; 79 : 129-36.
11. Deeks SG. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu Rev Med* 2011 ; 62 : 141-55.
12. Hsue PY, Hunt PW, Sinclair E, et al. Increased carotid intima-media thickness in HIV patients is associated with increased cytomegalovirus-specific T-cell responses. *AIDS* 2006 ; 20 : 2275-83.
13. Crépin T, Carron C, Roubiou C, et al. ATG-induced accelerated immune senescence: clinical implications in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2015 ; 15 : 1028-38.
14. Yap M, Boeffard F, Clave E, et al. Expansion of highly differentiated cytotoxic terminally differentiated effector memory CD8<sup>+</sup> T cells in a subset of clinically stable kidney transplant recipients: a potential marker for late graft dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2014 ; 25 : 1856-68.
15. Broux B, Markovic-Plese S, Stinissen P, Hellings N. Pathogenic features of CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T cells in immune disorders. *Trends Mol Med* 2012 ; 18 : 446-53.

<sup>1</sup> La télomérase est l'enzyme qui ajoute des répétitions d'ADN télomérique aux extrémités des chromosomes, évitant leur raccourcissement.



**Tarifs d'abonnement m/s - 2015**

**Abonnez-vous**

**à médecine/sciences**

**> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès des sciences biologiques et médicales**

---

**Bulletin d'abonnement**

**page 492 dans ce numéro de m/s**





# **BIBLIOGRAPHIE**

---

---



(2012). "Structure, function and diversity of the healthy human microbiome." Nature 486(7402): 207-214.

Abad-Fernandez, M., A. Vallejo, B. Hernandez-Novoa, L. Diaz, C. Gutierrez, N. Madrid, M. A. Munoz and S. Moreno (2013). "Correlation between different methods to measure microbial translocation and its association with immune activation in long-term suppressed HIV-1-infected individuals." J Acquir Immune Defic Syndr 64(2): 149-153.

Agnese, D. M., J. E. Calvano, S. J. Hahm, S. M. Coyle, S. A. Corbett, S. E. Calvano and S. F. Lowry (2002). "Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections." J Infect Dis 186(10): 1522-1525.

Akunuru, S. and H. Geiger (2016). "Aging, Clonality, and Rejuvenation of Hematopoietic Stem Cells." Trends Mol Med 22(8): 701-712.

Alakomi, H. L., E. Skytta, M. Saarela, T. Mattila-Sandholm, K. Latva-Kala and I. M. Helander (2000). "Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane." Appl Environ Microbiol 66(5): 2001-2005.

Alegre, M. L., C. Bartman and A. S. Chong (2014). "Microbes and allogeneic transplantation." Transplantation 97(1): 5-11.

Alegre, M. L., R. B. Mannon and P. J. Mannon (2014). "The microbiota, the immune system and the allograft." Am J Transplant 14(6): 1236-1248.

Ancuta, P., T. Pedron, R. Girard, G. Sandstrom and R. Chaby (1996). "Inability of the Francisella tularensis lipopolysaccharide to mimic or to antagonize the induction of cell activation by endotoxins." Infect Immun 64(6): 2041-2046.

Anders, H. J., K. Andersen and B. Stecher (2013). "The intestinal microbiota, a leaky gut, and abnormal immunity in kidney disease." Kidney Int 83(6): 1010-1016.

Andersen, K., M. S. Kesper, J. A. Marschner, L. Konrad, M. Ryu, S. Kumar Vr, O. P. Kulkarni, S. R. Mulay, S. Romoli, J. Demleitner, P. Schiller, A. Dietrich, S. Muller, O. Gross, H. J. Ruscheweyh, D. H. Huson, B. Stecher and H. J. Anders (2016). "Intestinal Dysbiosis, Barrier Dysfunction, and Bacterial Translocation Account for CKD-Related Systemic Inflammation." J Am Soc Nephrol.

Anderson, G. and Y. Takahama (2012). "Thymic epithelial cells: working class heroes for T cell development and repertoire selection." Trends Immunol 33(6): 256-263.

Anthony, B. A. and D. C. Link (2014). "Regulation of hematopoietic stem cells by bone marrow stromal cells." Trends Immunol 35(1): 32-37.

Appay, V. and A. D. Kelleher (2016). "Immune activation and immune aging in HIV infection." Curr Opin HIV AIDS 11(2): 242-249.

Arumugam, M., J. Raes, E. Pelletier, D. Le Paslier, T. Yamada, D. R. Mende, G. R. Fernandes, J. Tap, T. Bruls, J. M. Batto, M. Bertalan, N. Borruel, F. Casellas, L. Fernandez, L. Gautier, T. Hansen, M. Hattori, T. Hayashi, M. Kleerebezem, K. Kurokawa, M. Leclerc, F. Levenez, C. Manichanh, H. B. Nielsen, T. Nielsen, N. Pons, J. Poulain, J. Qin, T. Sicheritz-Ponten, S. Tims, D. Torrents, E. Ugarte, E. G. Zoetendal, J. Wang, F. Guarner, O. Pedersen, W. M. de Vos, S. Brunak, J. Dore, M. Antolin, F. Artiguenave, H. M. Blottiere, M. Almeida, C. Brechot, C. Cara, C. Chervaux, A. Cultrone, C. Delorme, G. Denariatz, R. Dervyn, K. U. Foerstner, C. Friss, M. van de Guchte, E. Guedon, F. Haimet, W. Huber, J. van Hylckama-Vlieg, A. Jamet, C. Juste, G. Kaci, J. Knol, O. Lakhdari, S. Layec, K. Le Roux, E. Maguin, A. Merieux, R. Melo Minardi, C. M'Rini, J. Muller, R. Oozeer, J. Parkhill, P. Renault, M. Rescigno, N. Sanchez, S. Sunagawa, A. Torrejon, K. Turner, G. Vandemeulebrouck, E. Varela, Y. Winogradsky, G. Zeller, J. Weissenbach, S. D. Ehrlich and P. Bork (2011). "Enterotypes of the human gut microbiome." Nature 473(7346): 174-180.

Atarashi, K., T. Tanoue, K. Oshima, W. Suda, Y. Nagano, H. Nishikawa, S. Fukuda, T. Saito, S. Narushima, K. Hase, S. Kim, J. V. Fritz, P. Wilmes, S. Ueha, K. Matsushima, H. Ohno, B. Olle, S. Sakaguchi, T. Taniguchi, H. Morita, M. Hattori and K. Honda (2013). "Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota." Nature 500(7461): 232-236.

Backhed, F., J. K. Manchester, C. F. Semenkovich and J. I. Gordon (2007). "Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice." Proc Natl Acad Sci U S A 104(3): 979-984.

Backhed, F., J. Roswall, Y. Peng, Q. Feng, H. Jia, P. Kovatcheva-Datchary, Y. Li, Y. Xia, H. Xie, H. Zhong, M. T. Khan, J. Zhang, J. Li, L. Xiao, J. Al-Aama, D. Zhang, Y. S. Lee, D. Kotowska, C. Colding, V. Tremaroli, Y. Yin, S. Bergman, X. Xu, L. Madsen, K. Kristiansen, J. Dahlgren and J. Wang (2015). "Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life." Cell Host Microbe 17(5): 690-703.

Balagopal, A., B. Barin, J. Quinn, R. Rogers, M. S. Sulkowski and P. G. Stock (2015). "Immunologic Predictors of Liver Transplantation Outcomes in HIV-HCV Co-Infected Persons." PLoS One 10(8): e0135882.

Bamoulid, J., C. Carron, T. Crepin, P. Saas and D. Ducloux (2015). "[Clinical consequences of immunosenescence in chronic kidney diseases]." Med Sci (Paris) 31(5): 484-486.

Bamoulid, J., C. Courivaud, T. Crepin, C. Carron, E. Gaiffe, C. Roubiou, C. Laheurte, B. Moulin, L. Frimat, P. Rieu, C. Mousson, A. Durrbach, A. E. Heng, J. M. Rebibou, P. Saas and D. Ducloux (2016). "Pretransplant thymic function predicts acute rejection in antithymocyte globulin-treated renal transplant recipients." Kidney Int 89(5): 1136-1143.

Bamoulid, J., O. Staeck, T. Crepin, F. Halleck, P. Saas, S. Brakemeier, D. Ducloux and K. Budde (2016). "Anti-thymocyte globulins in kidney transplantation: focus on current indications and long-term immunological side effects." Nephrol Dial Transplant.

Barrios, C., M. Beaumont, T. Pallister, J. Villar, J. K. Goodrich, A. Clark, J. Pascual, R. E. Ley, T. D. Spector, J. T. Bell and C. Menni (2015). "Gut-Microbiota-Metabolite Axis in Early Renal Function Decline." PLoS One 10(8): e0134311.

Beiras-Fernandez, A., D. Chappell, C. Hammer, A. Beiras, B. Reichart and E. Thein (2009). "Impact of polyclonal anti-thymocyte globulins on the expression of adhesion and inflammation molecules after ischemia-reperfusion injury." Transpl Immunol 20(4): 224-228.

Berg, R. D. and A. W. Garlington (1979). "Translocation of certain indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph nodes and other organs in a gnotobiotic mouse model." Infect Immun 23(2): 403-411.

Berni Canani, R., M. Di Costanzo and L. Leone (2012). "The epigenetic effects of butyrate: potential therapeutic implications for clinical practice." Clin Epigenetics 4(1): 4.

Bi, X., A. Ishizaki, L. V. Nguyen, K. Matsuda, H. V. Pham, C. T. Phan, K. Ogata, T. T. Giang, T. T. Phung, T. T. Nguyen, M. Tokoro, A. N. Pham, D. T. Khu and H. Ichimura (2016). "Impact of HIV Infection and Anti-Retroviral Therapy on the Immune Profile of and Microbial Translocation in HIV-Infected Children in Vietnam." Int J Mol Sci 17(8).

Bischoff, S. C., G. Barbara, W. Buurman, T. Ockhuizen, J. D. Schulzke, M. Serino, H. Tilg, A. Watson and J. M. Wells (2014). "Intestinal permeability--a new target for disease prevention and therapy." BMC Gastroenterol 14: 189.

Biswas, S. K. and E. Lopez-Collazo (2009). "Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance." Trends Immunol 30(10): 475-487.

Bohrer, D., R. Horner, P. C. do Nascimento, M. Adaime, M. E. Pereira, A. F. Martins and S. A. Hartz (2001). "Interference in the Limulus ameocyte lysate assay for endotoxin determination in peritoneal dialysis fluids and concentrates for hemodialysis." J Pharm Biomed Anal 26(5-6): 811-818.

Bossola, M., M. Sanguinetti, D. Scribano, C. Zuppi, S. Giungi, G. Luciani, R. Torelli, B. Posteraro, G. Fadda and L. Tazza (2009). "Circulating bacterial-derived DNA fragments and markers of inflammation in chronic hemodialysis patients." Clin J Am Soc Nephrol 4(2): 379-385.

Bourriaud, C., R. J. Robins, L. Martin, F. Kozlowski, E. Tenailleau, C. Cherbut and C. Michel (2005). "Lactate is mainly fermented to butyrate by human intestinal microfloras but inter-individual variation is evident." J Appl Microbiol 99(1): 201-212.

Braza, F., S. Brouard, S. Chadban and D. R. Goldstein (2016). "Role of TLRs and DAMPs in allograft inflammation and transplant outcomes." Nat Rev Nephrol 12(5): 281-290.

Brenchley, J. M. and D. C. Douek (2012). "Microbial translocation across the GI tract." Annu Rev Immunol 30: 149-173.

Brenchley, J. M., D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B. R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J. N. Martin, F. M. Hecht, L. J. Picker, M. M. Lederman, S. G. Deeks and D. C. Douek (2006). "Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection." Nat Med 12(12): 1365-1371.

Brennan, D. C., K. Flavin, J. A. Lowell, T. K. Howard, S. Shenoy, S. Burgess, S. Dolan, J. M. Kano, M. Mahon, M. A. Schnitzler, R. Woodward, W. Irish and G. G. Singer (1999). "A randomized, double-blinded comparison of Thymoglobulin versus Atgam for induction immunosuppressive therapy in adult renal transplant recipients." Transplantation 67(7): 1011-1018.

Brown, E. M., M. Sadarangani and B. B. Finlay (2013). "The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine." Nat Immunol 14(7): 660-667.

Burcelin, R., M. Serino, C. Chabo, V. Blasco-Baque and J. Amar (2011). "Gut microbiota and diabetes: from pathogenesis to therapeutic perspective." Acta Diabetol 48(4): 257-273.

Campeotto, F., A. J. Waligora-Dupriet, F. Doucet-Populaire, N. Kalach, C. Dupont and M. J. Butel (2007). "[Establishment of the intestinal microflora in neonates]." Gastroenterol Clin Biol 31(5): 533-542.

Caramalho, I., T. Lopes-Carvalho, D. Ostler, S. Zelenay, M. Haury and J. Demengeot (2003). "Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide." J Exp Med 197(4): 403-411.

Cardona, S., A. Eck, M. Cassellas, M. Gallart, C. Alastrue, J. Dore, F. Azpiroz, J. Roca, F. Guarner and C. Manichanh (2012). "Storage conditions of intestinal microbiota matter in metagenomic analysis." BMC Microbiol 12: 158.

Cardoso, P. G., G. C. Macedo, V. Azevedo and S. C. Oliveira (2006). "Brucella spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system." Microb Cell Fact 5: 13.

Cario, E., G. Gerken and D. K. Podolsky (2007). "Toll-like receptor 2 controls mucosal inflammation by regulating epithelial barrier function." Gastroenterology 132(4): 1359-1374.  
Carrero, J. J. and P. Stenvinkel (2009). "Persistent inflammation as a catalyst for other risk factors in chronic kidney disease: a hypothesis proposal." Clin J Am Soc Nephrol 4 Suppl 1: S49-55.

Carroll, I. M., T. Ringel-Kulka, J. P. Siddle, T. R. Klaenhammer and Y. Ringel (2012). "Characterization of the fecal microbiota using high-throughput sequencing reveals a stable microbial community during storage." PLoS One 7(10): e46953.

Cerf-Bensussan, N. and V. Gaboriau-Routhiau (2010). "The immune system and the gut microbiota: friends or foes?" Nat Rev Immunol 10(10): 735-744.

Chappell, D., A. Beiras-Fernandez, C. Hammer and E. Thein (2006). "In vivo visualization of the effect of polyclonal antithymocyte globulins on the microcirculation after ischemia/reperfusion in a primate model." Transplantation 81(4): 552-558.

Chevalier, M. F., G. Petitjean, C. Dunyach-Remy, C. Didier, P. M. Girard, M. E. Manea, P. Campa, L. Meyer, C. Rouzioux, J. P. Lavigne, F. Barre-Sinoussi, D. Scott-Algara and L. Weiss (2013). "The Th17/Treg ratio, IL-1RA and sCD14 levels in primary HIV infection predict the T-cell activation set point in the absence of systemic microbial translocation." PLoS Pathog 9(6): e1003453.

Chiba, H., T. Kojima, M. Osanai and N. Sawada (2006). "The significance of interferon-gamma-triggered internalization of tight-junction proteins in inflammatory bowel disease." Sci STKE 2006(316): pe1.

Cho, I. and M. J. Blaser (2012). "The human microbiome: at the interface of health and disease." Nat Rev Genet 13(4): 260-270.

Christl, S. U., P. R. Murgatroyd, G. R. Gibson and J. H. Cummings (1992). "Production, metabolism, and excretion of hydrogen in the large intestine." Gastroenterology 102(4 Pt 1): 1269-1277.

Crepin, T., E. Gaiffe, C. Courivaud, C. Roubiou, C. Laheurte, B. Moulin, L. Frimat, P. Rieu, C. Mousson, A. Durrbach, A. E. Heng, P. Saas, J. Bamoulid and D. Ducloux (2016). "Pre-transplant end-stage renal disease-related immune risk profile in kidney transplant recipients predicts post-transplant infections." Transpl Infect Dis 18(3): 415-422.

Cummings, J. H., E. W. Pomare, W. J. Branch, C. P. Naylor and G. T. Macfarlane (1987). "Short chain fatty acids in human large intestine, portal, hepatic and venous blood." Gut 28(10): 1221-1227.

Dautin, G., Z. Soltani, D. Ducloux, T. Gautier, J. P. Pais de Barros, P. Gambert, L. Lagrost and D. Masson (2007). "Hemodialysis reduces plasma apolipoprotein C-I concentration making VLDL a better substrate for lipoprotein lipase." Kidney Int 72(7): 871-878.

Davila, A. M., F. Blachier, M. Gotteland, M. Andriamihaja, P. H. Benetti, Y. Sanz and D. Tome (2013). "Intestinal luminal nitrogen metabolism: role of the gut microbiota and consequences for the host." Pharmacol Res 68(1): 95-107.

De La Cochetiere, M. F., T. Durand, P. Lepage, A. Bourreille, J. P. Galmiche and J. Dore (2005). "Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge." J Clin Microbiol 43(11): 5588-5592.

Deeks, S. G. (2011). "HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging." Annu Rev Med 62: 141-155.

Derhovanessian, E., A. B. Maier, K. Hahnel, R. Beck, A. J. de Craen, E. P. Slagboom, R. G. Westendorp and G. Pawelec (2011). "Infection with cytomegalovirus but not herpes simplex

virus induces the accumulation of late-differentiated CD4+ and CD8+ T-cells in humans." J Gen Virol 92(Pt 12): 2746-2756.

Desquilbet, L. (2009). "Vieillesse - Fragilité et VIH." Retrieved 24 Mars 2009.

Dharnidharka, V. R., M. A. Schnitzler, J. Chen, D. C. Brennan, D. Axelrod, D. L. Segev, K. B. Schechtman, J. Zheng and K. L. Lentine (2016). "Differential risks for adverse outcomes 3 years after kidney transplantation based on initial immunosuppression regimen: a national study." Transpl Int 29(11): 1226-1236.

Diekmann, F. (2015). "Immunosuppressive minimization with mTOR inhibitors and belatacept." Transpl Int 28(8): 921-927.

Dillon, S. M., E. J. Lee, A. M. Donovan, K. Guo, M. S. Harper, D. N. Frank, M. D. McCarter, M. L. Santiago and C. C. Wilson (2016). "Enhancement of HIV-1 infection and intestinal CD4+ T cell depletion ex vivo by gut microbes altered during chronic HIV-1 infection." Retrovirology 13: 5.

Dillon, S. M., E. J. Lee, C. V. Kotter, G. L. Austin, Z. Dong, D. K. Hecht, S. Gianella, B. Siewe, D. M. Smith, A. L. Landay, C. E. Robertson, D. N. Frank and C. C. Wilson (2014). "An altered intestinal mucosal microbiome in HIV-1 infection is associated with mucosal and systemic immune activation and endotoxemia." Mucosal Immunol 7(4): 983-994.

Dominguez-Bello, M. G., E. K. Costello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, N. Fierer and R. Knight (2010). "Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns." Proc Natl Acad Sci U S A 107(26): 11971-11975.

Dominguez-Bello, M. G., K. M. De Jesus-Laboy, N. Shen, L. M. Cox, A. Amir, A. Gonzalez, N. A. Bokulich, S. J. Song, M. Hoashi, J. I. Rivera-Vinas, K. Mendez, R. Knight and J. C. Clemente (2016). "Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer." Nat Med 22(3): 250-253.

Dore, J. and G. Corthier (2010). "[The human intestinal microbiota]." Gastroenterol Clin Biol 34 Suppl 1: S7-15.

Douek, D. C., R. D. McFarland, P. H. Keiser, E. A. Gage, J. M. Massey, B. F. Haynes, M. A. Polis, A. T. Haase, M. B. Feinberg, J. L. Sullivan, B. D. Jamieson, J. A. Zack, L. J. Picker and R. A. Koup (1998). "Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection." Nature 396(6712): 690-695.

Douek, D. C., M. Roederer and R. A. Koup (2009). "Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS." Annu Rev Med 60: 471-484.

Dror, D. K. and L. H. Allen (2008). "Effect of vitamin B12 deficiency on neurodevelopment in infants: current knowledge and possible mechanisms." Nutr Rev 66(5): 250-255.

Du, Z., T. Hudcovic, J. Mrazek, H. Kozakova, D. Srutkova, M. Schwarzer, H. Tlaskalova-Hogenova, M. Kostovcik and M. Kverka (2015). "Development of gut inflammation in mice colonized with mucosa-associated bacteria from patients with ulcerative colitis." Gut Pathog 7: 32.

Ducloux, D., J. Bamoulid, C. Courivaud, B. Gaugler, J. M. Rebibou, C. Ferrand, J. M. Chalopin, C. Borg, P. Tiberghien and P. Saas (2011). "Thymic function, anti-thymocytes globulins, and cancer after renal transplantation." Transpl Immunol 25(1): 56-60.

Ducloux, D., P. Carron, E. Racadot, J. M. Rebibou, C. Bresson-Vautrin, Y. S. Hillier and J. M. Chalopin (1999). "T-cell immune defect and B-cell activation in renal transplant recipients with monoclonal gammopathies." Transpl Int 12(4): 250-253.

Ducloux, D., P. L. Carron, G. Motte, A. Ab, J. M. Rebibou, C. Bresson-Vautrin, P. Tiberghien, Y. Saint-Hillier and J. M. Chalopin (2002). "Lymphocyte subsets and assessment of cancer risk in renal transplant recipients." Transpl Int 15(8): 393-396.

Ducloux, D., P. L. Carron, E. Racadot, J. M. Rebibou, C. Bresson-Vautrin, Y. Saint-Hillier and J. M. Chalopin (1998). "CD4 lymphocytopenia in long-term renal transplant recipients." Transplant Proc 30(6): 2859-2860.

Ducloux, D., P. L. Carron, J. M. Rebibou, F. Aubin, V. Fournier, C. Bresson-Vautrin, D. Blanc, P. Humbert and J. M. Chalopin (1998). "CD4 lymphocytopenia as a risk factor for skin cancers in renal transplant recipients." Transplantation 65(9): 1270-1272.

Ducloux, D., B. Challier, P. Saas, P. Tiberghien and J. M. Chalopin (2003). "CD4 cell lymphopenia and atherosclerosis in renal transplant recipients." J Am Soc Nephrol 14(3): 767-772.

Ducloux, D., C. Courivaud, J. Bamoulid, T. Crepin, J. M. Chalopin, P. Tiberghien and P. Saas (2014). "Polyclonal antithymocyte globulin and cardiovascular disease in kidney transplant recipients." J Am Soc Nephrol 25(6): 1349-1356.

Ducloux, D., C. Courivaud, J. Bamoulid, B. Vivet, A. Chabroux, M. Deschamps, J. M. Rebibou, C. Ferrand, J. M. Chalopin, P. Tiberghien and P. Saas (2010). "Prolonged CD4 T cell lymphopenia increases morbidity and mortality after renal transplantation." J Am Soc Nephrol 21(5): 868-875.

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

Ducloux, D., A. Kazory and J. M. Chalopin (2004). "Predicting coronary heart disease in renal transplant recipients: a prospective study." Kidney Int 66(1): 441-447.

Ducluzeau, R. and P. Raibaud (1980). "[Interest in gnotoxenic systems for the study of host-microbial flora of the digestive tract]." Reprod Nutr Dev 20(5B): 1667-1678.

Duerkop, B. A., S. Vaishnava and L. V. Hooper (2009). "Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface." Immunity 31(3): 368-376.

Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson and D. A. Relman (2005). "Diversity of the human intestinal microbial flora." Science 308(5728): 1635-1638.

Ekberg, H., H. Tedesco-Silva, A. Demirbas, S. Vitko, B. Nashan, A. Gurkan, R. Margreiter, C. Hugo, J. M. Grinyo, U. Frei, Y. Vanrenterghem, P. Daloz and P. F. Halloran (2007). "Reduced exposure to calcineurin inhibitors in renal transplantation." N Engl J Med 357(25): 2562-2575.

Ellis, R. J., D. M. Small, D. A. Vesey, D. W. Johnson, R. Francis, L. Vitetta, G. C. Gobe and C. Morais (2016). "Indoxyl sulphate and kidney disease: Causes, consequences and interventions." Nephrology (Carlton) 21(3): 170-177.

Emal, D., E. Rampanelli, I. Stroo, L. M. Butter, G. J. Teske, N. Claessen, G. Stokman, S. Florquin, J. C. Leemans and M. C. Dessing (2016). "Depletion of Gut Microbiota Protects against Renal Ischemia-Reperfusion Injury." J Am Soc Nephrol.

Espinosa, J., F. Herr, G. Tharp, S. Bosinger, M. Song, A. B. Farris, 3rd, R. George, J. Cheeseman, L. Stempora, R. Townsend, A. Durrbach and A. D. Kirk (2016). "CD57(+) CD4 T Cells Underlie Belatacept-Resistant Allograft Rejection." Am J Transplant 16(4): 1102-1112.

Estes, J. D., L. D. Harris, N. R. Klatt, B. Tabb, S. Pittaluga, M. Paiardini, G. R. Barclay, J. Smedley, R. Pung, K. M. Oliveira, V. M. Hirsch, G. Silvestri, D. C. Douek, C. J. Miller, A. T. Haase, J. Lifson and J. M. Brenchley (2010). "Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections." PLoS Pathog 6(8): e1001052.

Fantus, D., N. M. Rogers, F. Grahammer, T. B. Huber and A. W. Thomson (2016). "Roles of mTOR complexes in the kidney: implications for renal disease and transplantation." Nat Rev Nephrol 12(10): 587-609.

Farlik, M., F. Halbritter, F. Muller, F. A. Choudry, P. Ebert, J. Klughammer, S. Farrow, A. Santoro, V. Ciaurro, A. Mathur, R. Uppal, H. G. Stunnenberg, W. H. Ouwehand, E. Laurenti, T. Lengauer, M. Frontini and C. Bock (2016). "DNA Methylation Dynamics of Human Hematopoietic Stem Cell Differentiation." Cell Stem Cell 19(6): 808-822.

Felizardo, R. J., A. Castoldi, V. Andrade-Oliveira and N. O. Camara (2016). "The microbiota and chronic kidney diseases: a double-edged sword." Clin Transl Immunology 5(6): e86.

Ferguson, F. G., A. Wikby, P. Maxson, J. Olsson and B. Johansson (1995). "Immune parameters in a longitudinal study of a very old population of Swedish people: a comparison between survivors and nonsurvivors." J Gerontol A Biol Sci Med Sci 50(6): B378-382.

- Fihn, B. M., A. Sjoqvist and M. Jodal (2000). "Permeability of the rat small intestinal epithelium along the villus-crypt axis: effects of glucose transport." Gastroenterology 119(4): 1029-1036.
- Foit, L. and C. S. Thaxton (2016). "Synthetic high-density lipoprotein-like nanoparticles potently inhibit cell signaling and production of inflammatory mediators induced by lipopolysaccharide binding Toll-like receptor 4." Biomaterials 100: 67-75.
- Forchielli, M. L. and W. A. Walker (2005). "The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence." Br J Nutr 93 Suppl 1: S41-48.
- Franceschi, C., M. Bonafe, S. Valensin, F. Olivieri, M. De Luca, E. Ottaviani and G. De Benedictis (2000). "Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence." Ann N Y Acad Sci 908: 244-254.
- Franceschi, C. and J. Campisi (2014). "Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases." J Gerontol A Biol Sci Med Sci 69 Suppl 1: S4-9.
- Fraser, S. D. and T. Blakeman (2016). "Chronic kidney disease: identification and management in primary care." Pragmat Obs Res 7: 21-32.
- Fricke, W. F., C. Maddox, Y. Song and J. S. Bromberg (2014). "Human microbiota characterization in the course of renal transplantation." Am J Transplant 14(2): 416-427.
- Fukushima, R., L. Gianotti and J. W. Alexander (1994). "The primary site of bacterial translocation." Arch Surg 129(1): 53-58.
- Furuse, M., K. Fujita, T. Hiragi, K. Fujimoto and S. Tsukita (1998). "Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin." J Cell Biol 141(7): 1539-1550.
- Gaboriau-Routhiau, V., S. Rakotobe, E. Lecuyer, I. Mulder, A. Lan, C. Bridonneau, V. Rochet, A. Pisi, M. De Paepe, G. Brandi, G. Eberl, J. Snel, D. Kelly and N. Cerf-Bensussan (2009). "The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses." Immunity 31(4): 677-689.
- Galanos, C., O. Luderitz, E. T. Rietschel, O. Westphal, H. Brade, L. Brade, M. Freudenberg, U. Schade, M. Imoto, H. Yoshimura and et al. (1985). "Synthetic and natural Escherichia coli free lipid A express identical endotoxic activities." Eur J Biochem 148(1): 1-5.
- Galbois, A., D. Thabut, K. A. Tazi, M. Rudler, M. S. Mohammadi, D. Bonnefont-Rousselot, H. Bennani, A. Bezeaud, Z. Tellier, C. Guichard, N. Coant, E. Ogier-Denis, R. Moreau and D. Lebrech (2009). "Ex vivo effects of high-density lipoprotein exposure on the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in patients with severe cirrhosis." Hepatology 49(1): 175-184.

Gansevoort, R. T., R. Correa-Rotter, B. R. Hemmelgarn, T. H. Jafar, H. J. Heerspink, J. F. Mann, K. Matsushita and C. P. Wen (2013). "Chronic kidney disease and cardiovascular risk: epidemiology, mechanisms, and prevention." Lancet 382(9889): 339-352.

Ganz, T., M. E. Selsted, D. Szklarek, S. S. Harwig, K. Daher, D. F. Bainton and R. I. Lehrer (1985). "Defensins. Natural peptide antibiotics of human neutrophils." J Clin Invest 76(4): 1427-1435.

Gaugler, B., B. Lamarthee, M. Couturier and P. Saas (2013). "[Interleukin-22: its role in graft-versus-host-disease unraveled]." Med Sci (Paris) 29(6-7): 577-579.

Gautier, T., A. Klein, V. Deckert, C. Desrumaux, N. Ogier, A. L. Sberna, C. Paul, N. Le Guern, A. Athias, T. Montange, S. Monier, F. Piard, X. C. Jiang, D. Masson and L. Lagrost (2008). "Effect of plasma phospholipid transfer protein deficiency on lethal endotoxemia in mice." J Biol Chem 283(27): 18702-18710.

Gautier, T. and L. Lagrost (2011). "Plasma PLTP (phospholipid-transfer protein): an emerging role in 'reverse lipopolysaccharide transport' and innate immunity." Biochem Soc Trans 39(4): 984-988.

Gautier, T., C. Paul, V. Deckert, C. Desrumaux, A. Klein, J. Labbe, N. Le Guern, A. Athias, S. Monier, A. Hammann, A. Bettaieb, J. F. Jeannin and L. Lagrost (2010). "Innate immune response triggered by triacyl lipid A is dependent on phospholipid transfer protein (PLTP) gene expression." FASEB J 24(9): 3544-3554.

Genestier, L., S. Fournel, M. Flacher, O. Assossou, J. P. Revillard and N. Bonnefoy-Berard (1998). "Induction of Fas (Apo-1, CD95)-mediated apoptosis of activated lymphocytes by polyclonal antithymocyte globulins." Blood 91(7): 2360-2368.

Gerard, P., P. Lepercq, M. Leclerc, F. Gavini, P. Raibaud and C. Juste (2007). "Bacteroides sp. strain D8, the first cholesterol-reducing bacterium isolated from human feces." Appl Environ Microbiol 73(18): 5742-5749.

Gevers, D., F. M. Cohan, J. G. Lawrence, B. G. Spratt, T. Coenye, E. J. Feil, E. Stackebrandt, Y. Van de Peer, P. Vandamme, F. L. Thompson and J. Swings (2005). "Opinion: Re-evaluating prokaryotic species." Nat Rev Microbiol 3(9): 733-739.

Ghurye, J. S., V. Cepeda-Espinoza and M. Pop (2016). "Metagenomic Assembly: Overview, Challenges and Applications." Yale J Biol Med 89(3): 353-362.

Gillet-Hladky, S., C. M. de Carvalho, J. Bernaud, C. Bendahou, C. Bloy and D. Rigal (2006). "Rabbit antithymocyte globulin inhibits monocyte-derived dendritic cells maturation in vitro and polarizes monocyte-derived dendritic cells towards tolerogenic dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase." Transplantation 82(7): 965-974.

- Glotfelty, L. G., A. Zahs, K. Hodges, K. Shan, N. M. Alto and G. A. Hecht (2014). "Enteropathogenic E. coli effectors EspG1/G2 disrupt microtubules, contribute to tight junction perturbation and inhibit restoration." Cell Microbiol 16(12): 1767-1783.
- Grant, C. J., L. E. Harrison, C. L. Hoad, L. Marciani, P. A. Gowland and C. W. McIntyre (2016). "Patients with CKD have abnormal upper gastro-intestinal tract digestive function: a study of uremic enteropathy." J Gastroenterol Hepatol.
- Griva, K., A. Davenport and S. P. Newman (2013). "Health-related quality of life and long-term survival and graft failure in kidney transplantation: a 12-year follow-up study." Transplantation 95(5): 740-749.
- Grun, D., A. Lyubimova, L. Kester, K. Wiebrands, O. Basak, N. Sasaki, H. Clevers and A. van Oudenaarden (2015). "Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types." Nature 525(7568): 251-255.
- Guigoz, Y., J. Dore and E. J. Schiffrin (2008). "The inflammatory status of old age can be nurtured from the intestinal environment." Curr Opin Clin Nutr Metab Care 11(1): 13-20.
- Gustafsson, B. E. and L. S. Lanke (1960). "Bilirubin and urobilins in germfree, ex-germfree, and conventional rats." J Exp Med 112: 975-981.
- Hadaya, K., Y. Avila, L. Valloton, C. de Rham, C. Bandelier, S. Ferrari-Lacraz, M. Pascual, G. Pantaleo, P. Y. Martin, L. Buhler and J. Villard (2010). "Natural killer cell receptor--repertoire and functions after induction therapy by polyclonal rabbit anti-thymocyte globulin in unsensitized kidney transplant recipients." Clin Immunol 137(2): 250-260.
- Hagel, S., A. Fischer, P. Ehlermann, T. Frank, K. Tueffers, A. Sturm, A. Link, M. Demir, A. Siebenhaar, M. Storr, T. Glueck, E. Siegel, P. Solbach, F. Goeser, C. B. Koelbel, A. Lohse, C. Luebbert, U. Kandzi, M. Maier, S. Schuerle, M. M. Lerch, D. Tacke, O. A. Cornely, A. Stallmach and M. Vehreschild (2016). "Fecal Microbiota Transplant in Patients With Recurrent Clostridium Difficile Infection." Dtsch Arztebl Int 113(35-36): 583-589.
- Haidinger, M., R. Geyeregger, M. Poglitsch, T. Weichhart, M. Zeyda, B. Vodenik, T. M. Stulnig, G. A. Bohmig, W. H. Horl and M. D. Saemann (2007). "Antithymocyte globulin impairs T-cell/antigen-presenting cell interaction: disruption of immunological synapse and conjugate formation." Transplantation 84(1): 117-121.
- Hailman, E., J. J. Albers, G. Wolfbauer, A. Y. Tu and S. D. Wright (1996). "Neutralization and transfer of lipopolysaccharide by phospholipid transfer protein." J Biol Chem 271(21): 12172-12178.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, P. R. Mangan, H. Turner, T. L. Murphy, K. M. Murphy and C. T. Weaver (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." Nat Immunol 6(11): 1123-1132.

Haudebourg, T., N. Poirier and B. Vanhove (2009). "Depleting T-cell subpopulations in organ transplantation." Transpl Int 22(5): 509-518.

Heine, G. H., A. Ortiz, Z. A. Massy, B. Lindholm, A. Wiecek, A. Martinez-Castelao, A. Covic, D. Goldsmith, G. Suleymanlar, G. M. London, G. Parati, R. Sicari, C. Zoccali and D. Fliser (2012). "Monocyte subpopulations and cardiovascular risk in chronic kidney disease." Nat Rev Nephrol 8(6): 362-369.

Heumann, D. and T. Roger (2002). "Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria." Clin Chim Acta 323(1-2): 59-72.

Holzer, P. and A. Farzi (2014). "Neuropeptides and the microbiota-gut-brain axis." Adv Exp Med Biol 817: 195-219.

Honda, H., A. R. Qureshi, O. Heimbürger, P. Barany, K. Wang, R. Pecoits-Filho, P. Stenvinkel and B. Lindholm (2006). "Serum albumin, C-reactive protein, interleukin 6, and fetuin A as predictors of malnutrition, cardiovascular disease, and mortality in patients with ESRD." Am J Kidney Dis 47(1): 139-148.

Hooper, L. V., D. R. Littman and A. J. Macpherson (2012). "Interactions between the microbiota and the immune system." Science 336(6086): 1268-1273.

Hooper, L. V., M. H. Wong, A. Thelin, L. Hansson, P. G. Falk and J. I. Gordon (2001). "Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine." Science 291(5505): 881-884.

Hooper, L. V., J. Xu, P. G. Falk, T. Midtvedt and J. I. Gordon (1999). "A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem." Proc Natl Acad Sci U S A 96(17): 9833-9838.

Ivanov, I., K. Atarashi, N. Manel, E. L. Brodie, T. Shima, U. Karaoz, D. Wei, K. C. Goldfarb, C. A. Santee, S. V. Lynch, T. Tanoue, A. Imaoka, K. Itoh, K. Takeda, Y. Umesaki, K. Honda and D. R. Littman (2009). "Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria." Cell 139(3): 485-498.

Jack, R. S., X. Fan, M. Bernheiden, G. Rune, M. Ehlers, A. Weber, G. Kirsch, R. Mentel, B. Füll, M. Freudenberg, G. Schmitz, F. Stelter and C. Schütt (1997). "Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection." Nature 389(6652): 742-745.

Jandhyala, S. M., R. Talukdar, C. Subramanyam, H. Vuyyuru, M. Sasikala and D. Nageshwar Reddy (2015). "Role of the normal gut microbiota." World J Gastroenterol 21(29): 8787-8803.

Jernberg, C., S. Lofmark, C. Edlund and J. K. Jansson (2010). "Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota." Microbiology 156(Pt 11): 3216-3223.

Jesky, M. D., M. Dutton, I. Dasgupta, P. Yadav, K. P. Ng, A. Fenton, D. Kyte, C. J. Ferro, M. Calvert, P. Cockwell and S. J. Stringer (2016). "Health-Related Quality of Life Impacts Mortality but Not Progression to End-Stage Renal Disease in Pre-Dialysis Chronic Kidney Disease: A Prospective Observational Study." PLoS One 11(11): e0165675.

Jha, V., G. Garcia-Garcia, K. Iseki, Z. Li, S. Naicker, B. Plattner, R. Saran, A. Y. Wang and C. W. Yang (2013). "Chronic kidney disease: global dimension and perspectives." Lancet 382(9888): 260-272.

Jiang, W., N. Wu, X. Wang, Y. Chi, Y. Zhang, X. Qiu, Y. Hu, J. Li and Y. Liu (2015). "Dysbiosis gut microbiota associated with inflammation and impaired mucosal immune function in intestine of humans with non-alcoholic fatty liver disease." Sci Rep 5: 8096.

Jin, Y. and A. T. Blikslager (2016). "Myosin light chain kinase mediates intestinal barrier dysfunction via occludin endocytosis during anoxia/reoxygenation injury." Am J Physiol Cell Physiol: ajpcell 00113 02016.

Jin, Y., Y. Wu, Z. Zeng, C. Jin, S. Wu, Y. Wang and Z. Fu (2016). "From the Cover: Exposure to Oral Antibiotics Induces Gut Microbiota Dysbiosis Associated with Lipid Metabolism Dysfunction and Low-Grade Inflammation in Mice." Toxicol Sci 154(1): 140-152.

Kamada, N., G. Y. Chen, N. Inohara and G. Nunez (2013). "Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota." Nat Immunol 14(7): 685-690.

Kane, T. D., S. R. Johnson, J. W. Alexander and T. K. Craycraft (1997). "Bacterial translocation in organ donors: clinical observations and potential risk factors." Clin Transplant 11(4): 271-274.

Kell, D. B. and E. Pretorius (2015). "On the translocation of bacteria and their lipopolysaccharides between blood and peripheral locations in chronic, inflammatory diseases: the central roles of LPS and LPS-induced cell death." Integr Biol (Camb) 7(11): 1339-1377.

Kia, E., B. Wagner Mackenzie, D. Middleton, A. Lau, D. W. Waite, G. Lewis, Y. K. Chan, M. Silvestre, G. J. Cooper, S. D. Poppitt and M. W. Taylor (2016). "Integrity of the Human Faecal Microbiota following Long-Term Sample Storage." PLoS One 11(10): e0163666.

Kim, K. A., J. J. Jeong, S. Y. Yoo and D. H. Kim (2016). "Gut microbiota lipopolysaccharide accelerates inflamm-aging in mice." BMC Microbiol 16: 9.

Knoop, K. A., K. G. McDonald, D. H. Kulkarni and R. D. Newberry (2016). "Antibiotics promote inflammation through the translocation of native commensal colonic bacteria." Gut 65(7): 1100-1109.

Koh, I. H., R. Guatelli, E. F. Montero, R. Keller, M. H. Silva, S. Goldenberg and R. M. Silva (1996). "Where is the site of bacterial translocation--small or large bowel?" Transplant Proc 28(5): 2661.

Konig, J., J. Wells, P. D. Cani, C. L. Garcia-Rodenas, T. MacDonald, A. Mercenier, J. Whyte, F. Troost and R. J. Brummer (2016). "Human Intestinal Barrier Function in Health and Disease." Clin Transl Gastroenterol 7(10): e196.

Koopen, A. M., A. K. Groen and M. Nieuwdorp (2016). "Human microbiome as therapeutic intervention target to reduce cardiovascular disease risk." Curr Opin Lipidol.

Kozakova, H., M. Schwarzer, L. Tuckova, D. Srutkova, E. Czarnowska, I. Rosiak, T. Hudcovic, I. Schabussova, P. Hermanova, Z. Zakostelska, T. Aleksandrak-Piekarczyk, A. Koryszewska-Baginska, H. Tlaskalova-Hogenova and B. Cukrowska (2016). "Colonization of germ-free mice with a mixture of three lactobacillus strains enhances the integrity of gut mucosa and ameliorates allergic sensitization." Cell Mol Immunol 13(2): 251-262.

Kramer, A., V. S. Stel, J. M. Abad Diez, R. Alonso de la Torre, E. Bouzas Caamano, S. Cala, H. Cao Baduell, P. Castro de la Nuez, H. Cernevskis, F. Collart, C. Couchoud, J. de Meester, L. Djukanovic, M. Ferrer-Alamar, P. Finne, D. Fogarty, M. de Los Angeles Garcia Bazaga, L. Garneata, E. Golan, R. Gonzalez Fernandez, J. G. Heaf, A. Hoitsma, G. A. Ioannidis, M. Kolesnyk, R. Kramar, T. Leivestad, A. Limido, F. Lopot, F. Macario, A. Magaz, E. Martin-Escobar, W. Metcalfe, M. Noordzij, M. Ots-Rosenberg, R. Palsson, C. Pinera, M. Postorino, K. G. Prutz, M. Ratkovic, H. Resic, A. Rodriguez Hernandez, B. Rutkowski, K. Serdengecti, T. S. Yebenes, V. Spustova, O. Stojceva-Taneva, N. A. Tomilina, M. W. van de Luitgaarden, K. J. van Stralen, C. Wanner and K. J. Jager (2013). "Renal replacement therapy in Europe-a summary of the 2010 ERA-EDTA Registry Annual Report." Clin Kidney J 6(1): 105-115.

Krishnamurthy, V. M., G. Wei, B. C. Baird, M. Murtaugh, M. B. Chonchol, K. L. Raphael, T. Greene and S. Beddhu (2012). "High dietary fiber intake is associated with decreased inflammation and all-cause mortality in patients with chronic kidney disease." Kidney Int 81(3): 300-306.

Kubler, I., M. J. Koslowski, M. Gersemann, K. Fellermann, J. Beisner, S. Becker, K. Rothfuss, K. R. Herrlinger, E. F. Stange and J. Wehkamp (2009). "Influence of standard treatment on ileal and colonic antimicrobial defensin expression in active Crohn's disease." Aliment Pharmacol Ther 30(6): 621-633.

Kwan, B. C., K. M. Chow, C. B. Leung, M. C. Law, P. M. Cheng, V. Yu, P. K. Li and C. C. Szeto (2013). "Circulating bacterial-derived DNA fragments as a marker of systemic inflammation in peritoneal dialysis." Nephrol Dial Transplant 28(8): 2139-2145.

Kwong Chung, C. K., F. Ronchi and M. B. Geuking (2016). "Detrimental effect of systemic antimicrobial CD4+ T-cell reactivity on gut epithelial integrity." Immunology.

Lagrost, L., C. Girard, S. Grosjean, D. Masson, V. Deckert, T. Gautier, F. Debomy, S. Vinault, A. Jeannin, J. Labbe and C. Bonithon-Kopp (2014). "Low preoperative cholesterol level is a risk factor of sepsis and poor clinical outcome in patients undergoing cardiac surgery with cardiopulmonary bypass." Crit Care Med 42(5): 1065-1073.

Landelle, C., A. Lepape, N. Voirin, E. Tognet, F. Venet, J. Bohe, P. Vanhems and G. Monneret (2010). "Low monocyte human leukocyte antigen-DR is independently associated with nosocomial infections after septic shock." Intensive Care Med 36(11): 1859-1866.

Landman, C. and E. Quevrain (2016). "[Gut microbiota: Description, role and pathophysiologic implications]." Rev Med Interne 37(6): 418-423.

Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin and N. R. Pace (1985). "Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses." Proc Natl Acad Sci U S A 82(20): 6955-6959.

Lassenius, M. I., K. H. Pietilainen, K. Kaartinen, P. J. Pussinen, J. Syrjanen, C. Forsblom, I. Porsti, A. Rissanen, J. Kaprio, J. Mustonen, P. H. Groop and M. Lehto (2011). "Bacterial endotoxin activity in human serum is associated with dyslipidemia, insulin resistance, obesity, and chronic inflammation." Diabetes Care 34(8): 1809-1815.

Laterza, L., G. Rizzatti, E. Gaetani, P. Chiusolo and A. Gasbarrini (2016). "The Gut Microbiota and Immune System Relationship in Human Graft-versus-Host Disease." Mediterr J Hematol Infect Dis 8(1): e2016025.

Le Chatelier, E., T. Nielsen, J. Qin, E. Prifti, F. Hildebrand, G. Falony, M. Almeida, M. Arumugam, J. M. Batto, S. Kennedy, P. Leonard, J. Li, K. Burgdorf, N. Grarup, T. Jorgensen, I. Brandslund, H. B. Nielsen, A. S. Juncker, M. Bertalan, F. Levenez, N. Pons, S. Rasmussen, S. Sunagawa, J. Tap, S. Tims, E. G. Zoetendal, S. Brunak, K. Clement, J. Dore, M. Kleerebezem, K. Kristiansen, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, W. M. de Vos, J. D. Zucker, J. Raes, T. Hansen, P. Bork, J. Wang, S. D. Ehrlich and O. Pedersen (2013). "Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers." Nature 500(7464): 541-546.

Lebranchu, Y., C. Baan, L. Biancone, C. Legendre, J. M. Morales, M. Naesens, O. Thomusich and P. Friend (2014). "Pretransplant identification of acute rejection risk following kidney transplantation." Transpl Int 27(2): 129-138.

Lecuyer, E., S. Rakotobe, H. Lengline-Garnier, C. Lebreton, M. Picard, C. Juste, R. Fritzen, G. Eberl, K. D. McCoy, A. J. Macpherson, C. A. Reynaud, N. Cerf-Bensussan and V. Gaboriau-Routhiau (2014). "Segmented filamentous bacterium uses secondary and tertiary lymphoid tissues to induce gut IgA and specific T helper 17 cell responses." Immunity 40(4): 608-620.

Lee, J. R., T. Muthukumar, D. Dadhania, Y. Taur, R. R. Jenq, N. C. Toussaint, L. Ling, E. Pamer and M. Suthanthiran (2015). "Gut microbiota and tacrolimus dosing in kidney transplantation." PLoS One 10(3): e0122399.

Lee, J. R., T. Muthukumar, D. Dadhania, N. C. Toussaint, L. Ling, E. Pamer and M. Suthanthiran (2014). "Gut microbial community structure and complications after kidney transplantation: a pilot study." Transplantation 98(7): 697-705.

Leentjens, J., M. Kox, J. G. van der Hoeven, M. G. Netea and P. Pickkers (2013). "Immunotherapy for the adjunctive treatment of sepsis: from immunosuppression to

immunostimulation. Time for a paradigm change?" Am J Respir Crit Care Med 187(12): 1287-1293.

Lepage, P., P. Seksik, M. Sutren, M. F. de la Cochetiere, R. Jian, P. Marteau and J. Dore (2005). "Biodiversity of the mucosa-associated microbiota is stable along the distal digestive tract in healthy individuals and patients with IBD." Inflamm Bowel Dis 11(5): 473-480.

Ley, R. E., D. A. Peterson and J. I. Gordon (2006). "Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine." Cell 124(4): 837-848.

Ley, R. E., P. J. Turnbaugh, S. Klein and J. I. Gordon (2006). "Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity." Nature 444(7122): 1022-1023.

Li, P., H. Liu, Y. Zhang, R. Liao, K. He, X. Ruan and J. Gong (2016). "Endotoxin Tolerance Inhibits Degradation of Tumor Necrosis Factor Receptor-Associated Factor 3 by Suppressing Pellino 1 Expression and the K48 Ubiquitin Ligase Activity of Cellular Inhibitor of Apoptosis Protein 2." J Infect Dis 214(6): 906-915.

Lievin-Le Moal, V. and A. L. Servin (2006). "The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota." Clin Microbiol Rev 19(2): 315-337.

Lim, H. J., T. Y. Koo, J. Lee, K. H. Huh, J. B. Park, J. Cho, S. Lee, H. Ro, S. Han, B. Park, S. Park, W. Chung, S. K. Park, C. Kim, S. J. Kim, Y. S. Kim, C. Ahn and J. Yang (2016). "Health-Related Quality of Life of Kidney Transplantation Patients: Results from the KoreaN Cohort Study for Outcome in Patients With Kidney Transplantation (KNOW-KT) Study." Transplant Proc 48(3): 844-847.

Long, H., B. P. O'Connor, R. L. Zemans, X. Zhou, I. V. Yang and D. A. Schwartz (2014). "The Toll-like receptor 4 polymorphism Asp299Gly but not Thr399Ile influences TLR4 signaling and function." PLoS One 9(4): e93550.

Longuet, H., B. Sautenet, P. Gatault, G. Thibault, C. Barbet, J. F. Marliere, J. M. Halimi, Y. Lebranchu, C. Baron and M. Buchler (2014). "Risk factors for impaired CD4+ T-cell reconstitution following rabbit antithymocyte globulin treatment in kidney transplantation." Transpl Int 27(3): 271-279.

Lopez-Collazo, E. and C. del Fresno (2013). "Pathophysiology of endotoxin tolerance: mechanisms and clinical consequences." Crit Care 17(6): 242.

Lopez, M., M. R. Clarkson, M. Albin, M. H. Sayegh and N. Najafian (2006). "A novel mechanism of action for anti-thymocyte globulin: induction of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells." J Am Soc Nephrol 17(10): 2844-2853.

Lorio, M. A., R. Rosa, J. F. Suarez, P. Ruiz, G. Ciancio, G. W. Burke and J. F. Camargo (2016). "Influence of immune activation on the risk of allograft rejection in human immunodeficiency virus-infected kidney transplant recipients." Transpl Immunol 38: 40-43.

Louis, P., K. P. Scott, S. H. Duncan and H. J. Flint (2007). "Understanding the effects of diet on bacterial metabolism in the large intestine." J Appl Microbiol 102(5): 1197-1208.

Louis, S., M. Audrain, D. Cantarovich, B. Schaffrath, K. Hofmann, U. Janssen, C. Ballet, S. Brouard and J. P. Souillou (2007). "Long-term cell monitoring of kidney recipients after an antilymphocyte globulin induction with and without steroids." Transplantation 83(6): 712-721.

Lozano, R., M. Naghavi, K. Foreman, S. Lim, K. Shibuya, V. Aboyans, J. Abraham, T. Adair, R. Aggarwal, S. Y. Ahn, M. Alvarado, H. R. Anderson, L. M. Anderson, K. G. Andrews, C. Atkinson, L. M. Baddour, S. Barker-Collo, D. H. Bartels, M. L. Bell, E. J. Benjamin, D. Bennett, K. Bhalla, B. Bikbov, A. Bin Abdulhak, G. Birbeck, F. Blyth, I. Bolliger, S. Boufous, C. Bucello, M. Burch, P. Burney, J. Carapetis, H. Chen, D. Chou, S. S. Chugh, L. E. Coffeng, S. D. Colan, S. Colquhoun, K. E. Colson, J. Condon, M. D. Connor, L. T. Cooper, M. Corriere, M. Cortinovis, K. C. de Vacarro, W. Couser, B. C. Cowie, M. H. Criqui, M. Cross, K. C. Dabhadkar, N. Dahodwala, D. De Leo, L. Degenhardt, A. Delossantos, J. Denenberg, D. C. Des Jarlais, S. D. Dharmaratne, E. R. Dorsey, T. Driscoll, H. Duber, B. Ebel, P. J. Erwin, P. Espindola, M. Ezzati, V. Feigin, A. D. Flaxman, M. H. Forouzanfar, F. G. Fowkes, R. Franklin, M. Fransen, M. K. Freeman, S. E. Gabriel, E. Gakidou, F. Gaspari, R. F. Gillum, D. Gonzalez-Medina, Y. A. Halasa, D. Haring, J. E. Harrison, R. Havmoeller, R. J. Hay, B. Hoen, P. J. Hotez, D. Hoy, K. H. Jacobsen, S. L. James, R. Jasrasaria, S. Jayaraman, N. Johns, G. Karthikeyan, N. Kassebaum, A. Keren, J. P. Khoo, L. M. Knowlton, O. Kobusingye, A. Koranteng, R. Krishnamurthi, M. Lipnick, S. E. Lipshultz, S. L. Ohno, J. Mabweijano, M. F. MacIntyre, L. Mallinger, L. March, G. B. Marks, R. Marks, A. Matsumori, R. Matzopoulos, B. M. Mayosi, J. H. McAnulty, M. M. McDermott, J. McGrath, G. A. Mensah, T. R. Merriman, C. Michaud, M. Miller, T. R. Miller, C. Mock, A. O. Mocumbi, A. A. Mokdad, A. Moran, K. Mulholland, M. N. Nair, L. Naldi, K. M. Narayan, K. Nasser, P. Norman, M. O'Donnell, S. B. Omer, K. Ortblad, R. Osborne, D. Ozgediz, B. Pahari, J. D. Pandian, A. P. Rivero, R. P. Padilla, F. Perez-Ruiz, N. Perico, D. Phillips, K. Pierce, C. A. Pope, 3rd, E. Porrini, F. Pourmalek, M. Raju, D. Ranganathan, J. T. Rehm, D. B. Rein, G. Remuzzi, F. P. Rivara, T. Roberts, F. R. De Leon, L. C. Rosenfeld, L. Rushton, R. L. Sacco, J. A. Salomon, U. Sampson, E. Sanman, D. C. Schwebel, M. Segui-Gomez, D. S. Shepard, D. Singh, J. Singleton, K. Sliwa, E. Smith, A. Steer, J. A. Taylor, B. Thomas, I. M. Tleyjeh, J. A. Towbin, T. Truelsen, E. A. Undurraga, N. Venketasubramanian, L. Vijayakumar, T. Vos, G. R. Wagner, M. Wang, W. Wang, K. Watt, M. A. Weinstock, R. Weintraub, J. D. Wilkinson, A. D. Woolf, S. Wulf, P. H. Yeh, P. Yip, A. Zabetian, Z. J. Zheng, A. D. Lopez, C. J. Murray, M. A. AlMazroa and Z. A. Memish (2012). "Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010." Lancet 380(9859): 2095-2128.

Luque, Y., M. Jamme, M. Rabant, S. DeWolf, L. H. Noel, E. Thervet, L. Chatenoud, R. Snanoudj, D. Anglicheau, C. Legendre, S. Candon and J. Zuber (2016). "Long-term CD4 lymphopenia is associated with accelerated decline of kidney allograft function." Nephrol Dial Transplant 31(3): 487-495.

Mafra, D., A. F. Barros and D. Fouque (2013). "Dietary protein metabolism by gut microbiota and its consequences for chronic kidney disease patients." Future Microbiol 8(10): 1317-1323.

Magnuson, D. K., A. Weintraub, T. H. Pohlman and R. V. Maier (1989). "Human endothelial cell adhesiveness for neutrophils, induced by Escherichia coli lipopolysaccharide in vitro, is inhibited by Bacteroides fragilis lipopolysaccharide." J Immunol 143(9): 3025-3030.

Magnusson, M., K. E. Magnusson, T. Sundqvist and T. Denneberg (1991). "Impaired intestinal barrier function measured by differently sized polyethylene glycols in patients with chronic renal failure." Gut 32(7): 754-759.

Maheshwari, N., M. R. Ansari, M. S. Darshana, K. Lal and K. Ahmed (2010). "Pattern of lipid profile in patients on maintenance hemodialysis." Saudi J Kidney Dis Transpl 21(3): 565-570.

Malinowski, M., P. Martus, J. F. Lock, P. Neuhaus and M. Stockmann (2011). "Systemic influence of immunosuppressive drugs on small and large bowel transport and barrier function." Transpl Int 24(2): 184-193.

Malinowski, M., P. Martus, P. Neuhaus and M. Stockmann (2009). "The influence of commonly used immunosuppressive drugs on the small bowel functions - a comparative experimental study." Ann Transplant 14(2): 38-44.

Man, A. L., E. Bertelli, S. Rentini, M. Regoli, G. Briars, M. Marini, A. J. Watson and C. Nicoletti (2015). "Age-associated modifications of intestinal permeability and innate immunity in human small intestine." Clin Sci (Lond) 129(7): 515-527.

Matamoros, S., C. Gras-Leguen, F. Le Vacon, G. Potel and M. F. de La Cochetiere (2013). "Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health." Trends Microbiol 21(4): 167-173.

Matas, A. J., J. M. Smith, M. A. Skeans, B. Thompson, S. K. Gustafson, D. E. Stewart, W. S. Cherikh, J. L. Wainright, G. Boyle, J. J. Snyder, A. K. Israni and B. L. Kasiske (2015). "OPTN/SRTR 2013 Annual Data Report: kidney." Am J Transplant 15 Suppl 2: 1-34.

Mazmanian, S. K., C. H. Liu, A. O. Tzianabos and D. L. Kasper (2005). "An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system." Cell 122(1): 107-118.

McGuckin, M. A., S. K. Linden, P. Sutton and T. H. Florin (2011). "Mucin dynamics and enteric pathogens." Nat Rev Microbiol 9(4): 265-278.

McIntyre, C. W., L. E. Harrison, M. T. Eldehni, H. J. Jefferies, C. C. Szeto, S. G. John, M. K. Sigrist, J. O. Burton, D. Hothi, S. Korsheed, P. J. Owen, K. B. Lai and P. K. Li (2011). "Circulating endotoxemia: a novel factor in systemic inflammation and cardiovascular disease in chronic kidney disease." Clin J Am Soc Nephrol 6(1): 133-141.

Menkova-Garnier, I., H. Hocini, E. Foucat, P. Tisserand, L. Bourdery, C. Delaugerre, C. Benne, Y. Levy and J. D. Lelievre (2016). "P2X7 Receptor Inhibition Improves CD34 T-Cell Differentiation in HIV-Infected Immunological Nonresponders on c-ART." PLoS Pathog 12(4): e1005571.

Merchant, H. A., F. Liu, M. Orlu Gul and A. W. Basit (2016). "Age-mediated changes in the gastrointestinal tract." Int J Pharm 512(2): 382-395.

Michallet, M. C., X. Preville, M. Flacher, S. Fournel, L. Genestier and J. P. Revillard (2003). "Functional antibodies to leukocyte adhesion molecules in antithymocyte globulins." Transplantation 75(5): 657-662.

Modi, S. R., J. J. Collins and D. A. Relman (2014). "Antibiotics and the gut microbiota." J Clin Invest 124(10): 4212-4218.

Mohty, M. and B. Gaugler (2008). "Mechanisms of action of antithymocyte globulin: old dogs with new tricks!" Leuk Lymphoma 49(9): 1664-1667.

Molteni, M., S. Gemma and C. Rossetti (2016). "The Role of Toll-Like Receptor 4 in Infectious and Noninfectious Inflammation." Mediators Inflamm 2016: 6978936.

Montminy, S. W., N. Khan, S. McGrath, M. J. Walkowicz, F. Sharp, J. E. Conlon, K. Fukase, S. Kusumoto, C. Sweet, K. Miyake, S. Akira, R. J. Cotter, J. D. Goguen and E. Lien (2006). "Virulence factors of *Yersinia pestis* are overcome by a strong lipopolysaccharide response." Nat Immunol 7(10): 1066-1073.

Moore, W. E. and L. V. Holdeman (1974). "Special problems associated with the isolation and identification of intestinal bacteria in fecal flora studies." Am J Clin Nutr 27(12): 1450-1455.

Mourad, G., E. Morelon, C. Noel, D. Glotz and Y. Lebranchu (2012). "The role of Thymoglobulin induction in kidney transplantation: an update." Clin Transplant 26(5): E450-464.

Muller, T. F., S. O. Grebe, M. C. Neumann, J. Heymanns, K. Radsak, H. Sprenger and H. Lange (1997). "Persistent long-term changes in lymphocyte subsets induced by polyclonal antibodies." Transplantation 64(10): 1432-1437.

Munford, R. S. (2016). "Endotoxemia-menace, marker, or mistake?" J Leukoc Biol.

Musser, J. M. and R. Gonzalez (2011). "Efficacy of an anaerobic swab transport system to maintain aerobic and anaerobic microorganism viability after storage at -80 degrees C." J Vet Diagn Invest 23(1): 95-99.

Nallu, A., S. Sharma, A. Ramezani, J. Muralidharan and D. Raj (2016). "Gut microbiome in chronic kidney disease: challenges and opportunities." Transl Res.

Nava, G. M., H. J. Friedrichsen and T. S. Stappenbeck (2011). "Spatial organization of intestinal microbiota in the mouse ascending colon." ISME J 5(4): 627-638.

Ng, K. M., J. A. Ferreyra, S. K. Higginbottom, J. B. Lynch, P. C. Kashyap, S. Gopinath, N. Naidu, B. Choudhury, B. C. Weimer, D. M. Monack and J. L. Sonnenburg (2013). "Microbiota-liberated host sugars facilitate post-antibiotic expansion of enteric pathogens." Nature 502(7469): 96-99.

Nielsen, H. B., M. Almeida, A. S. Juncker, S. Rasmussen, J. Li, S. Sunagawa, D. R. Plichta, L. Gautier, A. G. Pedersen, E. Le Chatelier, E. Pelletier, I. Bonde, T. Nielsen, C. Manichanh, M. Arumugam, J. M. Batto, M. B. Quintanilha Dos Santos, N. Blom, N. Borrueal, K. S. Burgdorf, F. Boumezbeur, F. Casellas, J. Dore, P. Dworzynski, F. Guarner, T. Hansen, F. Hildebrand, R. S. Kaas, S. Kennedy, K. Kristiansen, J. R. Kultima, P. Leonard, F. Levenez, O. Lund, B. Moumen, D. Le Paslier, N. Pons, O. Pedersen, E. Prifti, J. Qin, J. Raes, S. Sorensen, J. Tap, S. Tims, D. W. Ussery, T. Yamada, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, P. Bork, J. Wang, S. Brunak and S. D. Ehrlich (2014). "Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes." Nat Biotechnol 32(8): 822-828.

Nijland, R., T. Hofland and J. A. van Strijp (2014). "Recognition of LPS by TLR4: potential for anti-inflammatory therapies." Mar Drugs 12(7): 4260-4273.

O'Mahony, C., P. Scully, D. O'Mahony, S. Murphy, F. O'Brien, A. Lyons, G. Sherlock, J. MacSharry, B. Kiely, F. Shanahan and L. O'Mahony (2008). "Commensal-induced regulatory T cells mediate protection against pathogen-stimulated NF-kappaB activation." PLoS Pathog 4(8): e1000112.

O'Toole, P. W. and I. B. Jeffery (2015). "Gut microbiota and aging." Science 350(6265): 1214-1215.

Ojo, A. O. (2006). "Cardiovascular complications after renal transplantation and their prevention." Transplantation 82(5): 603-611.

Ojo, A. O., J. A. Hanson, R. A. Wolfe, A. B. Leichtman, L. Y. Agodoa and F. K. Port (2000). "Long-term survival in renal transplant recipients with graft function." Kidney Int 57(1): 307-313.

Olsen, G. J. and C. R. Woese (1993). "Ribosomal RNA: a key to phylogeny." FASEB J 7(1): 113-123.

Overbeck, I., M. Bartels, O. Decker, J. Harms, J. Hauss and J. Fangmann (2005). "Changes in quality of life after renal transplantation." Transplant Proc 37(3): 1618-1621.

Pais de Barros, J. P., T. Gautier, W. Sali, C. Adrie, H. Choubeley, E. Charron, C. Lalande, N. Le Guern, V. Deckert, M. Monchi, J. P. Quenot and L. Lagrost (2015). "Quantitative lipopolysaccharide analysis using HPLC/MS/MS and its combination with the limulus amoebocyte lysate assay." J Lipid Res 56(7): 1363-1369.

Panda, S., I. El khader, F. Casellas, J. Lopez Vivancos, M. Garcia Cors, A. Santiago, S. Cuenca, F. Guarner and C. Manichanh (2014). "Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota." PLoS One 9(4): e95476.

Paramo, T., S. M. Tomasio, K. L. Irvine, C. E. Bryant and P. J. Bond (2015). "Energetics of Endotoxin Recognition in the Toll-Like Receptor 4 Innate Immune Response." Sci Rep 5: 17997.

Park, B. S. and J. O. Lee (2013). "Recognition of lipopolysaccharide pattern by TLR4 complexes." Exp Mol Med 45: e66.

Peterson, L. W. and D. Artis (2014). "Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis." Nat Rev Immunol 14(3): 141-153.

Petropoulou, P. I., J. F. Berbee, V. Theodoropoulos, A. Hatziri, P. Stamou, E. A. Karavia, A. Spyridonidis, I. Karagiannides and K. E. Kypreos (2015). "Lack of LCAT reduces the LPS-neutralizing capacity of HDL and enhances LPS-induced inflammation in mice." Biochim Biophys Acta 1852(10 Pt A): 2106-2115.

Petti, C. A. (2007). "Detection and identification of microorganisms by gene amplification and sequencing." Clin Infect Dis 44(8): 1108-1114.

Piton, G. and G. Capellier (2016). "Biomarkers of gut barrier failure in the ICU." Curr Opin Crit Care 22(2): 152-160.

Plantefève, G. and G. Bleichner (2001). "Translocation bactérienne : mythe ou réalité ?" Réanimation 10 550-561.

Poesen, R., A. Ramezani, K. Claes, P. Augustijns, D. Kuypers, I. R. Barrows, J. Muralidharan, P. Evenepoel, B. Meijers and D. S. Raj (2015). "Associations of Soluble CD14 and Endotoxin with Mortality, Cardiovascular Disease, and Progression of Kidney Disease among Patients with CKD." Clin J Am Soc Nephrol 10(9): 1525-1533.

Poltorak, A., X. He, I. Smirnova, M. Y. Liu, C. Van Huffel, X. Du, D. Birdwell, E. Alejos, M. Silva, C. Galanos, M. Freudenberg, P. Ricciardi-Castagnoli, B. Layton and B. Beutler (1998). "Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene." Science 282(5396): 2085-2088.

Prakash, J., B. Ghosh, S. Singh, A. Soni and S. S. Rathore (2012). "Causes of death in renal transplant recipients with functioning allograft." Indian J Nephrol 22(4): 264-268.

Preville, X., M. Flacher, B. LeMauff, S. Beauchard, P. Davelu, J. Tiollier and J. P. Revillard (2001). "Mechanisms involved in antithymocyte globulin immunosuppressive activity in a nonhuman primate model." Transplantation 71(3): 460-468.

Puttarajappa, C., M. Bhattarai, G. Mour, C. Shen, P. Sood, R. Mehta, N. Shah, A. D. Tevar, A. Humar, C. Wu and S. Hariharan (2016). "Cytomegalovirus infection in high-risk kidney transplant recipients receiving thymoglobulin induction-a single-center experience." Clin Transplant 30(9): 1159-1164.

Qin, J., R. Li, J. Raes, M. Arumugam, K. S. Burgdorf, C. Manichanh, T. Nielsen, N. Pons, F. Levenez, T. Yamada, D. R. Mende, J. Li, J. Xu, S. Li, D. Li, J. Cao, B. Wang, H. Liang, H. Zheng, Y. Xie, J. Tap, P. Lepage, M. Bertalan, J. M. Batto, T. Hansen, D. Le Paslier, A. Linneberg, H. B. Nielsen, E. Pelletier, P. Renault, T. Sicheritz-Ponten, K. Turner, H. Zhu, C. Yu, S. Li, M. Jian, Y. Zhou, Y. Li, X. Zhang, S. Li, N. Qin, H. Yang, J. Wang, S. Brunak, J. Dore, F. Guarner, K.

- Kristiansen, O. Pedersen, J. Parkhill, J. Weissenbach, P. Bork, S. D. Ehrlich and J. Wang (2010). "A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing." Nature 464(7285): 59-65.
- Qin, L., X. Wu, M. L. Block, Y. Liu, G. R. Breese, J. S. Hong, D. J. Knapp and F. T. Crews (2007). "Systemic LPS causes chronic neuroinflammation and progressive neurodegeneration." Glia 55(5): 453-462.
- Qiu, X., M. Zhang, X. Yang, N. Hong and C. Yu (2013). "Faecalibacterium prausnitzii upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating TNBS-induced colitis." J Crohns Colitis 7(11): e558-568.
- Qiu, Y., A. Pu, H. Zheng, M. Liu, W. Chen, W. Wang, W. Xiao and H. Yang (2016). "TLR2-Dependent Signaling for IL-15 Production Is Essential for the Homeostasis of Intestinal Intraepithelial Lymphocytes." Mediators Inflamm 2016: 4281865.
- Quesada, S. and P. Jay (2016). "[Single cell next generation sequencing and characterization of new cell types]." Med Sci (Paris) 32(5): 447-449.
- Raj, D. S., J. J. Carrero, V. O. Shah, A. R. Qureshi, P. Barany, O. Heimbürger, B. Lindholm, J. Ferguson, P. L. Moseley and P. Stenvinkel (2009). "Soluble CD14 levels, interleukin 6, and mortality among prevalent hemodialysis patients." Am J Kidney Dis 54(6): 1072-1080.
- Rao, S., M. Ghanta, M. J. Moritz and S. Constantinescu (2016). "Long-Term Functional Recovery, Quality of Life, and Pregnancy After Solid Organ Transplantation." Med Clin North Am 100(3): 613-629.
- Read, R. C., J. Pullin, S. Gregory, R. Borrow, E. B. Kaczmarski, F. S. di Giovine, S. K. Dower, C. Cannings and A. G. Wilson (2001). "A functional polymorphism of toll-like receptor 4 is not associated with likelihood or severity of meningococcal disease." J Infect Dis 184(5): 640-642.
- Read, S., V. Malmstrom and F. Powrie (2000). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation." J Exp Med 192(2): 295-302.
- Redan, J. A., B. F. Rush, Jr., T. W. Lysz, S. Smith and G. W. Machiedo (1990). "Organ distribution of gut-derived bacteria caused by bowel manipulation or ischemia." Am J Surg 159(1): 85-89; discussion 89-90.
- Rekers, N. V., I. M. Bajema, M. J. Mallat, B. Petersen, J. D. Anholts, G. M. Swings, P. P. van Miert, C. Kerkhoff, J. Roth, D. Popp, M. C. van Groningen, D. Baeten, N. Goemaere, M. D. Kraaij, M. Zandbergen, S. Heidt, C. van Kooten, J. W. de Fijter, F. H. Claas and M. Eikmans (2016). "Beneficial Immune Effects of Myeloid-Related Proteins in Kidney Transplant Rejection." Am J Transplant 16(5): 1441-1455.

Ren, Z. G., H. Liu, J. W. Jiang, L. Jiang, H. Chen, H. Y. Xie, L. Zhou and S. S. Zheng (2011). "Protective effect of probiotics on intestinal barrier function in malnourished rats after liver transplantation." Hepatobiliary Pancreat Dis Int 10(5): 489-496.

Richardson, A. J., N. McKain and R. J. Wallace (2013). "Ammonia production by human faecal bacteria, and the enumeration, isolation and characterization of bacteria capable of growth on peptides and amino acids." BMC Microbiol 13: 6.

Robinette, M. L., A. Fuchs, V. S. Cortez, J. S. Lee, Y. Wang, S. K. Durum, S. Gilfillan and M. Colonna (2015). "Transcriptional programs define molecular characteristics of innate lymphoid cell classes and subsets." Nat Immunol 16(3): 306-317.

Root-Bernstein, M. and R. Root-Bernstein (2015). "The ribosome as a missing link in the evolution of life." J Theor Biol 367: 130-158.

Round, J. L. and S. K. Mazmanian (2010). "Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota." Proc Natl Acad Sci U S A 107(27): 12204-12209.

Ruemmele, F. M., J. F. Beaulieu, S. Dionne, E. Levy, E. G. Seidman, N. Cerf-Bensussan and M. J. Lentze (2002). "Lipopolysaccharide modulation of normal enterocyte turnover by toll-like receptors is mediated by endogenously produced tumour necrosis factor alpha." Gut 51(6): 842-848.

Rundberg Nilsson, A., S. Soneji, S. Adolfsson, D. Bryder and C. J. Pronk (2016). "Human and Murine Hematopoietic Stem Cell Aging Is Associated with Functional Impairments and Intrinsic Megakaryocytic/Erythroid Bias." PLoS One 11(7): e0158369.

Ruzek, M. C., K. S. Neff, M. Luong, K. A. Smith, K. Culm-Merdek, S. M. Richards, J. M. Williams, M. Perricone and R. D. Garman (2009). "In vivo characterization of rabbit anti-mouse thymocyte globulin: a surrogate for rabbit anti-human thymocyte globulin." Transplantation 88(2): 170-179.

Saas, P., J. Bamoulid, B. Gaugler and D. Ducloux (2011). Immune Monitoring of Kidney Recipients: Biomarkers to Appreciate Immunosuppression -Associated Complications. Kidney Transplantation - New Perspectives. I. Dr.(Md) Magdalena Trzcinska.

Sabatino, A., G. Regolisti, I. Brusasco, A. Cabassi, S. Morabito and E. Fiaccadori (2015). "Alterations of intestinal barrier and microbiota in chronic kidney disease." Nephrol Dial Transplant 30(6): 924-933.

Saltzman, J. R., K. V. Kowdley, G. Perrone and R. M. Russell (1995). "Changes in small-intestine permeability with aging." J Am Geriatr Soc 43(2): 160-164.

Sampaio-Maia, B., L. Simoes-Silva, M. Pestana, R. Araujo and I. J. Soares-Silva (2016). "The Role of the Gut Microbiome on Chronic Kidney Disease." Adv Appl Microbiol 96: 65-94.

Santos, F., A. Wegkamp, W. M. de Vos, E. J. Smid and J. Hugenholtz (2008). "High-Level folate production in fermented foods by the B12 producer *Lactobacillus reuteri* JCM1112." Appl Environ Microbiol 74(10): 3291-3294.

Sarnak, M. J., A. S. Levey, A. C. Schoolwerth, J. Coresh, B. Culleton, L. L. Hamm, P. A. McCullough, B. L. Kasiske, E. Kelepouris, M. J. Klag, P. Parfrey, M. Pfeffer, L. Raij, D. J. Spinosa and P. W. Wilson (2003). "Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention." Hypertension 42(5): 1050-1065.

Sauce, D., M. Larsen, S. Fastenackels, M. Pauchard, H. Ait-Mohand, L. Schneider, A. Guihot, F. Boufassa, J. Zaunders, M. Iguertsira, M. Bailey, G. Gorochov, C. Duvivier, G. Carcelain, A. D. Kelleher, A. Simon, L. Meyer, D. Costagliola, S. G. Deeks, O. Lambotte, B. Autran, P. W. Hunt, C. Katlama and V. Appay (2011). "HIV disease progression despite suppression of viral replication is associated with exhaustion of lymphopoiesis." Blood 117(19): 5142-5151.

Sawas, T., S. Al Halabi, R. Hernaez, W. D. Carey and W. K. Cho (2015). "Patients Receiving Prebiotics and Probiotics Before Liver Transplantation Develop Fewer Infections Than Controls: A Systematic Review and Meta-Analysis." Clin Gastroenterol Hepatol 13(9): 1567-1574 e1563; quiz e1143-1564.

Sayegh, M. H. and C. B. Carpenter (2004). "Transplantation 50 years later--progress, challenges, and promises." N Engl J Med 351(26): 2761-2766.

Sekirov, I., S. L. Russell, L. C. Antunes and B. B. Finlay (2010). "Gut microbiota in health and disease." Physiol Rev 90(3): 859-904.

Sender, R., S. Fuchs and R. Milo (2016). "Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans." Cell 164(3): 337-340.

Sewgobind, V. D., M. M. Kho, L. J. van der Laan, T. K. Hendriks, T. van Dam, H. W. Tilanus, I. J. JN, W. Weimar and C. C. Baan (2009). "The effect of rabbit anti-thymocyte globulin induction therapy on regulatory T cells in kidney transplant patients." Nephrol Dial Transplant 24(5): 1635-1644.

Seyda, M., M. Quante, H. Uehara, B. R. Slegtenhorst, A. Elkhail and S. G. Tullius (2015). "Immunosenescence in renal transplantation: a changing balance of innate and adaptive immunity." Curr Opin Organ Transplant 20(4): 417-423.

Shi, K., F. Wang, H. Jiang, H. Liu, M. Wei, Z. Wang and L. Xie (2014). "Gut bacterial translocation may aggravate microinflammation in hemodialysis patients." Dig Dis Sci 59(9): 2109-2117.

Shima, T., K. Fukushima, H. Setoyama, A. Imaoka, S. Matsumoto, T. Hara, K. Suda and Y. Umesaki (2008). "Differential effects of two probiotic strains with different bacteriological

properties on intestinal gene expression, with special reference to indigenous bacteria." FEMS Immunol Med Microbiol 52(1): 69-77.

Shizuru, J. A., R. S. Negrin and I. L. Weissman (2005). "Hematopoietic stem and progenitor cells: clinical and preclinical regeneration of the hematolymphoid system." Annu Rev Med 56: 509-538.

Shukla, P. K., R. Gangwar, B. Manda, A. S. Meena, N. Yadav, E. Szabo, A. Balogh, S. C. Lee, G. Tigyi and R. Rao (2016). "Rapid disruption of intestinal epithelial tight junction and barrier dysfunction by ionizing radiation in mouse colon in vivo: protection by N-acetyl-L-cysteine." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 310(9): G705-715.

Simmons, E. M., A. Langone, M. T. Sezer, J. P. Vella, P. Recupero, J. D. Morrow, T. A. Ikizler and J. Himmelfarb (2005). "Effect of renal transplantation on biomarkers of inflammation and oxidative stress in end-stage renal disease patients." Transplantation 79(8): 914-919.

Smith-Palmer, J., A. Kalsekar and W. Valentine (2014). "Influence of renal function on long-term graft survival and patient survival in renal transplant recipients." Curr Med Res Opin 30(2): 235-242.

So-Armah, K. A., J. P. Tate, C. C. Chang, A. A. Butt, M. Gerschenson, C. L. Gibert, D. Leaf, D. Rimland, M. C. Rodriguez-Barradas, M. J. Budoff, J. H. Samet, L. H. Kuller, S. G. Deeks, K. Crothers, R. P. Tracy, H. M. Crane, M. M. Sajadi, H. A. Tindle, A. C. Justice and M. S. Freiberg (2016). "Do Biomarkers of Inflammation, Monocyte Activation, and Altered Coagulation Explain Excess Mortality Between HIV Infected and Uninfected People?" J Acquir Immune Defic Syndr 72(2): 206-213.

Solana, R., R. Tarazona, A. E. Aiello, A. N. Akbar, V. Appay, M. Beswick, J. A. Bosch, C. Campos, S. Cantisani, L. Cicin-Sain, E. Derhovanessian, S. Ferrando-Martinez, D. Frasca, T. Fulop, S. Govind, B. Grubeck-Loebenstein, A. Hill, M. Hurme, F. Kern, A. Larbi, M. Lopez-Botet, A. B. Maier, J. E. McElhaney, P. Moss, E. Naumova, J. Nikolich-Zugich, A. Pera, J. L. Rector, N. Riddell, B. Sanchez-Correa, P. Sansoni, D. Sauce, R. van Lier, G. C. Wang, M. R. Wills, M. Zielinski and G. Pawelec (2012). "CMV and Immunosenescence: from basics to clinics." Immun Ageing 9(1): 23.

Spor, A., O. Koren and R. Ley (2011). "Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome." Nat Rev Microbiol 9(4): 279-290.

Stappenbeck, T. S., L. V. Hooper and J. I. Gordon (2002). "Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells." Proc Natl Acad Sci U S A 99(24): 15451-15455.

Stark, P. L. and A. Lee (1982). "The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life." J Med Microbiol 15(2): 189-203.

Steele, A. K., E. J. Lee, B. Vestal, D. Hecht, Z. Dong, E. Rapaport, J. Koeppe, T. B. Campbell and C. C. Wilson (2014). "Contribution of intestinal barrier damage, microbial translocation and HIV-1 infection status to an inflammaging signature." *PLoS One* 9(5): e97171.

Steffen, E. K., R. D. Berg and E. A. Deitch (1988). "Comparison of translocation rates of various indigenous bacteria from the gastrointestinal tract to the mesenteric lymph node." *J Infect Dis* 157(5): 1032-1038.

Stevens, P. E. and A. Levin (2013). "Evaluation and management of chronic kidney disease: synopsis of the kidney disease: improving global outcomes 2012 clinical practice guideline." *Ann Intern Med* 158(11): 825-830.

Sun, D. P., C. Y. Ding, L. Wang, J. H. Liang, L. Fan, Y. J. Wu, T. Tian, T. N. Li, W. Xu and J. Y. Li (2015). "Thymic hyperplasia following chemotherapy in adults with lymphoma: (18)F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography/computed tomography findings and correlation with T cell repopulation." *Leuk Lymphoma* 56(8): 2344-2349.

Sun, L., R. Brown, S. Chen, Q. Zhuge and D. M. Su (2012). "Aging induced decline in T-lymphopoiesis is primarily dependent on status of progenitor niches in the bone marrow and thymus." *Aging (Albany NY)* 4(9): 606-619.

Sun, X. Q., X. B. Fu, R. Zhang, Y. Lu, Q. Deng, X. G. Jiang and Z. Y. Sheng (2001). "Relationship between plasma D(-)-lactate and intestinal damage after severe injuries in rats." *World J Gastroenterol* 7(4): 555-558.

Suri-Payer, E., A. Z. Amar, A. M. Thornton and E. M. Shevach (1998). "CD4+CD25+ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells." *J Immunol* 160(3): 1212-1218.

Szalo, I. M., B. Taminiau and J. Mainil (2006). "Le lipopolysaccharide d'Escherichia coli : structure, biosynthèse et rôles." *Ann. Méd. Vét.* 150: 108-124.

Szeto, C. C., B. C. Kwan, K. M. Chow, J. S. Kwok, K. B. Lai, P. M. Cheng, W. F. Pang, J. K. Ng, M. H. Chan, L. C. Lit, C. B. Leung and P. K. Li (2015). "Circulating bacterial-derived DNA fragment level is a strong predictor of cardiovascular disease in peritoneal dialysis patients." *PLoS One* 10(5): e0125162.

Tanaka, H., T. L. Sirich and T. W. Meyer (2015). "Uremic Solutes Produced by Colon Microbes." *Blood Purif* 40(4): 306-311.

Taur, Y., R. R. Jenq, M. A. Perales, E. R. Littmann, S. Morjaria, L. Ling, D. No, A. Gobourne, A. Viale, P. B. Dahi, D. M. Ponce, J. N. Barker, S. Giralt, M. van den Brink and E. G. Pamer (2014). "The effects of intestinal tract bacterial diversity on mortality following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." *Blood* 124(7): 1174-1182.

Terawaki, H., K. Yokoyama, Y. Yamada, Y. Maruyama, R. Iida, K. Hanaoka, H. Yamamoto, T. Obata and T. Hosoya (2010). "Low-grade endotoxemia contributes to chronic inflammation

in hemodialysis patients: examination with a novel lipopolysaccharide detection method." Ther Apher Dial 14(5): 477-482.

Testro, A. G., K. Visvanathan, N. Skinner, V. Markovska, P. Crowley, P. W. Angus and P. J. Gow (2011). "Acute allograft rejection in human liver transplant recipients is associated with signaling through toll-like receptor 4." J Gastroenterol Hepatol 26(1): 155-163.

Thomas, T., J. Gilbert and F. Meyer (2012). "Metagenomics - a guide from sampling to data analysis." Microb Inform Exp 2(1): 3.

Tincati, C., G. M. Bellistri, G. Ancona, E. Merlini, A. d'Arminio Monforte and G. Marchetti (2012). "Role of in vitro stimulation with lipopolysaccharide on T-cell activation in HIV-infected antiretroviral-treated patients." Clin Dev Immunol 2012: 935425.

Tincati, C., D. C. Douek and G. Marchetti (2016). "Gut barrier structure, mucosal immunity and intestinal microbiota in the pathogenesis and treatment of HIV infection." AIDS Res Ther 13: 19.

Tomasz, W. and S. Piotr (2003). "A trial of objective comparison of quality of life between chronic renal failure patients treated with hemodialysis and renal transplantation." Ann Transplant 8(2): 47-53.

Touret, J., B. P. Willing, S. Dion, J. MacPherson, E. Denamur and B. B. Finlay (2016). "Immunosuppressive treatment alters secretion of ileal antimicrobial peptides and gut microbiota, and favors subsequent colonization by uropathogenic *Escherichia coli*." Transplantation.

Trzonkowski, P., J. Mysliwska, E. Szmit, J. Wieckiewicz, K. Lukaszuk, L. B. Brydak, M. Machala and A. Mysliwski (2003). "Association between cytomegalovirus infection, enhanced proinflammatory response and low level of anti-hemagglutinins during the anti-influenza vaccination--an impact of immunosenescence." Vaccine 21(25-26): 3826-3836.

Tsuji, M., K. Suzuki, H. Kitamura, M. Maruya, K. Kinoshita, Ivanov, II, K. Itoh, D. R. Littman and S. Fagarasan (2008). "Requirement for lymphoid tissue-inducer cells in isolated follicle formation and T cell-independent immunoglobulin A generation in the gut." Immunity 29(2): 261-271.

Turkmen, K., H. Z. Tonbul, A. Toker, A. Gaipov, F. M. Erdur, H. Cicekler, M. Anil, O. Ozbek, N. Y. Selcuk, M. Yeksan and S. Turk (2012). "The relationship between oxidative stress, inflammation, and atherosclerosis in renal transplant and end-stage renal disease patients." Ren Fail 34(10): 1229-1237.

Turnbaugh, P. J., R. E. Ley, M. Hamady, C. M. Fraser-Liggett, R. Knight and J. I. Gordon (2007). "The human microbiome project." Nature 449(7164): 804-810.

Turner, J. R. (2009). "Intestinal mucosal barrier function in health and disease." Nat Rev Immunol 9(11): 799-809.

Turpin, W., O. Espin-Garcia, W. Xu, M. S. Silverberg, D. Kevans, M. I. Smith, D. S. Guttman, A. Griffiths, R. Panaccione, A. Otley, L. Xu, K. Shestopaloff, G. Moreno-Hagelsieb, A. D. Paterson and K. Croitoru (2016). "Association of host genome with intestinal microbial composition in a large healthy cohort." Nat Genet.

Valentini, L., S. Ramminger, V. Haas, E. Postrach, M. Werich, A. Fischer, M. Koller, A. Swidsinski, S. Bereswill, H. Lochs and J. D. Schulzke (2014). "Small intestinal permeability in older adults." Physiol Rep 2(4): e00281.

van Wijck, K., K. Lenaerts, L. J. van Loon, W. H. Peters, W. A. Buurman and C. H. Dejong (2011). "Exercise-induced splanchnic hypoperfusion results in gut dysfunction in healthy men." PLoS One 6(7): e22366.

Vanhoutte, T., G. Huys, E. Brandt and J. Swings (2004). "Temporal stability analysis of the microbiota in human feces by denaturing gradient gel electrophoresis using universal and group-specific 16S rRNA gene primers." FEMS Microbiol Ecol 48(3): 437-446.

Vatanen, T., A. D. Kostic, E. d'Hennezel, H. Siljander, E. A. Franzosa, M. Yassour, R. Kolde, H. Vlamakis, T. D. Arthur, A. M. Hamalainen, A. Peet, V. Tillmann, R. Uibo, S. Mokurov, N. Dorshakova, J. Ilonen, S. M. Virtanen, S. J. Szabo, J. A. Porter, H. Lahdesmaki, C. Huttenhower, D. Gevers, T. W. Cullen, M. Knip and R. J. Xavier (2016). "Variation in Microbiome LPS Immunogenicity Contributes to Autoimmunity in Humans." Cell 165(4): 842-853.

Vaziri, N. D. (2012). "CKD impairs barrier function and alters microbial flora of the intestine: a major link to inflammation and uremic toxicity." Curr Opin Nephrol Hypertens 21(6): 587-592.

Vaziri, N. D. (2014). "Gut microbial translocation in the pathogenesis of systemic inflammation in patients with end-stage renal disease." Dig Dis Sci 59(9): 2020-2022.

Vaziri, N. D., J. Wong, M. Pahl, Y. M. Piceno, J. Yuan, T. Z. DeSantis, Z. Ni, T. H. Nguyen and G. L. Andersen (2013). "Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora." Kidney Int 83(2): 308-315.

Vaziri, N. D., J. Yuan and K. Norris (2013). "Role of urea in intestinal barrier dysfunction and disruption of epithelial tight junction in chronic kidney disease." Am J Nephrol 37(1): 1-6.

Vaziri, N. D., J. Yuan, A. Rahimi, Z. Ni, H. Said and V. S. Subramanian (2012). "Disintegration of colonic epithelial tight junction in uremia: a likely cause of CKD-associated inflammation." Nephrol Dial Transplant 27(7): 2686-2693.

Vaziri, N. D., Y. Y. Zhao and M. V. Pahl (2016). "Altered intestinal microbial flora and impaired epithelial barrier structure and function in CKD: the nature, mechanisms, consequences and potential treatment." Nephrol Dial Transplant 31(5): 737-746.

Venancio, T. M., R. M. Machado, A. Castoldi, M. T. Amano, V. S. Nunes, E. C. Quintao, N. O. Camara, F. G. Soriano and P. M. Cazita (2016). "CETP Lowers TLR4 Expression Which Attenuates the Inflammatory Response Induced by LPS and Polymicrobial Sepsis." Mediators Inflamm 2016: 1784014.

Vernooy, J. H., M. A. Dentener, R. J. van Suylen, W. A. Buurman and E. F. Wouters (2002). "Long-term intratracheal lipopolysaccharide exposure in mice results in chronic lung inflammation and persistent pathology." Am J Respir Cell Mol Biol 26(1): 152-159.

Vesterbacka, J., B. Barqasho, A. Haggblom and P. Nowak (2015). "Effects of Co-Trimoxazole on Microbial Translocation in HIV-1-Infected Patients Initiating Antiretroviral Therapy." AIDS Res Hum Retroviruses 31(8): 830-836.

Viaud, S., F. Saccheri, G. Mignot, T. Yamazaki, R. Daillere, D. Hannani, D. P. Enot, C. Pfirschke, C. Engblom, M. J. Pittet, A. Schlitzer, F. Ginhoux, L. Apetoh, E. Chachaty, P. L. Woerther, G. Eberl, M. Berard, C. Ecobichon, D. Clermont, C. Bizet, V. Gaboriau-Routhiau, N. Cerf-Bensussan, P. Opolon, N. Yessaad, E. Vivier, B. Ryffel, C. O. Elson, J. Dore, G. Kroemer, P. Lepage, I. G. Boneca, F. Ghiringhelli and L. Zitvogel (2013). "The intestinal microbiota modulates the anticancer immune effects of cyclophosphamide." Science 342(6161): 971-976.

Vindigni, S. M. and C. M. Surawicz (2015). "The gut microbiome: a clinically significant player in transplantation?" Expert Rev Clin Immunol 11(7): 781-783.

Vlckova, K., J. Mrazek, J. Kopecny and K. J. Petrzelkova (2012). "Evaluation of different storage methods to characterize the fecal bacterial communities of captive western lowland gorillas (*Gorilla gorilla gorilla*)." J Microbiol Methods 91(1): 45-51.

Vrochides, D., M. Hassanain, P. Metrakos, J. Tchervenkov, J. Barkun, P. Chaudhury, M. Cantarovich and S. Paraskevas (2012). "Prolonged lymphopenia following anti-thymocyte globulin induction is associated with decreased long-term graft survival in liver transplant recipients." Hippokratia 16(1): 66-70.

Wallace, B. D., H. Wang, K. T. Lane, J. E. Scott, J. Orans, J. S. Koo, M. Venkatesh, C. Jobin, L. A. Yeh, S. Mani and M. R. Redinbo (2010). "Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme." Science 330(6005): 831-835.

Wang, F., H. Jiang, K. Shi, Y. Ren, P. Zhang and S. Cheng (2012). "Gut bacterial translocation is associated with microinflammation in end-stage renal disease patients." Nephrology (Carlton) 17(8): 733-738.

Wang, M., S. Ahrne, B. Jeppsson and G. Molin (2005). "Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes." FEMS Microbiol Ecol 54(2): 219-231.

Wang, X. and P. J. Quinn (2010). "Lipopolysaccharide: Biosynthetic pathway and structure modification." Prog Lipid Res 49(2): 97-107.

Wiest, R. and G. Garcia-Tsao (2005). "Bacterial translocation (BT) in cirrhosis." Hepatology 41(3): 422-433.

Wikby, A., B. Johansson, J. Olsson, S. Lofgren, B. O. Nilsson and F. Ferguson (2002). "Expansions of peripheral blood CD8 T-lymphocyte subpopulations and an association with cytomegalovirus seropositivity in the elderly: the Swedish NONA immune study." Exp Gerontol 37(2-3): 445-453.

Wikby, A., P. Maxson, J. Olsson, B. Johansson and F. G. Ferguson (1998). "Changes in CD8 and CD4 lymphocyte subsets, T cell proliferation responses and non-survival in the very old: the Swedish longitudinal OCTO-immune study." Mech Ageing Dev 102(2-3): 187-198.

Willing, B. P., J. Dicksved, J. Halfvarson, A. F. Andersson, M. Lucio, Z. Zheng, G. Jarnerot, C. Tysk, J. K. Jansson and L. Engstrand (2010). "A pyrosequencing study in twins shows that gastrointestinal microbial profiles vary with inflammatory bowel disease phenotypes." Gastroenterology 139(6): 1844-1854 e1841.

Wittkop, L., J. Bitard, E. Lazaro, D. Neau, F. Bonnet, P. Mercie, M. Dupon, M. Hessamfar, M. Ventura, D. Malvy, F. Dabis, J. L. Pellegrin, J. F. Moreau, R. Thiebaut and I. Pellegrin (2013). "Effect of cytomegalovirus-induced immune response, self antigen-induced immune response, and microbial translocation on chronic immune activation in successfully treated HIV type 1-infected patients: the ANRS CO3 Aquitaine Cohort." J Infect Dis 207(4): 622-627.

Woese, C. R. (1987). "Bacterial evolution." Microbiol Rev 51(2): 221-271.

Wong, J., N. Davies, H. Jeraj, E. Vilar, A. Viljoen and K. Farrington (2016). "A comparative study of blood endotoxin detection in haemodialysis patients." J Inflamm (Lond) 13: 24.

Wong, J., H. Jeraj, E. Vilar, A. Viljoen and K. Farrington (2015). "Endotoxin detection in end-stage kidney disease." J Clin Pathol 68(1): 73-78.

Wong, J., Y. M. Piceno, T. Z. Desantis, M. Pahl, G. L. Andersen and N. D. Vaziri (2014). "Expansion of urease- and uricase-containing, indole- and p-cresol-forming and contraction of short-chain fatty acid-producing intestinal microbiota in ESRD." Am J Nephrol 39(3): 230-237.

Wong, J., E. Vilar and K. Farrington (2015). "Endotoxemia in end-stage kidney disease." Semin Dial 28(1): 59-67.

Wrzosek, L., S. Miquel, M. L. Noordine, S. Bouet, M. Joncquel Chevalier-Curt, V. Robert, C. Philippe, C. Bridonneau, C. Cherbuy, C. Robbe-Masselot, P. Langella and M. Thomas (2013). "Bacteroides thetaiotaomicron and Faecalibacterium prausnitzii influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent." BMC Biol 11: 61.

Wurfel, M. M., S. T. Kunitake, H. Lichenstein, J. P. Kane and S. D. Wright (1994). "Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein is carried on lipoproteins and acts as a cofactor in the neutralization of LPS." J Exp Med 180(3): 1025-1035.

Wurfel, M. M. and S. D. Wright (1997). "Lipopolysaccharide-binding protein and soluble CD14 transfer lipopolysaccharide to phospholipid bilayers: preferential interaction with particular classes of lipid." J Immunol 158(8): 3925-3934.

Yanagibashi, T., A. Hosono, A. Oyama, M. Tsuda, A. Suzuki, S. Hachimura, Y. Takahashi, Y. Momose, K. Itoh, K. Hirayama, K. Takahashi and S. Kaminogawa (2013). "IgA production in the large intestine is modulated by a different mechanism than in the small intestine: *Bacteroides acidifaciens* promotes IgA production in the large intestine by inducing germinal center formation and increasing the number of IgA<sup>+</sup> B cells." Immunobiology 218(4): 645-651.

Yang, B., Y. Wang and P. Y. Qian (2016). "Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis." BMC Bioinformatics 17: 135.

Yang, Y., M. Al-Mozaini, M. J. Buzon, J. Beamon, S. Ferrando-Martinez, E. Ruiz-Mateos, E. S. Rosenberg, F. Pereyra, X. G. Yu and M. Lichterfeld (2012). "CD4 T-cell regeneration in HIV-1 elite controllers." AIDS 26(6): 701-706.

Yatsunenkov, T., F. E. Rey, M. J. Manary, I. Trehan, M. G. Dominguez-Bello, M. Contreras, M. Magris, G. Hidalgo, R. N. Baldassano, A. P. Anokhin, A. C. Heath, B. Warner, J. Reeder, J. Kuczynski, J. G. Caporaso, C. A. Lozupone, C. Lauber, J. C. Clemente, D. Knights, R. Knight and J. I. Gordon (2012). "Human gut microbiome viewed across age and geography." Nature 486(7402): 222-227.

Young, K., S. Borikar, R. Bell, L. Kuffler, V. Philip and J. J. Trowbridge (2016). "Progressive alterations in multipotent hematopoietic progenitors underlie lymphoid cell loss in aging." J Exp Med 213(11): 2259-2267.

Yu, B. and S. D. Wright (1996). "Catalytic properties of lipopolysaccharide (LPS) binding protein. Transfer of LPS to soluble CD14." J Biol Chem 271(8): 4100-4105.

Yu, C., S. Tan, C. Zhou, C. Zhu, X. Kang, S. Liu, S. Zhao, S. Fan, Z. Yu, A. Peng and Z. Wang (2016). "Berberine Reduces Uremia-Associated Intestinal Mucosal Barrier Damage." Biol Pharm Bull 39(11): 1787-1792.

Zand, M. S., T. Vo, J. Huggins, R. Felgar, J. Liesveld, T. Pellegrin, A. Bozorgzadeh, I. Sanz and B. J. Briggs (2005). "Polyclonal rabbit antithymocyte globulin triggers B-cell and plasma cell apoptosis by multiple pathways." Transplantation 79(11): 1507-1515.

Zanetti, M., R. Gennaro and D. Romeo (1995). "Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain." FEBS Lett 374(1): 1-5.

Zhang, M., Q. Zhou, R. G. Dorfman, X. Huang, T. Fan, H. Zhang, J. Zhang and C. Yu (2016). "Butyrate inhibits interleukin-17 and generates Tregs to ameliorate colorectal colitis in rats." BMC Gastroenterol 16(1): 84.

Zlotoff, D. A., B. A. Schwarz and A. Bhandoola (2008). "The long road to the thymus: the generation, mobilization, and circulation of T-cell progenitors in mouse and man." Semin Immunopathol 30(4): 371-382.

Zoetendal, E. G., A. von Wright, T. Vilpponen-Salmela, K. Ben-Amor, A. D. Akkermans and W. M. de Vos (2002). "Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces." Appl Environ Microbiol 68(7): 3401-3407.

Zuo, L., Y. Li, H. Wang, R. Wu, W. Zhu, W. Zhang, L. Cao, L. Gu, J. Gong, N. Li and J. Li (2014). "Cigarette smoking is associated with intestinal barrier dysfunction in the small intestine but not in the large intestine of mice." J Crohns Colitis 8(12): 1710-1722.



## RÉSUMÉ

---

**Résumé :** Notre équipe a précédemment rapporté que l'utilisation d'un traitement d'induction lympho-déplétant [les globulines anti-lymphocytaires polyclonales (GALP)], peut entraîner une lymphopénie T CD4 persistante chez certains transplantés rénaux. Celle-ci est associée à certaines anomalies biologiques telles que la présence d'un syndrome inflammatoire chronique. Ce travail de thèse s'intéresse aux facteurs impliqués dans l'induction de ces anomalies puisqu'elles sont associées à une augmentation de l'incidence d'infections, de maladies cardiovasculaires et de décès, habituellement retrouvés chez les personnes âgées.

Nous avons montré que les GALP entraînent une diminution de la fonction thymique et une expansion de lymphocytes T à un stade avancé de différenciation pouvant traduire une immunosénescence prématurée. Par ailleurs, une rupture de la barrière intestinale semble favoriser la translocation bactérienne digestive et l'activation d'une inflammation chronique observée en transplantation, *via* les lipopolysaccharides libérés dans la circulation périphérique. La composition du microbiote intestinal pourrait jouer un rôle dans l'initiation, le maintien et la sévérité de l'inflammation. Nous avons observé des modifications du microbiote après transplantation et après l'antibioprophylaxie utilisée en transplantation.

Les mécanismes à l'origine de toutes ces observations restent à élucider mais ce travail permet d'améliorer la compréhension des facteurs impliqués dans le développement de l'immunosénescence et de l'inflammation chronique en transplantation rénale, ouvrant potentiellement la voie à d'intéressantes perspectives thérapeutiques.

**Mots-clés :** Transplantation rénale, Immunosénescence, Inflammation chronique, Translocation bactérienne digestive, Lipopolysaccharides, Microbiote intestinal

**Abstract:** We have previously described that polyclonal anti-lymphocytic globulins (GALP) may contribute to prolonged CD4 T-cell lymphopenia in some renal transplant recipients, associated with some biological abnormalities, such as a chronic inflammatory syndrome. Our work focuses on the factors involved in the induction of these abnormalities and susceptible to increase the incidence of infections, cardiovascular diseases and death, comparable to the incidence observed in the elderly.

We showed that GALP are implicated in the decrease in thymic output and the expansion of T cells at an advanced stage of differentiation. Both are hallmarks of premature immune senescence. Moreover, the dysfunction of the gut epithelial barrier is responsible for gut bacterial translocation (GBT) and the activation of chronic inflammation observed in chronic kidney disease as well as in renal transplant recipients. The composition of the intestinal microbiota may play a role in the initiation, maintenance and severity of GBT and systemic inflammation. We reported the existence of a dysbiosis after transplantation.

The mechanisms involved remain to be elucidated, yet, this work contributes to the understanding of the potential factors involved in the progression of immune senescence and the persistence of chronic inflammation after kidney transplantation paving the way to new fields of therapeutic research in transplantation.

**Keywords:** Kidney transplantation, Immune senescence, Chronic inflammation, Gut bacterial translocation, Lipopolysaccharides, Gut microbiota