

UNIVERSITÉ DE NANTES
FACULTE DE MÉDECINE

DÉTERMINATION D'UNE SIGNATURE
TRANSCRIPTIONNELLE SANGUINE DU DEVENIR À
LONG TERME DU GREFFON DE PATIENTS RECEVANT
UNE ALLOGREFFE RÉNALE.

THESE DE DOCTORAT

École doctorale : CHIMIE-BIOLOGIE

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : IMMUNOLOGIE

Présentée

et soutenue publiquement par

Christophe BRAUD

le 20 décembre 2007, devant le jury ci-dessous :

Rapporteurs : Eric THERVET ; Professeur ; Paris
Alberto SANCHEZ-FUEYO ; Docteur ; Barcelone
Examineurs : Dominique BAETEN ; Professeur ; Amsterdam
Georges GUELLAEN ; Directeur de recherche ; Paris
Jean-Paul SOULILLOU ; Professeur ; Nantes
Directeur de thèse : Dr. Sophie BROUARD ; Chargé de recherche ; Nantes

*« Ce n'est pas parce que les choses sont difficiles que nous n'osons pas, c'est
parce que nous n'osons pas qu'elles sont difficiles »*

Sénèque

« Le futur appartient à ceux qui croient à la beauté de leurs rêves »

Eleanor Roosevelt

Sommaire

Sommaire	3
Abréviations	5
Liste des figures	6
Liste des tables	7
Avant-propos	8
Introduction	11
1. Le rejet de greffe	12
1.1 Le rejet hyperaigu	14
1.2 Le rejet aigu	14
1.3 Le rejet chronique	15
2. La tolérance « opérationnelle »	16
3. Recherche de « Biomarqueurs »	21
3.1. Définition d'un « biomarqueur »	21
3.2. Choix de l'échantillon biologique.....	22
3.2.1 La biopsie	22
3.2.2 L'urine	22
3.2.3 Le sang	23
3.3. « Biomarqueurs » et transplantation rénale	24
3.3.1. Biomarqueurs et rejet aigu.....	24
3.3.1.1. Spectrométrie de masse.....	24
3.3.1.2. Puces à ADN.....	25
3.3.2. Biomarqueurs et rejet chronique.....	26
3.3.2.1. Spectrométrie de masse.....	26
3.3.2.2. Puces à ADN.....	26
3.3.3. Biomarqueurs et tolérance « opérationnelle »	27
4. Contexte méthodologique des puces à ADN	28
4.1 Introduction	28
4.1.1 Historique	28
4.1.2 Principe des puces à ADN et analyse du transcriptome	31
4.2 Hybridation des puces à ADN	33
4.2.1 Préparation des échantillons	33
4.2.2 Marquage	33
4.2.3 Hybridation.....	34
4.3 Acquisition des données	34
4.3.1 Acquisition des images.....	34
4.3.2 Analyse des images	35
4.4 Transformation des données	36
4.4.1 Notation et représentation des données	37
4.4.2 Filtration des données.....	38
4.4.3 Normalisation des données	39
4.4.3.1 Méthode des gènes invariants	39
4.4.3.2 Normalisation spatiale.....	40
4.4.3.3 Normalisation par méthode Lowess.....	41
4.4.3.4 Réajustement (scaling).....	41
4.4.4 Elimination des valeurs aberrantes	42
4.5. Analyses des résultats.....	42
4.5.1 Stockage des données	42
4.5.2 Détection des gènes différentiellement exprimés	43
4.5.3 Choix du seuil de significativité	45

4.5.3.1. Erreur FWER.....	45
4.5.3.2. Erreur FDR.....	46
4.5.4. Regroupement hiérarchique des données d'expressions.....	46
4.5.4.1. Classification non-supervisée.....	47
4.5.4.2. Classification supervisée.....	49
4.5.5. Interprétations des données.....	50
4.5.5.1. GO : Gene Ontology.....	51
4.5.5.2. Banques de données.....	51
4.5.5.3. Confrontation, combinaison et recouplement des données.....	52
4.5.6. Puces et art !.....	53
5. Objectifs.....	54
Résultats.....	56
1. Article I.....	57
1.1. Identification d'un panel de biomarqueurs transcriptionnels sanguins associé à la tolérance « opérationnelle » rénale.....	57
1.2. Résumé de l'article I.....	64
1.3. Discussion de l'article I.....	65
1.3.1. Analyse non supervisée.....	65
1.3.2. Identification d'un groupe de gènes liés à la tolérance « opérationnelle ».....	68
1.3.3. Pertinence de la signature transcriptionnelle de la tolérance.....	70
1.3.4. Validation de la liste de gènes.....	70
1.4. Conclusion de l'article I.....	72
2. Article II.....	73
2.1. Tolérance « opérationnelle » sans traitement immunosuppresseur chez des patients transplantés rénaux : I. Analyse statistique de l'expression des gènes sanguins.....	73
2.2. Résumé de l'article II.....	86
2.3. Discussion de l'article II.....	86
2.3.1. Confection d'une puce dédiée.....	86
2.3.2. Analyse de l'expression des gènes.....	87
3. Article III.....	90
3.1. Tolérance « opérationnelle » sans traitement immunosuppresseur chez des patients transplantés rénaux : II. Analyse non-statistique de l'expression des gènes.....	90
3.2. Résumé de l'article III.....	105
3.3. Discussion de l'article III.....	105
3.3.1. Méthode d'identification des gènes <i>leader</i>	105
3.3.2. Détermination des gènes <i>leader</i> de la tolérance « opérationnelle » et du rejet chronique.....	106
3.3.3. Identification des réseaux d'interactions.....	107
3.4. Conclusion des Articles II et III.....	115
Conclusion et perspectives.....	117
1. Conclusions.....	118
2. Perspectives.....	120
2.1. Etudes de nouvelles cibles moléculaires impliquées dans la tolérance « opérationnelle »..	120
2.2. Recherche de la signature de la tolérance « opérationnelle » chez des patients greffés rénaux avec une fonction stable.....	121
2.3. Recherche d'une signature du rejet chronique.....	122
Bibliographie.....	124
Annexes.....	138
Annexe 1.....	139
Annexe 2.....	147

Abréviations

A :	<i>Add</i>
aadUTP :	<i>amino-allyl dUTP</i>
ADN :	<i>Acide Désoxyribonucléique</i>
ADNc :	<i>ADN complémentaire</i>
ARNm :	<i>Acide Ribonucléique messenger</i>
BASE :	<i>BioArray Software Environment</i>
CTL :	<i>Cytotoxic -lymphocyte</i>
CMH :	<i>Complexe Majeur d'Histocompatibilité</i>
Cy :	<i>Cyanine</i>
DAVID :	<i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i>
DTH :	<i>Delayed-Type Hypersensitivity</i>
EASE :	<i>Expression Analysis Systematic Explorer</i>
FDR :	<i>False Discovery Rate</i>
FWER :	<i>Family Wise Error Rate</i>
G :	<i>Green</i>
HGNC :	<i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>
HUGO :	<i>Human Gene Organisation</i>
HLA :	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
Ig :	<i>Immunoglobuline</i>
KEGG :	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
M :	<i>Minus</i>
MAD :	<i>Median Absolute Deviation</i>
MADSCAN :	<i>MicroArray Data Suite of Computed Analysis</i>
MADSENSE :	<i>MicroArray Data SENSE</i>
NK :	<i>Natural killer</i>
PAM :	<i>Prediction Analysis of Microarrays</i>
PAMP :	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PBMC :	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PCR :	<i>polymerase Chain Reaction</i>
PLS :	<i>Partial Least Square</i>
PMT:	<i>Photomultiplicateur</i>
R :	<i>Red</i>
Rb/Gb :	<i>bruit de fond de l'intensité R ou G</i>
Rf/Gf :	<i>signal R ou G non normalisé</i>
SELDI-TOF-MS :	<i>Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight – Mass Spectrometry</i>
SDS:	<i>Sodium Dodécyl Sulfate</i>
SSC:	<i>Sodium chloride and Sodium Citrate</i>

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique des mécanismes de rejet de greffes.....	13
Figure 2 : Nombre de publications concernant les puces à ADN de 1993 à 2006.....	29
Figure 3 : Principe de la technologie des puces à ADN.....	32
Figure 4 : Principe du calcul par <i>GenePix</i>	36
Figure 5 : Exemple de représentation MA pour l'ensemble des intensités d'une lame.	38
Figure 6 : Arbre de décision de MADSCAN pour la filtration des données.	39
Figure 7 : Sélection des gènes invariants et normalisation.	40
Figure 8 : intérêt du réajustement.....	41
Figure 9 : Exemple d' <i>outliers</i>	42
Figure 10 : Courbe de ROC.....	45
Figure 11 : Représentation graphique issue d'une analyse par classification hiérarchique.....	48
Figure 12 : Algorithme des k-moyennes.	49
Figure 13 : Exemples de l' <i>art array</i> ou la « beauté de l'erreur ».	53
Figure 14 : Classification hiérarchique non-supervisée des patients.	66
Figure 15 : Prédiction de la signature de la tolérance « opérationnelle » dans le sang de nouveaux patients tolérants et de patients en rejet chronique indépendants par RT-PCR.	71
Figure 16 : Corrélation de l'expression des 343 gènes dans le temps.	88
Figure 17 : Réseau d'interleukines identifié par les interactions entre les gènes <i>leader</i>	110
Figure 18 : Réseau de transduction du signal identifié par les interactions entre les gènes <i>leader</i>	112
Figure 19 : Carte d'interaction.....	114

Liste des tables

Tableau 1 : Exemples de technologies de puces à ADN.....	30
Tableau 2 : Enrichissement des familles de gènes.	67
Tableau 3 : Liste des 49 gènes (Article I).	69
Tableau 4 : Listes des protéines correspondantes à la carte des interactions classées selon leur score.	107
Tableau 5 : Données cliniques des patients présentant une fonction rénale stable à l'inclusion.	122
Tableau 6 : Liste des 343 gènes (Article II)	139

Avant-propos

L'immunité est l'ensemble des mécanismes permettant à un organisme d'assurer son intégrité en éliminant les substances étrangères, les agents infectieux ou bien ses propres constituants défectueux ou altérés. Le système immunitaire d'un organisme a la capacité de distinguer ses propres composants (le « soi ») des constituants étrangers ou altérés (le « non-soi » ou le « soi-altéré ») pour permettre leurs éliminations.

Il existe deux grands types de défense du système immunitaire : l'immunité innée (ou naturelle) et l'immunité adaptative (ou spécifique). L'immunité innée est une réaction rapide de l'organisme suivant l'introduction d'éléments étrangers d'origines diverses et variées (virus, bactérie, levures, parasites...) en l'absence de spécificité. Les effecteurs de cette réponse comportent une composante cellulaire (cellules dendritiques, cellules *natural killer* (NK), macrophages et neutrophiles) qui reconnaissent des motifs invariants portés à la surface des agents pathogènes (PAMP : *Pathogen associated molecular pattern*) (Janeway and Medzhitov 2002), ainsi qu'une composante humorale (complément et lysozymes).

La mise en place de l'immunité adaptative est plus lente que celle de l'immunité innée. Les principaux médiateurs sont les lymphocytes T et B qui possèdent des récepteurs susceptibles d'interagir avec un antigène spécifique. Les lymphocytes B stimulés par l'antigène se multiplient et se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps (composante humorale). Les lymphocytes T stimulés par la présentation de l'antigène par les cellules présentatrices (CPA : Cellule Présentatrice de l'Antigène) se différencient soit en cellules T auxiliaires/helpers ou en cellules T cytotoxiques (composante cellulaire). Lorsque le lymphocyte T est activé par une CPA dans un contexte de danger, cela entraîne l'expression de molécules de costimulation (Matzinger 2002) aboutissant à la destruction du pathogène. Cette immunité acquise se caractérise par la capacité à développer une mémoire immunitaire permettant une réponse ultérieure plus rapide contre le même antigène (Fazilleau, McHeyzer-Williams *et al.* 2007).

Si la réponse immunitaire est essentielle à la protection de l'organisme contre les agressions extérieures, elle est aussi un frein à l'acceptation de cellules ou d'organes étrangers comme dans le cas de la transplantation. Lors d'une transplantation, l'introduction de cellules ou d'un organe induit un rejet de la greffe par le système immunitaire. Cette réponse doit être contrôlée ou détournée afin de permettre l'acceptation du greffon. Actuellement, les traitements immunosuppresseurs empêchent la survenue du rejet aigu mais ne permettent pas d'éviter entièrement le rejet chronique et entraînent de nombreux effets secondaires comme les cancers ou les infections (Dantal, Hourmant *et al.* 1998; Hojo, Morimoto *et al.* 1999; Souillou and Giral 2001) ainsi qu'une néphrotoxicité (Nankivell, Borrows *et al.* 2004).

L'objectif de la recherche en transplantation est donc de permettre l'acceptation indéfinie du greffon en l'absence de tout traitement immunosuppresseur : c'est la tolérance « opérationnelle ».

Je me suis particulièrement intéressé au cours de ma thèse à la détermination de signatures transcriptionnelles sanguines spécifiques de la tolérance « opérationnelle » et du rejet chronique. Après un chapitre sur les caractéristiques et les mécanismes du rejet de greffe et sur la définition de la tolérance « opérationnelle » chez l'Homme, je présenterai l'intérêt de la recherche de « biomarqueurs » et je détaillerais la méthode d'analyse des puces à ADN.

Introduction

1. Le rejet de greffe

La transplantation d'organe est le traitement de choix des défaillances organiques fonctionnelles comme l'insuffisance rénale terminale, le dysfonctionnement cardiaque, la mucoviscidose... Il existe trois grands types de transplantation (Orosz 2002) : l'autogreffe, l'allogreffe et la xéno greffe. Dans le cas de l'autogreffe, le donneur et le receveur sont le même individu. Elle concerne principalement les greffes de peau et de moelle osseuse. Dans le cas de l'allogreffe, qui est la transplantation la plus fréquente, le donneur et le receveur sont des individus différents mais de même espèce. Dans le cas de la xéno greffe, le donneur et le receveur sont d'espèces différentes.

Depuis la première allotransplantation dans les années 1950, l'introduction des traitements immunosuppresseurs (Schwartz and Dameshek 1959) a largement contribué à l'amélioration de la qualité de vie des patients transplantés (Murray 2005). Cependant, ces traitements chroniques à long terme ont des effets secondaires lourds tels que l'augmentation des susceptibilités aux cancers et aux infections virales (Dantal, Hourmant *et al.* 1998; Hojo, Morimoto *et al.* 1999; Soulillou and Giral 2001) mais également une néphrotoxicité (Nankivell, Borrows *et al.* 2004). De plus, si ces traitements immunosuppresseurs sont efficaces sur le rejet aigu, ils n'empêchent pas la survenue du rejet à long terme du greffon pouvant aller jusqu'à la perte de ce greffon. Lorsque le greffon est reconnu comme étranger par l'organisme hôte, les défenses immunitaires se mettent en place et génèrent une réponse immune aboutissant à la destruction du greffon.

Les molécules du greffon qui vont être reconnues par le système immunitaire comme ne faisant pas partie de l'organisme sont appelées alloantigènes. Les lymphocytes et les anticorps reconnaissant les alloantigènes sont décrits comme étant alloréactifs. La réponse alloréactive se décompose en trois grandes étapes : la reconnaissance des alloantigènes par les cellules T de l'hôte, l'activation et la différenciation de ces cellules et enfin une phase effectrice qui conduit à la destruction totale ou partielle du greffon.

Les mécanismes par lesquels l'allogreffe peut être rejetée dépendent de nombreux facteurs impliquant un grand nombre de cellules et de molécules du système immunitaire (Cuturi, Blacho *et al.* 1994; Orosz 2002). Les cellules T reconnaissent les alloantigènes présentés par les CPA induisant la prolifération de ces cellules T dites *helpers* (T_H). La prolifération de cette population induit divers mécanismes effecteurs du rejet de greffe :

l'hypersensibilité retardée, l'activation des macrophages, les cytotoxicités induites par les cellules T cytotoxiques (CTL) ou dépendante des anticorps (ADCC : *Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity*) (Figure 1). Les lymphocytes T $CD4^+$ de type Th1, en produisant des cytokines telles que l'IL-2 et l'IFN- γ , sont généralement associés au développement de ce type de mécanismes effecteurs car ces cytokines sont retrouvées dans différents modèles d'allogreffes lors du rejet aigu (Holweg, Peeters *et al.* 2003; Wang, Hosiawa *et al.* 2003).

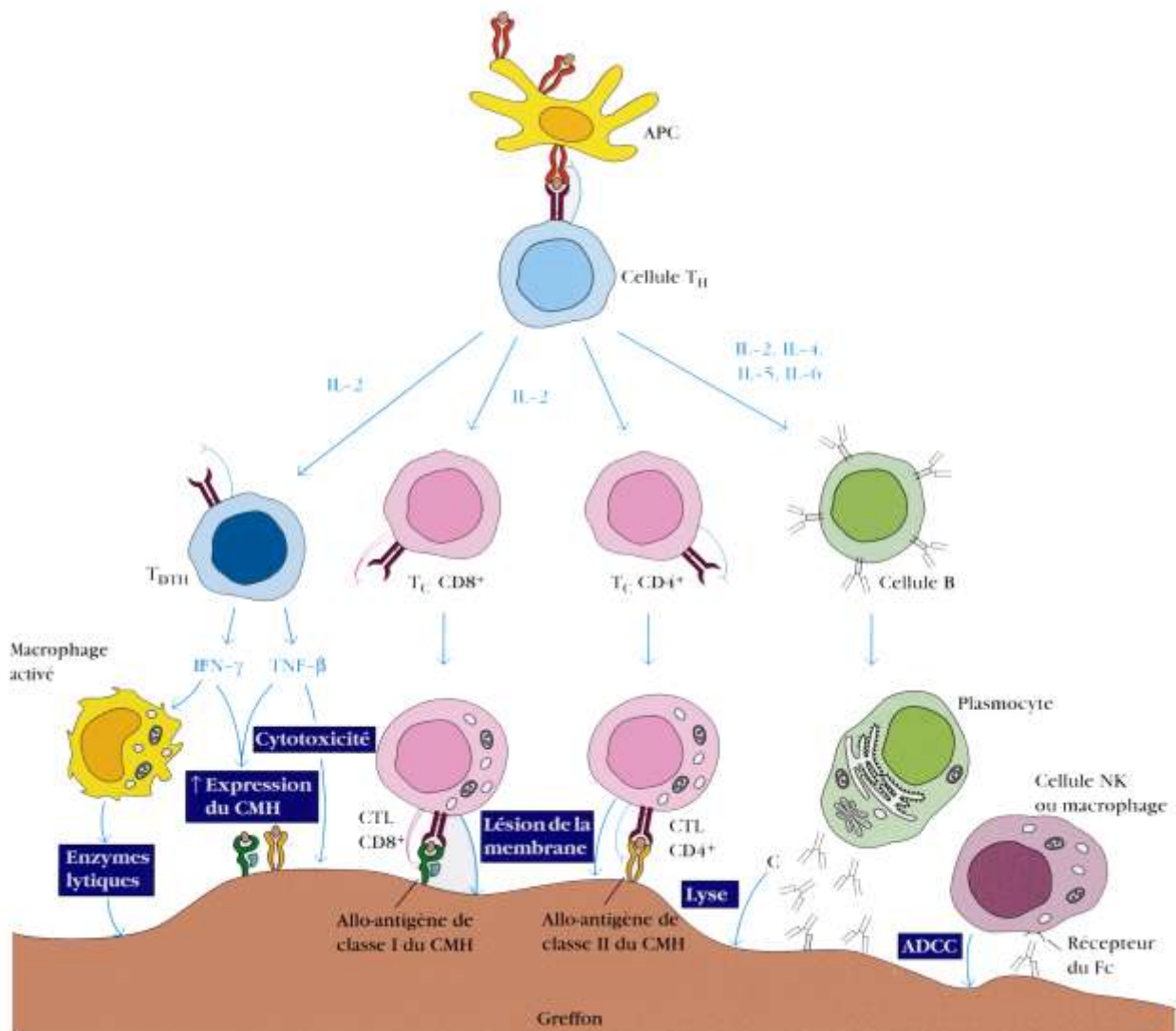


Figure 1 : Représentation schématique des mécanismes de rejet de greffes.

(tiré de (Goldsby, Kindt *et al.* 2000)). C = complément ; ADCC = *Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity* ; CTL : *cytotoxic T lymphocyte*)

Il existe trois types de rejets de greffes présentant des mécanismes et des cinétiques différents. : Le rejet hyperaigu, le rejet aigu et le rejet chronique.

1.1 Le rejet hyperaigu

Le rejet hyperaigu est généralement dû à la fixation d'anticorps préformés dirigés principalement contre les antigènes des cellules endothéliales du donneur (Cai and Terasaki 2005; Terasaki and Cai 2005). Cette fixation entraîne l'activation du complément et des cellules endothéliales qui vont alors sécréter, entre autres, le facteur procoagulant Von Willebrand et provoquer ainsi l'agrégation plaquettaire. Cette série de réaction aboutit à une thrombose allant de quelques minutes à quelques heures suivant la transplantation. Ces anticorps préformés peuvent être naturels (comme les anticorps dirigés contre les groupes sanguins) ou bien acquis lors de situations immunogènes antérieures (grossesses, transfusions sanguines, greffes) (Racusen and Haas 2006). Les anticorps acquis reconnaissent des déterminants du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) (anticorps anti-HLA : *Human Leukocyte Antigen*) (Dausset 1999). Ce type de rejet n'intervient que dans les cas de transplantation d'organes vascularisés et aboutit à la nécrose du greffon. De nos jours, ce type de rejet est bien maîtrisé grâce à la recherche systématique des compatibilités HLA entre le donneur et le receveur (test de *cross match*).

1.2 Le rejet aigu

Le rejet aigu est dû au développement de réponses cellulaire et humorale spécifiques qui peuvent survenir environ une semaine suivant la transplantation. Actuellement, grâce aux traitements immunosuppresseurs, les épisodes de rejet aigu surviennent dans moins de 15% des transplantations (Port, Dykstra *et al.* 2005).

Le rejet aigu est le résultat de deux mécanismes immunologiques : un processus cellulaire (dépendant des cellules T) et un processus humoral (dépendant des cellules B). Ces deux processus peuvent agir seul ou ensemble (Marks and Finke 2006). Les cellules dendritiques du donneur vont migrer vers les organes lymphoïdes secondaires du receveur où elles vont activer les cellules T du receveur par la présentation directe des antigènes du donneur (Lechler and Batchelor 1982; Lechler, Lombardi *et al.* 1990). Par ailleurs, les cellules dendritiques du receveur peuvent activer les lymphocytes T par la présentation indirecte des

antigènes du donneur (Auchincloss, Lee *et al.* 1993). Ces lymphocytes T ainsi activés vont proliférer et migrer vers le greffon. Ils sont attirés par des molécules d'adhésion exprimés par l'endothélium devenu inflammatoire (Trivedi 2007). Une fois dans le greffon, les lymphocytes T CD4 déclenchent une réponse d'hypersensibilité retardée (DTH : *delayed-Type Hypersensitivity*). De plus, ces lymphocytes sécrètent des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-2, le TNF- α et l'IFN- γ attirant ainsi les macrophages vers le greffon. Les macrophages activés produisent des chimiokines, du monoxyde d'azote et d'autres facteurs solubles qui activent l'endothélium (Le Moine, Goldman *et al.* 2002). Les lymphocytes T CD8 cytotoxiques détruisent les cellules du greffon par contact direct impliquant la voie Fas/FasL et par la sécrétion de granzyme et de perforine (Graziotto, Del Prete *et al.* 2006).

La différenciation des lymphocytes B en plasmocytes sous l'effet de certaines cytokines (Dai and Lakkis 1999) induit la production d'anticorps dirigés contre les antigènes du donneur (Le Moine, Goldman *et al.* 2002). Les immunoglobulines (IgM, IgG1) produites par les plasmocytes vont se fixer sur les cellules endothéliales entraînant l'activation de la cascade du complément et aboutissant à la destruction de l'endothélium (Baldwin, Larsen *et al.* 2001; Baldwin, Pruitt *et al.* 1995).

1.3 Le rejet chronique

L'amélioration des traitements immunosuppresseurs a permis une nette augmentation du taux de greffons fonctionnels à court et long termes (Hariharan, Johnson *et al.* 2000; Kasiske, Gaston *et al.* 2005; Pastural, Lang *et al.* 2000). Malgré leur efficacité sur les rejets hyperaigu et aigu (Paul 1999), ils n'empêchent pas la survenue du rejet chronique (Ballet, Giral *et al.* 2006; Joosten, Sijpkens *et al.* 2005).

Le rejet chronique se caractérise histologiquement par une atteinte des vaisseaux artériels avec un épaississement intimal et une prolifération des cellules musculaires lisses induisant un rétrécissement de la lumière, ainsi que par l'apparition d'une fibrose interstitielle (vasculopathie du transplant). Il existe également dans le cas de la greffe rénale une glomérulopathie caractérisée par un dédoublement des membranes basales et une atrophie tubulaire (Solez, Colvin *et al.* 2007). Le greffon peut également présenter des lésions dues à une toxicité des inhibiteurs des calcineurines (ciclosporine A, Tacrolimus) caractérisée par des dépôts hyalins nodulaires à la périphérie des artérioles. De récentes données sur les

alloanticorps et la molécule C4d semblent indiquer un rôle pathogénique de l'immunité humorale chez certains patients atteints de dysfonction chronique du transplant rénal. Cette notion a été introduite lors de la dernière classification de Banff (Solez, Colvin *et al.* 2007). Les anticorps anti-HLA semblent participer à l'établissement du rejet chronique (Davenport, Younie *et al.* 1994; Piazza, Poggi *et al.* 2001; Worthington, Martin *et al.* 2003).

D'autres facteurs aussi bien immunologiques que non-immunologiques sont aussi impliqués dans le rejet chronique comme la mort cérébrale du donneur et les phénomènes d'ischémie/reperfusion (Banasik and Klinger 2006; Szabo and Heemann 1998). De plus, il a été établi que la présence d'alloanticorps (Hourmant, Cesbron-Gautier *et al.* 2005), le nombre d'épisodes de rejets aigus (Matas, Humar *et al.* 1999), le nombre d'incompatibilités HLA (Terasaki and Ozawa 2004), le retard de démarrage du greffon (Giral-Classe, Hourmant *et al.* 1998; Perico, Cattaneo *et al.* 2004), l'âge du donneur (Emiroglu, Yagmurduur *et al.* 2005; Oppenheimer, Aljama *et al.* 2004) ainsi que le poids du greffon (Giral, Nguyen *et al.* 2005) seraient des facteurs favorisant le développement du rejet chronique.

De plus, les traitements immunosuppresseurs entraînent des effets secondaires comme une augmentation des risques d'infections opportunistes et de cancers (Dantal, Hourmant *et al.* 1998; Soullillou and Giral 2001; Wimmer, Rentsch *et al.* 2007) mais également une néphrotoxicité (Nankivell, Borrows *et al.* 2004). Ainsi, l'un des buts de la recherche en transplantation est d'obtenir un état de tolérance du receveur spécifique du donneur.

2. La tolérance « opérationnelle »

Il existe plusieurs types de tolérance en transplantation : la tolérance vraie décrite initialement par Billingham *et al.* chez le rongeur où des cellules de souris adulte de souche A ont été greffées dans des embryons de souris CBA (Billingham, Brent *et al.* 1953) ; la *prope* tolérance décrite par Calne *et al.* (Calne, Friend *et al.* 1998), connue aussi sous le nom de tolérance « partielle » (Cortesini and Suci-Foca 2004) ; et la tolérance « opérationnelle ». La tolérance vraie est définie par l'acceptation spécifique du greffon en l'absence d'immunosuppression, une histologie et une fonction normale du greffon et une réponse immunitaire compétente. La *prope* tolérance est définie par une fonction et une histologie normale du greffon sous faibles doses d'immunosuppresseurs.

La tolérance « opérationnelle » chez l'Homme se définit par une survie du greffon indéfinie avec une bonne fonction de l'organe en l'absence de tout traitement immunosuppresseur accompagnée d'une réponse immunitaire compétente (Ansari and Sayegh 2004) ainsi qu'en l'absence de signes cliniques de rejet chronique (Roussey-Kesler, Giral *et al.* 2006). Étant donné que l'accès à la biopsie n'est pas toujours réalisable, l'état de tolérance « opérationnelle » ne repose pas systématiquement sur une définition histologique du greffon mais sur des critères fonctionnels (*e.g.* la créatinémie et la protéinurie). De plus, plusieurs équipes ne souhaitent pas effectuer de biopsies ces patients compte-tenu des risques encourus (Furness, Philpott *et al.* 2003). Certains critères issus de modèles de tolérance chez les primates sont parfois retenus pour compléter cette définition de la tolérance : l'absence d'anticorps anti-donneur, l'absence d'infiltration du greffon par les lymphocytes allogéniques et une faible réponse dirigée contre le donneur *in vitro* alors que la réponse contre un tiers en conservée (Fehr and Sykes 2004).

La prévalence de la tolérance « opérationnelle » dépend du type d'organe transplanté. Dans le cas de la transplantation hépatique, environ 20-25% de patients inclus dans un protocole de sevrage des immunosuppresseurs se révèlent être spontanément tolérants (Martinez-Llordella, Puig-Pey *et al.* 2007; Takatsuki, Uemoto *et al.* 2001). En transplantation rénale, les cas de tolérance « opérationnelle » sont plus rares. En effet, il n'existe pas de protocole de sevrage des immunosuppresseurs programmé chez des patients adultes. La majorité de ces cas d'arrêt total de traitement immunosuppresseur est due à la non-compliance des patients ou parfois suite à la toxicité des traitements à long terme (Ashton-Chess, Brouard *et al.* 2006; Roussey-Kesler, Giral *et al.* 2006). Cependant, certains cas de tolérance « opérationnelle » ont été rapportés dans la littérature chez les patients greffés rénaux.

Dans les années 1960, sur quarante-huit patients traités initialement par azathioprine, six d'entre-eux (6/48 : 12,5%) ont conservé une bonne fonction rénale trois à trente-huit ans après l'arrêt de l'immunosuppression pour non-compliance (Starzl, Murase *et al.* 2004). Lors de l'autopsie de l'un de ces patients, le greffon présentait un aspect histologique normal. Dans les années 1980, Zoller *et al.* ont rapporté une cohorte de quarante-huit patients (parmi 6000 greffes rénales) qui avaient arrêté leur traitement immunosuppresseur (quarante-cinq pour non-compliance et trois suite à l'avis des cliniciens). Parmi eux, vingt-et-un patients (soit 43%) ont dégradé leur fonction rénale dans les semaines suivant l'arrêt du traitement. Seuls six patients conservent une fonction rénale stable en l'absence de tout traitement immunosuppresseur depuis plus de trois ans (Zoller, Cho *et al.* 1980). D'autres cas de tolérance « opérationnelle » ont été rapportés dans les années 1970 (Owens, Maxwell *et al.*

1975) pouvant aller jusqu'à plus de trente ans de survie du greffon en l'absence d'immunosuppresseurs (Cai, Lee *et al.* 2004; Uehling, Hussey *et al.* 1976). Burlingham *et al.* ont décrit le cas d'un patient greffé avec le rein de sa mère et présentant une bonne fonction rénale plus de cinq ans après l'arrêt de son traitement pour non-compliance. Une biopsie réalisée au moment de l'arrêt du traitement n'a pas montrée de signe de rejet chronique. Un microchimérisme a été retrouvé au niveau des lymphocytes et de la peau du receveur deux ans après la greffe (Burlingham, Grailer *et al.* 1995). Christensen *et al.* rapportent le cas d'un autre patient greffé une première fois avec rein d'origine maternelle, puis une deuxième fois avec un rein d'origine paternelle. Le traitement immunosuppresseur a été stoppé à cause d'un syndrome lymphoprolifératif suite à la seconde greffe. Le patient a conservé une bonne fonction rénale plus de trois ans après le sevrage du traitement (Christensen, Grunnet *et al.* 1998). Fisher *et al.* ont décrit le cas d'une patiente ayant stoppé son traitement immunosuppresseur suite à sa première grossesse et ayant gardé une bonne fonction rénale neuf ans après l'arrêt du traitement (Fischer, Schobel *et al.* 1996). Plus récemment, Fudaba *et al.* ont observé trois cas de tolérance « opérationnelle » chez des patients ayant reçu simultanément une greffe de rein et de moelle osseuse. Ces patients présentent un microchimérisme transitoire sans réponse anti-donneur spécifique (Fudaba, Spitzer *et al.* 2006).

Nous avons étudié au laboratoire une petite cohorte de dix-huit patients « opérationnellement » tolérants qui ont stoppé leur immunosuppression pour non-compliance (n=14), suite à des désordres lymphoprolifératifs post-transplantation (n=2) ou suite à des toxicités aux drogues (n=1). Les données cliniques de dix de ces patients ont fait l'objet d'une étude plus approfondie (Roussey-Kesler, Giral *et al.* 2006). Le jeune âge des donneurs et une reprise de fonction du greffon peu ou pas retardée associés à l'arrêt progressif du traitement immunosuppresseur (jusqu'à quatre ans) semblent constituer des éléments favorables à la survenue d'un état de tolérance « opérationnelle ». Tous ces patients ont reçu des transplants de donneurs décédés avec des incompatibilités HLA au nombre de $3 \pm 1,5$ en moyenne. Ceci semble dire que la compatibilité HLA ne joue pas un rôle dans la tolérance « opérationnelle ». De plus, deux de ces patients possèdent des anticorps anti-donneur de classe II indiquant que la tolérance « opérationnelle » peut avoir lieu malgré la présence d'une potentielle réponse anti-donneur. Ces résultats sont concordants avec les observations faites par Strober *et al.* qui ont trouvé une 'réactivité anti-donneur vigoureuse' des PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) chez un patient « opérationnellement » tolérant depuis plus de douze ans en réaction mixte lymphocytaire (Strober, Benike *et al.* 2000). *A contrario*, VanBuskirk *et al.*

n'ont pas trouvé de réponse DTH chez trois patients « opérationnellement » tolérants depuis quatre, cinq et vingt-huit ans (deux patients ayant reçu une greffe rénale et l'autre une greffe hépatique). L'un des patients étudiés, a rejeté son greffon rénal sept ans après l'arrêt de son traitement et présente une réponse DTH forte (VanBuskirk, Burlingham *et al.* 2000). L'absence de réponse DTH chez ces patients est due à la présence de lymphocytes T CD4 produisant du TGF- β ou de l'IL10.

Afin de vérifier si cet état de tolérance « opérationnelle » est spécifique du greffon ou bien résulte d'une immunodéficiência globale, l'immunocompétence de cinq de ces patients a été testée en étudiant la réponse des cellules mononucléées sanguines du patient suite à une immunisation au vaccin de la grippe (Ballet, Roussey-Kesler *et al.* 2006). Sur cinq patients testés, trois patients répondent aussi bien que des individus sains et les deux autres ont des réponses comparables à celle de patients greffés sous traitement immunosuppresseur. Tous les patients greffés sous traitement immunosuppresseur ont une réponse humorale réduite suite à l'immunisation au vaccin de la grippe. Ces données suggèrent que l'état de tolérance « opérationnelle » peut être considéré comme une tolérance spécifique du greffon pour certains patients, mais aussi comme une immunodéficiência globale pour d'autres patients malgré l'absence d'infection opportuniste chez ces patients.

Les analyses transcriptionnelles du répertoire des récepteurs des lymphocytes T sanguins des patients « opérationnellement » tolérants ont montré des altérations de distribution des longueurs de CDR3 ainsi que des ratios de transcrits V β /HPRT anormaux (Brouard, Dupont *et al.* 2005). Des résultats similaires ont été observés par Alvarez *et al.* Ils montrent que les patients avec une fonction rénale stable avec (n=16) ou sans (=3) immunosuppression présentent un répertoire du récepteur des lymphocytes T altéré. De plus, ces répertoires ont un profil oligoclonal alors que les patients en rejet chronique, les patients présentant des épisodes de rejet aigu et les individus sains présentent un profil polyclonal (Alvarez, Opelz *et al.* 2005). De plus, les cellules T des patients « opérationnellement » tolérants isolées à partir des familles V β qui présentent des altérations de longueur CDR3 de leurs récepteurs T ne présentent pas d'accumulation de transcrits de cytokines de types Th1 (IL-2, IFN- γ) ou Th2 (IL-10, IL-13) (Brouard, Dupont *et al.* 2005). Ces observations sont compatibles avec une anergie ou une réponse diminuée du système immunitaire plutôt qu'à une ignorance du greffon. Par ailleurs, les patients « opérationnellement » tolérants présentent un profil qui ne diffère pas des individus sains. Cependant, ce profil est clairement différent de celui observé chez les patients en rejet chronique où les cellules T présentant des altérations semblent être des cellules mémoires.

Un autre mécanisme possible pouvant expliquer l'état de tolérance « opérationnelle » chez ces patients est la présence de cellules régulatrices. Une étude phénotypique menée au laboratoire a montré que les patients en rejet chronique présentent une forte diminution du nombre de cellules T CD4⁺ CD25⁺ par rapport aux patients « opérationnellement » tolérants. Il est à noter que ces patients « opérationnellement » tolérants ne présentent pas de différence du nombre de ces cellules en comparaison des individus sains (Louis, Braudeau *et al.* 2006). Par ailleurs, la quantité de transcrits de FOXP3 (marqueur des cellules régulatrices T CD4⁺ CD25⁺ (Fontenot, Gavin *et al.* 2003; Hori, Nomura *et al.* 2003; Sakaguchi, Ono *et al.* 2006)) est fortement diminuée chez les patients en rejet chronique comparativement aux patients « opérationnellement » tolérants et aux individus sains. Ces résultats suggèrent donc que la tolérance « opérationnelle » est peut être due au maintien du phénomène de tolérance naturelle, et que ce phénomène est altéré chez les patients en rejet chronique.

Une deuxième étude phénotypique a été menée au laboratoire portant sur la population T CD8⁺. Baeten *et al.* ont observé une réduction importante du nombre de cellules T CD8⁺ CD28⁻ chez les patients « opérationnellement » tolérants en comparaison des patients en rejet chronique (Baeten, Louis *et al.* 2006) (cf. Annexe 2). Il est à noter que les patients « opérationnellement » tolérants présentent un nombre similaire de cellules CD8⁺ CD28⁻ par rapport aux individus sains. Ceci indique une augmentation anormale de cette population dans le rejet chronique plutôt qu'une altération dans la tolérance « opérationnelle ». De plus, la population CD8⁺ CD28⁻ chez les patients en rejet chronique est caractérisée par la coexpression de la perforine, de la granzyme A et du CD57. Cette population semble être des lymphocytes T effecteurs cytotoxiques (Romero, Zippelius *et al.* 2007; Rufer, Zippelius *et al.* 2003; Weekes, Carmichael *et al.* 1999; Wolint, Betts *et al.* 2004). Une population T CD8⁺ CD28⁻ a été décrite par le groupe de Suci-Fuca comme étant augmentée chez les patients greffés rénaux et hépatiques sous traitement immunosuppresseur comparée aux patients présentant des épisodes de rejet (Cortesini, Renna-Molajoni *et al.* 2002). Certains points peuvent expliquer les différences observées entre ces deux études : Cortesini *et al.* ont décrit cette population chez des patients sous traitement immunosuppresseur comme étant suppressive *in vitro* en inhibant l'expression de CD40 et en favorisant l'expression de CD80 et CD86 à la surface des CPA du donneur alors que Baeten *et al.* ont décrit la population CD8⁺ CD28⁻ comme étant cytotoxique *in vivo* chez des patients « opérationnellement » tolérants.

Comme nous l'avons vu, la proportion de patients « opérationnellement » tolérants suite à une transplantation rénale est très faible et la plupart des études menées sur ces patients ne permet pas d'établir de facteurs prédictifs de la tolérance. De plus, il est fort possible que cette proportion de patients potentiellement tolérants soit sous-estimée car il n'existe pas d'étude d'arrêt programmé du traitement immunosuppresseur chez les patients transplantés rénaux. Ainsi, le but de notre étude est de déterminer des facteurs prédictifs de la tolérance « opérationnelle » afin d'identifier les patients sous traitement immunosuppresseur qui seraient potentiellement « opérationnellement » tolérants. Ces facteurs prédictifs sont appelés « biomarqueurs ».

3. Recherche de « Biomarqueurs »

3.1. Définition d'un « biomarqueur »

Un biomarqueur biologique peut être défini en tant que caractéristique qui est objectivement mesurée et évaluée comme indicateur d'un processus biologique normal ou pathogénique ou bien comme indicateur de réponses pharmacologiques en réponse à une intervention thérapeutique (Ashton-Chess, Souillou *et al.* 2007; BiomarkersDefinitionsWorkingGroup 2001). Pour qu'un biomarqueur soit utilisable, il doit être capable de distinguer la 'pathologie' en question d'un état de référence (*e.g.* état sain ou « normal »). Les biomarqueurs sont souvent utilisés pour diagnostiquer un état pathologique ou pour suivre l'évolution de la maladie. Les biomarqueurs peuvent aussi servir à prédire la susceptibilité des patients à répondre à certains traitements. Ce type de biomarqueurs peut donner des informations précocement et ainsi permettre une intervention clinique avant qu'il ne soit trop tard. Idéalement, les biomarqueurs doivent être détectables de manière non-invasive (*e.g.* les urines) ou faiblement invasive (*e.g.* le sang).

3.2. Choix de l'échantillon biologique

3.2.1 La biopsie

Aujourd'hui, le meilleur biomarqueur en transplantation rénale est l'étude histologique du greffon selon le système de classification Banff (Solez, Colvin *et al.* 2007). La créatinine et la protéinurie sont aussi deux marqueurs fréquemment utilisés en clinique pour suivre la fonction du greffon. Cependant, ils ne sont pas des indicateurs fiables car la dégradation du greffon précède parfois la détérioration de la fonction rénale (Nankivell, Borrows *et al.* 2004). Ceci a été identifié à travers l'étude de biopsies protocolaires et est appelé rejet subclinique (Nankivell and Chapman 2006). Rush *et al.* ont observés que 30% des biopsies protocolaires effectuées entre un et six mois après la greffe chez des patients avec une fonction rénale stable montrent une concordance histologique avec les critères de rejet Banff (Rush, Henry *et al.* 1994). De plus, ces biopsies protocolaires peuvent identifier des lésions du greffon non-immunologique (Nankivell, Borrows *et al.* 2004). L'étude histologique du greffon permet ainsi d'adapter le traitement du patient si besoin est (Afzali, Taylor *et al.* 2005; Rush, Jeffery *et al.* 1995).

Cependant, la biopsie reste un acte invasif. De plus, d'autres critères en défaveur des biopsies protocolaires sont mis en avant comme la subjectivité de l'analyse histologique, le ratio coût de l'intervention / bénéfices, les désagréments pour le patient... (Thaunat, Legendre *et al.* 2007). Ainsi, d'autres compartiments biologiques semblent être intéressants pour identifier des biomarqueurs du statut clinique.

3.2.2. L'urine

L'urine est un fluide permettant d'obtenir un échantillon test non-invasif et peu coûteux et qui est, de surcroît, approprié dans le cas de la transplantation rénale. En effet, plusieurs équipes ont montré que les taux d'ARN messagers de la granzyme B et de Foxp3 (*Forkhead box protein 3*) se trouvent être de bons biomarqueurs diagnostiques et/ou pronostiques du rejet aigu (Li, Hartono *et al.* 2001; Veale, Liang *et al.* 2006) ainsi que du devenir des patients suite à un épisode de rejet aigu (Muthukumar, Dadhania *et al.* 2005). De plus, Mas *et al.* ont constaté que le niveau d'expression de trois biomarqueurs dans les urines

est plus représentatif de l'expression de ces molécules dans la biopsie rénale que dans le sang chez des patients en rejet aigu (Mas, Maluf *et al.* 2007) (cf. § 3.3.2.2).

3.2.3. Le sang

Le sang est un échantillon biologique faiblement invasif et semble être un compartiment biologique de choix pour la recherche de biomarqueurs. En effet, l'étude transcriptionnelle dans le sang périphérique semble être indiquée dans la prédiction d'évènements cliniques et dans la gestion du traitement immunosuppresseur dans le cas de la transplantation cardiaque et hépatique.

Deng *et al.* ont identifié par la technologie des puces à ADN chez des patients transplantés cardiaques onze gènes permettant d'identifier parmi cent-sept patients, les patients ayant un rejet modéré ou sévère (prouvé par biopsie) des patients sans rejet à partir du sang périphérique (Deng, Eisen *et al.* 2006). Ce test a été validé sur deux cohortes de soixante-trois et cent-vingt-quatre patients indépendants avec une valeur prédictive négative de 99,6%. De même, Horwitz *et al.* ont identifié une liste de quarante gènes sanguins qui corrèle avec l'histologie du rejet d'allogreffe cardiaque de ces patients (Horwitz, Tsai *et al.* 2004). Ils montrent que les patients en rémission qui ont eu une augmentation de leur traitement immunosuppresseur suite à un épisode de rejet présentent des profils d'expression intermédiaires.

Martinez-lordella *et al.* ont utilisé aussi les puces à ADN afin de déterminer une signature transcriptionnelle sanguine permettant de discriminer les patients « opérationnellement » tolérants suite à un arrêt progressif du traitement immunosuppresseur par rapport à des patients dépendant de leur traitement après une greffe de foie (Martinez-Llordella, Puig-Pey *et al.* 2007). Par une méthode de *leave-one-out*, ils ont montré que la liste de gènes identifiée permet de discriminer à > 94% les patients « opérationnellement » tolérants des patients non-tolérants et des individus sains.

Ces trois études montrent que le sang est un bon compartiment pour la détection de biomarqueurs transcriptionnels en transplantation.

3.3. « Biomarqueurs » et transplantation rénale

Aujourd'hui, le meilleur biomarqueur en transplantation rénale est l'étude histologique du greffon selon le système de classification Banff (Solez, Colvin *et al.* 2007). La créatinine et la protéinurie sont aussi deux indicateurs fréquemment utilisés en clinique pour suivre la fonction du greffon. Cependant, ils ne sont pas des marqueurs fiables car la dégradation du greffon précède parfois la détérioration de la fonction rénale (Nankivell, Borrows *et al.* 2004). Ceci a été identifié à travers l'étude de biopsies protocolaires et est appelé rejet subclinique (Nankivell and Chapman 2006). Néanmoins, la biopsie est un acte invasif, couteux et qui peut être risqué (Furness, Philpott *et al.* 2003).

L'émergence des techniques à haut-débit telles que la spectrométrie de masse couplée à la chromatographie d'affinité (SELDI-TOF-MS (*Surface Enhanced Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight – Mass Spectrometry*)) ou bien la technologie des puces à ADN ont permis la détection de nouveaux biomarqueurs en transplantation rénale.

3.3.1. Biomarqueurs et rejet aigu

3.3.1.1. Spectrométrie de masse

O'Riordan *et al.* ont identifiés deux peptides de 4,4 et 4,7 kDa par la technique de SELDI-TOF-MS qui sont fortement accumulés dans les urines de quarante-deux patients en rejet aigu par rapport à trente-et-un patients avec une fonction rénale stable (O'Riordan, Orlova *et al.* 2004). Ces deux peptides ont été identifiés comme étant respectivement la β -défensine-1 et l' α -1-antichymotrypsine (O'Riordan, Orlova *et al.* 2007). De plus, ils ont recherché dans les bases de données publiques issues des puces à ADN le niveau d'expression des gènes codant pour ces protéines (Flechner, Kurian *et al.* 2004; Sarwal, Chua *et al.* 2003) (cf. § 3.3.1.2.). L'expression du gène codant la β -défensine-1 a été retrouvée différemment exprimée dans l'étude de Flechner *et al.* mais pas dans l'étude de Sarwal *et al.* L'expression du gène codant l' α -1-antichymotrypsine n'a pas été retrouvée différemment exprimée mais montre une expression un peu plus forte chez les patients en rejet aigu par rapport aux patients avec une fonction rénale stable dans les deux études.

Schaub *et al.* ont identifié de leur côté trois groupement de protéines spécifiques du rejet aigu (Schaub, Rush *et al.* 2004). Tous les pics protéiques de ces trois groupement dérivent de formes clivées de la β 2-microglobuline (Schaub, Wilkins *et al.* 2005). Cette signature protéique semble être spécifique car elle n'est pas retrouvée chez les patients greffés atteints de nécrose tubulaire aiguë, ni chez les patients greffés atteints d'une glomérulopathie, ni chez des patients non greffés atteints d'infection du tractus urinaire. Parmi les vingt-deux patients greffés avec une fonction rénale stable, trois présentent le même profil que les patients en rejet aigu. De plus, ils ont montré que ce profil protéique est lié à la fonction (créatinémie) et à l'histologie du greffon au cours du temps.

3.3.1.2. *Puces à ADN*

Flechner *et al.* ont étudié l'expression de l'intégralité du génome de patients transplantés rénaux qui présentent un rejet aigu prouvé par biopsie par la technique des puces à ADN. Ils ont comparé l'expression de ces gènes à celle de patients non greffés, de patients greffés avec une fonction rénale stable ainsi qu'à des patients greffés présentant une dysfonction rénale aiguë (Flechner, Kurian *et al.* 2004). L'étude a porté sur la mesure de l'expression des gènes issus du greffon et du sang. Ils ont identifié des listes gènes permettant de discriminer les patients en rejet aigu des patients avec une fonction stable et des patients présentant une dysfonction aiguë. Les tests de prédiction *leave-one-out* ont été effectués entre les patients en rejet aigus et les patients avec une fonction rénale stable. Ces tests permettent de classifier correctement de 94 à 100% des patients à partir des expériences issues de la biopsie et à 93% des patients à partir des expériences issues du sang. De même ils prédisent à 100% les patients avec une fonction rénale stable des patients en dysfonction aiguë que se soit sur les expériences issues du sang ou de la biopsie. Ces données semblent indiquer que les signatures du rejet aigu à partir du sang ou de la biopsie peuvent être utilisées pour prédire le rejet aigu. Ainsi, cette étude indique qu'il est possible de prédire un état clinique à partir d'un simple prise de sang et que cette prédiction semble aussi robuste que la prédiction à partir de la biopsie.

Sarwal *et al.* ont utilisé eux aussi des puces à ADN afin de caractériser l'expression des gènes des biopsies rénales chez des patients en rejet aigu en comparaison à des patients présentant une néphrotoxicité due aux immunosuppresseurs, à des patients présentant une néphropathie chronique et à des patients normaux. Ils ont identifié quatre groupements de gènes spécifiques de chaque catégorie clinique (Sarwal, Chua *et al.* 2003). Grâce à une

classification non-supervisée, ils ont pu déterminer trois sous groupes distincts parmi les patients en rejet aigu sur la base de l'expression de leurs gènes alors qu'aucune différence n'est observée en immunohistochimie. Cette étude montre qu'il est possible d'identifier des modifications transcriptionnelles alors qu'aucune différence histologie n'est observée permettant un suivi personnalisé de chaque patient.

3.3.2. Biomarqueurs et rejet chronique

3.3.2.1. Spectrométrie de masse

Plusieurs études ont été menées sur la détection de biomarqueurs chez des patients en rejet chronique *via* l'utilisation du SELDI-TOF-MS. Ces équipes ont identifiés plusieurs pics protéiques urinaires comme étant de potentiels biomarqueurs (Clarke, Silverman *et al.* 2003; Reichelt, Muller *et al.* 2006). Cependant, même si ces biomarqueurs semblent être prédictifs, l'identité de ces protéines urinaires n'a toujours pas été montré rendant difficile la validation de ces résultats.

3.3.2.2. Puces à ADN

Mas *et al.* ont identifié un groupe de gènes différentiellement exprimés entre onze patients ayant reçu une greffe rénale présentant des signes de néphropathie chronique et sept patients greffés avec une histologie normale par l'utilisation de la technologie des puces à ADN. Cette signature transcriptionnelle de la biopsie permet une bonne discrimination des deux groupes de patients (Mas, Maluf *et al.* 2007). Ils ont mesuré l'expression de trois de ces gènes par PCR en temps réel à partir de la biopsie et du sang de ces patients. Ils n'ont pas retrouvé de différences significatives de ces trois gènes dans le sang alors que ces différences sont retrouvées dans la biopsie. Ils en concluent que le sang ne reflète pas les changements observés dans le greffon. Cependant, il est à noter que les gènes identifiés sont issus des expériences menées à partir du greffon. Il est donc logique que ces différences ne soient pas observées dans le sang.

Donauer *et al.* ont comparé l'expression des gènes issus de biopsies rénales de patients présentant des signes de rejet chronique à des patients greffés présentant des signes de polykystoses et à des patients non greffés. Ils ont déterminé une liste de gènes permettant

de discriminer, par une classification hiérarchique non-supervisée, tous les patients avec une histologie normale d'un côté et les patients en rejet chronique et les patients en polykystose de l'autre (Donauer, Rumberger *et al.* 2003). Par la suite, ils ont recherché des gènes permettant de discriminer les patients avec des reins polykystiques des patients en rejet chronique. Ils ont obtenus une liste de quarante-huit gènes spécifique du rejet chronique. De plus, cette liste de gène a mis en évidence deux groupes distincts parmi les patients en rejet chronique alors qu'aucune différence histologique ou clinique n'a été mise en évidence.

Scherer *et al.* ont identifié par la technologie des puces à ADN dix gènes permettant de prédire à six mois l'évolution clinique à douze mois de patients greffés rénaux (Scherer, Krause *et al.* 2003). Ils ont mesuré l'expression des gènes à partir de biopsies rénales chez dix-sept patients. Sur ces dix-sept patients, neuf ont été diagnostiqués comme ayant un rejet chronique et huit comme ayant une histologie normale. Ces dix gènes permettent de prédire quinze des dix-sept patients dans la bonne classe. De plus, l'un d'entre eux a été identifiés comme rejet chronique sur le base de l'expression des dix gènes alors que l'histologie était normale à douze mois. Ce patient a par la suite développé un rejet chronique à dix-huit mois. Cette étude montre donc, qu'il est possible de prédire précocement le devenir des patients suite à une transplantation rénale grâce à la technique des puces à ADN.

3.3.3. Biomarqueurs et tolérance « opérationnelle »

Comme nous l'avons vu auparavant, les biomarqueurs doivent discriminer la 'pathologie' d'un état de référence (*e.g.* état sain ou « normal »). Ceci pose un problème dans le cas des patients « opérationnellement » tolérants, dans le sens où l'état « normal » n'est pas forcément un individu sain car celui-ci n'a pas reçu de transplantation, ni un patients qui possède une fonction du transplant stable et un infiltrat normal du greffon mais sous traitement immunosuppresseur chronique.

Les biomarqueurs doivent aussi permettre de suivre la stabilité de l'état de tolérance. En effet, ils doivent être capables de prédire précocement si l'état de tolérance d'un patient risque de se détériorer. Ceci est fondamental étant donné que l'état de tolérance observée jusqu'à l'heure actuelle chez les animaux ainsi que chez l'Homme est connue pour être métastable (Knechtle and Burlingham 2004). En effet, des exemples où l'état de tolérance s'est arrêté après une longue période ont été décrits chez les primates non-humains (Torrealba, Katayama *et al.* 2004) et chez l'Homme (Burlingham, Jankowska-Gan *et al.* 2000;

Roussey-Kesler, Giral *et al.* 2006). La perte de cet état de tolérance n'est pas forcément un évènement graduel parce qu'un cas de rejet aigu a été rapporté sept ans après l'arrêt total du traitement immunosuppresseur chez un patient transplanté rénal (Burlingham, Jankowska-Gan *et al.* 2000).

Étant donné qu'aucune étude menée sur les patients « opérationnellement » tolérants suite à une transplantation rénale n'a permis d'identifier des marqueurs prédictifs fiables, nous avons utilisé la technologie des puces à ADN afin de déterminer une liste de gènes permettant de discriminer ces patients « opérationnellement » tolérants des patients en rejet chronique et des individus sains à partir du sang périphérique. L'intérêt majeur d'une telle signature est de pouvoir explorer la possibilité que des patients greffés rénaux sous traitement immunosuppresseur avec une fonction rénale stable aient le même profil que les patients « opérationnellement » tolérants.

4. Contexte méthodologique des puces à ADN

4.1 Introduction

L'objectif de cette partie n'est pas de dresser une liste exhaustive des différentes méthodologies qui sont en constante évolution, mais plutôt de mettre en évidence les étapes essentielles de la conception et de l'utilisation des puces à ADN.

4.1.1 Historique

Les premières puces à ADN sont apparues en 1993, mais leur concept date de 1987 (Bellis and Casellas 1997). La technologie des puces à ADN est basée sur le principe d'hybridation développé par Southern (Southern 1974). Ce principe stipule que deux fragments d'acides nucléiques complémentaires peuvent s'associer et se dissocier de façon réversible sous l'action de la chaleur et de la concentration saline du milieu. On peut considérer que la technologie des puces à ADN est une miniaturisation du système classique de *dot blot* inversé qui a vu le jour grâce à une technologie pluridisciplinaire intégrant l'électronique (technique de dépôt), la chimie (préparation des lames et dépôt des sondes oligonucléotides), l'analyse d'images (acquisition des données) et l'informatique

(interprétation des données). Depuis leur apparition, les puces à ADN suscitent un intérêt inversement proportionnel à leur taille, avec pour preuve l'explosion du nombre de publications qui leur sont dédiées depuis 2001 (Figure 2).

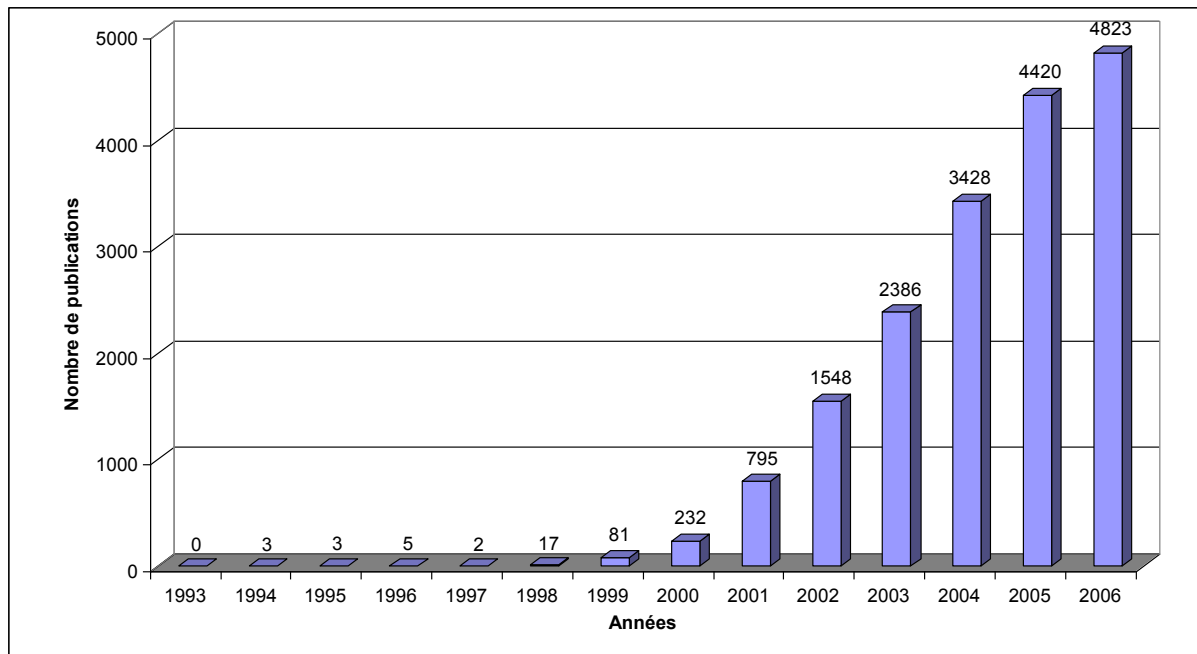


Figure 2 : Nombre de publications concernant les puces à ADN de 1993 à 2006.

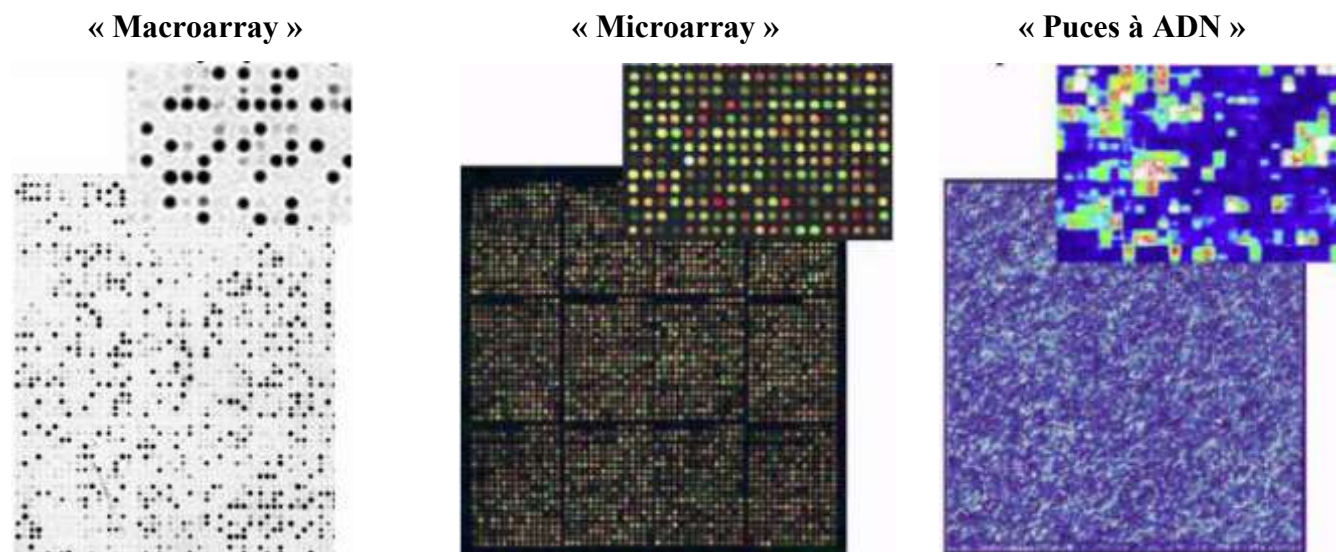
(d'après la base Entrez-PubMed¹, mot clef : *microarray*)

Historiquement, les *macroarrays*, les *microarrays* et les « véritables » puces à ADN correspondent à trois technologies différentes (Lagoda and Regad 2000). Les *macroarrays* utilisent des clones d'ADN complémentaires (ADNc) disposés sur des membranes de nylon (avec un espacement de l'ordre du millimètre) en association avec des cibles radioactives (Gress, Hoheisel *et al.* 1992; Nguyen, Rocha *et al.* 1995). Les *microarrays*, plus miniaturisées, comportent quelques milliers de gènes représentés par des produits PCR (*Polymerase Chain Reaction*) déposés tous les 200 à 400 microns sur une lame de verre et des cibles marquées par fluorescence (Schena, Shalon *et al.* 1995). Enfin, les « véritables » puces à ADN associent à chacun des gènes d'un organisme un ensemble d'oligonucléotides synthétisés *in situ* (Lockhart, Dong *et al.* 1996) (Tableau 1).

Aujourd'hui, ces trois distinctions n'ont plus vraiment lieu d'être, d'autant plus que ces techniques sont utilisées de façon croisée. Les terminologies « puces à ADN » et « *microarray* » sont donc employées de façon indifférente.

¹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez/>

Tableau 1 : Exemples de technologies de puces à ADN.



Support	Membrane de nylon	Verre ou silice avec revêtement chimique	Verre avec revêtement chimique
Densité	Quelques centaines de spots/cm ²	1000-10000 spots/cm ²	~ 250000 spots/cm ²
Sonde	ADNc	ADNc ou oligonucléotides	Oligonucléotides (synthèse <i>in situ</i>)
Longueur de la sonde (nucléotides)	100 à 1000	ADNc : 100 à 1000 Oligonucléotides : 30 à 70	25 à 60
Cibles	ADNc	ADNc ou ARN amplifié	ARN amplifié
Marquage de l'échantillon	Radioactivité (³³ P)	Fluorescence double (Cyanines 3 et 5)	Fluorescence simple (biotine-streptavidine)
Quantité d'échantillon (µg)	1 à 100	10 à 100	0,05 à 5
Sensibilité	+++	++	++
Spécificité	++	+++	+++
Principales applications	Niveau d'expression des gènes.	Niveau d'expression des gènes, ChIP-Chip, CGH-array...	Niveau d'expression des gènes, étude des polymorphismes.

4.1.2 Principe des puces à ADN et analyse du transcriptome

L'idée conceptuelle de la puce à ADN est très simple. Il s'agit de déposer sur une surface de quelques centimètres carrés des fragments synthétiques d'ADN (sondes) espacés de quelques micromètres et représentatifs de chacun des gènes étudiés. Ce micro-dispositif est ensuite mis au contact des acides nucléiques à analyser au cours de l'étape d'hybridation. Ces acides nucléiques, appelés cibles, correspondent aux ARN messagers (ARNm) ou aux ADNc qui ont été préalablement couplés à un marqueur fluorescent. Ce contact entre cibles et sondes conduit à la formation d'hybrides quantifiés grâce à la lecture des signaux fluorescents.

En ce qui concerne la terminologie associée à la technique des puces à ADN, il est important de rappeler que les puces ne sont qu'un *northern blotting* inversé, où la sonde est fixe alors que la cible marquée est en solution. Cependant cette différence est à l'origine d'une confusion entre les termes « cible » (*probe*) et « sonde » (*target*). Une nomenclature a donc été recommandée (Phimister 1999) et semble aujourd'hui bien respectée.

Pour l'ensemble des puces qui sont le plus couramment utilisées, l'étude du niveau d'expression des gènes est basée sur la détermination des variations de niveau d'expression entre deux conditions différentes. Il s'agit donc d'une mesure différentielle de l'expression des gènes. En pratique, pour réaliser cette mesure, les cibles constituant les deux échantillons de l'étude sont marquées au moyen de deux fluorochromes différents. Elles sont ensuite mélangées et hybridées sur la puce (Figure 3). Après hybridation, la mesure des intensités des signaux de fluorescence relatifs à chacun des fluorochromes permet finalement de calculer pour chaque gène, le rapport des intensités, qui évalue son expression différentielle.

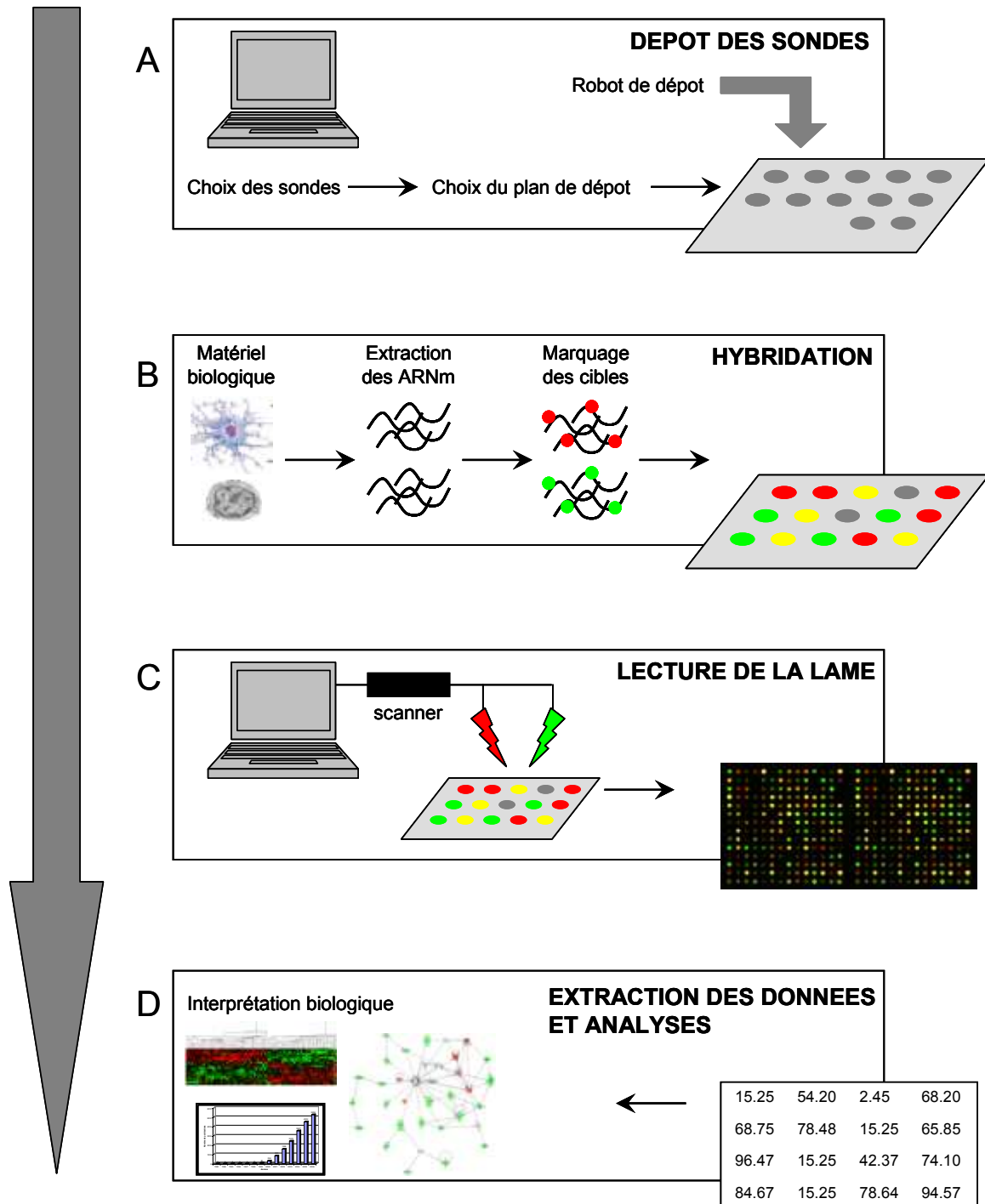


Figure 3 : Principe de la technologie des puces à ADN.

(A) Les séquences des sondes sont déterminées de façon à optimiser leur spécificité et leur sensibilité. Les sondes synthétisées sont déposées par un robot sur la surface de la lame selon un plan défini. (B) Les ARNm sont extraits des échantillons biologiques à comparer, marqués avec deux fluorochromes différents puis mélangés avant hybridation. (C) La lecture des lame est réalisée avec un scanner (microscope à fluorescence) couplé à un photomultiplicateur (PMT). (D) L'image est alors analysée de façon à quantifier le signal. Les données sont ensuite normalisées, analysées et interprétées.

4.2 Hybridation des puces à ADN

Les nombreuses étapes de la technologie des puces à ADN sont à l'origine d'une variabilité expérimentale qui peut affecter la qualité des résultats (Nadon and Shoemaker 2002) et qu'il est essentiel de prendre en compte (Leung and Cavalieri 2003).

4.2.1 Préparation des échantillons

La préparation des échantillons biologiques est une étape critique. Les choix effectués au cours de cette étape et la mise en place de protocoles complexes sont responsables d'une variabilité à la fois biologique et expérimentale qui est rarement discutée dans les publications (Ji and Davis 2006).

Les conditions d'extractions des échantillons se révèlent être une étape cruciale. En effet, l'ARNm est une molécule relativement instable et les demi-vies des différents transcrits se révèlent extrêmement variables. En plus de cette instabilité, le stress de l'extraction conduit à des perturbations comme la synthèse de protéines de choc thermique ou bien l'activation des lipopolysaccharides, qui induit une modification rapide des profils d'expression des transcrits. Malgré la mise en place de protocoles d'extractions standardisés et reproductibles, il existe toujours une part de variabilité expérimentale qui doit être prise en compte.

Outre le fait que le matériel biologique de départ est très souvent hétérogène, la quantité de transcrits nécessaire à l'étude est un facteur limitant. Dans ce cas, il est alors nécessaire de réaliser une étape d'amplification des ARNm (Wang, Miller *et al.* 2000). Cette étape peut induire des biais très importants liés à des phénomènes d'amplifications sélectives. Cependant, de nouvelles techniques d'amplifications sont développées afin de respecter au mieux les quantités relatives de transcrits de tailles différentes dans l'échantillon de départ et ainsi limiter les biais induits par d'éventuelles amplifications sélectives (Iscove, Barbara *et al.* 2002).

4.2.2 Marquage

Le principe général du marquage est le même pour les ADNc et les ARN amplifiés (ARNa). Il existe deux méthodes d'incorporation des colorants fluorescents : une

incorporation directe et indirecte. Lors de l'incorporation dite directe, la transcription inverse est réalisée en ajoutant des nucléotides couplés à un fluorochrome dont les plus couramment utilisés sont les carbocyanines 3 et 5. Cependant, ces nucléotides modifiés ne sont pas les substrats naturels des transcriptases réverses et leur encombrement stérique est tel que l'efficacité de l'incorporation est assez faible et inégale entre les cyanines 3 et 5 (Cy3 et Cy5). Ainsi, la méthode d'incorporation indirecte est plus largement préférable à l'incorporation directe. Dans cette méthode, des nucléotides portant un groupement amine réactif, l'aminallyl dUTP (aadUTP), sont incorporés lors de la transcription réverse. Ceux-ci sont couplés dans un deuxième temps à des N-hydroxysuccinimidyl esters (NHS-esters) de cyanine 3 ou 5 (Randolph and Waggoner 1997). L'efficacité de l'incorporation des aadUTP est nettement supérieure et permet d'éviter les biais d'incorporation dus aux spécificités de chaque fluorochrome.

4.2.3 Hybridation

Les méthodes d'hybridation sont dérivées de méthodes classiquement utilisées dans les études de Southern et Northern blots. Les cibles sont placées dans un tampon de force ionique élevée (*e.g.* SSC) afin de réduire les répulsions électrostatiques et faciliter l'appariement des brins complémentaires. Des détergents (*e.g.* SDS) et des agents bloquants (*e.g.* ARN de levure) permettant de réduire l'hybridation non spécifique sont ajoutés pour réduire le bruit de fond. La solution-cible est déposée au contact de la puce et recouverte d'une lamelle. L'ensemble est placé plusieurs heures dans un bain-marie. Enfin, des étapes de lavages sont nécessaires afin d'éliminer de la surface de la puce les cibles non hybridées. Le choix des conditions de lavages est important afin d'optimiser le rapport entre signal et bruit de fond.

4.3 Acquisition des données

4.3.1 Acquisition des images

La première étape du processus d'acquisition des données est l'obtention des images. Elle consiste à détecter la fluorescence émise par les cibles après excitation des

fluorophores. Le procédé le plus classiquement utilisé combine un laser afin d'exciter les fluorophores et un microscope confocal (ou scanner) couplé à un tube photomultiplicateur (PMT) pour analyser les photons émis par les cibles. Les canaux de lecture correspondant aux longueurs d'onde 633 et 532 nm sont utilisés pour lire respectivement la fluorescence de la Cy5 et celle de la Cy3. Le signal pour chaque fluorophore est mesuré par la somme des intensités des pixels du spot. Cette valeur représente la quantité totale de cibles hybridées sur les sondes.

Cette étape permet finalement de générer une image 16-bit pour chaque fluorophore. Ceux deux images, en niveau de gris, représentent les intensités de fluorescence lues par le scanner qui reflètent le niveau d'expression des gènes dans les deux conditions expérimentales. Elles sont souvent représentées en fausses couleurs. Le vert sert ainsi à caractériser l'échantillon marqué en Cy3, le rouge est réservé au Cy5 et le jaune permet d'indiquer que les cibles marquées en Cy3 et en Cy5 se sont hybridées en proportion égale sur le spot.

4.3.2 Analyse des images

L'analyse des deux images obtenues a pour but de mesurer pour chacun des spots la quantité de transcrits hybridés. Elle permet également d'estimer le bruit de fond de l'image. La première partie de l'analyse est la localisation des spots qui permet de préciser les coordonnées de chaque spot sur l'image. Etant donné qu'en règle générale la technique de dépôt des sondes est fiable, il suffit de positionner la grille en respectant le plan des sondes et les caractéristiques du robot qui les a déposées.

La seconde partie de l'analyse permet d'attribuer une valeur numérique qui détermine le signal ou le bruit de fond dans le voisinage de chacun des spots identifiés précédemment. Une méthode simple consiste à définir un cercle caractérisant le spot. Ce cercle peut être ensuite ajusté pour chaque spot, comme le fait le logiciel *GenePix Pro* (Axon Instruments, Union City, CA, USA). Le logiciel *GenePix* génère des valeurs numériques correspondants aux valeurs moyennes et médianes du signal et du bruit de fond local (Figure 4) ainsi que divers autres paramètres (l'écart-type associés aux intensités des pixels d'un spot, le rapport signal/bruit de fond...).

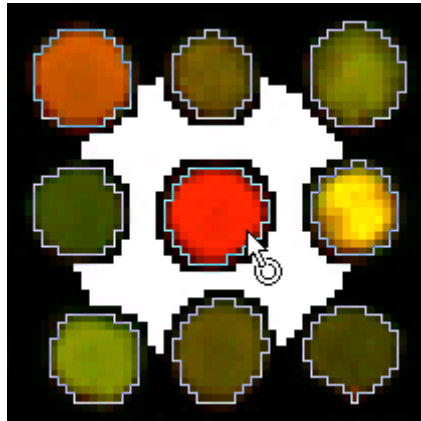


Figure 4 : Principe du calcul par *GenePix*.

Les mesures du signal des spots (zones colorées à l'intérieur du cercle) et du bruit de fond (représenté ici en blanc) sont déterminées par le logiciel automatiquement. Une région d'exclusion localisée entre les zones correspondant au signal et au bruit de fond n'est pas prise en compte dans le calcul des intensités (d'après le manuel d'utilisation *GenePix Pro*).

4.4 Transformation des données

Le rapport des intensités de fluorescence est généralement utilisé comme mesure du rapport des concentrations en ARNm ou en ARNa des échantillons testés. Cependant, le rapport d'intensités est influencé par des effets systématiques qui peuvent introduire des biais et qu'il est donc nécessaire d'éliminer avant de pouvoir tirer des conclusions sur le niveau relatif de l'expression des gènes.

Le processus de traitement des données de ces effets systématiques peut être décomposé en trois étapes qui sont la filtration, la normalisation des données et la détection des valeurs aberrantes. Ainsi, nous avons utilisé un outil développé par la plateforme Puces à ADN de Nantes nommé MADSCAN² (Le Meur, Lamirault *et al.* 2004) (*MicroArray Data Suite of Computed Analysis*) qui permet de transformer les données brutes issues des puces à ADN.

² <http://cardioserve.nantes.inserm.fr/mad/madscan/>

4.4.1 Notation et représentation des données

L'analyse des données de puces à ADN implique l'utilisation d'une notation simplifiée des valeurs d'intensités. Les lettres R (*red*) et G (*green*) servent généralement de références respectives aux fluorophores Cy5 et Cy3. Pour un spot donné, les médianes des intensités des pixels du signal sont notées R_f et G_f et celles des pixels du bruit de fond R_b et G_b . Les valeurs obtenues après correction du bruit de fond sont notées R et G.

La représentation graphique la plus simple des données consiste à placer les valeurs G en abscisses et R en ordonnées. Cependant, les données d'intensités sont rarement utilisées sans transformation. La plus couramment employée est celle qui utilise le logarithme en base deux. Il existe plusieurs raisons pour justifier cette transformation. D'une part, la variation du logarithme des intensités est moins dépendante de la grandeur des intensités et, d'autre part, cette transformation permet de se rapprocher d'une distribution symétrique et d'obtenir une meilleure dispersion avec moins de valeurs extrêmes (Dudoit, Yang *et al.* 2002; Wilson, Buckley *et al.* 2003). Dans ce cas, les rapports de fluorescence en différence et les erreurs multiplicatives en erreurs additives. La base deux du logarithme est préférée à la base dix car les intensités des pixels sont comprises entre 0 et $(2^{16}-1)$ pour le niveau de saturation. Dudoit *et al.* (Dudoit, Yang *et al.* 2002) utilisent cette transformation par un autre type de représentation dans lequel l'axe des abscisses représente la valeur A (*add*) :

$$A = \frac{1}{2} - RG$$

et l'axe des ordonnées représente la valeur M (*minus*) :

$$M = - \left(\begin{array}{c} \\ \end{array} \right)$$

A et M correspondent respectivement à l'abondance moyenne des transcrits et aux rapports des intensités dans les deux conditions de l'étude (Figure 5). Sur cette représentation, avec l'utilisation de la base deux pour la transformation logarithmique, il n'existe pas de différence d'expression entre les deux conditions pour $M = 0$ et une induction (ou une répression) d'ordre deux se lit simplement lorsque $M = 1$.

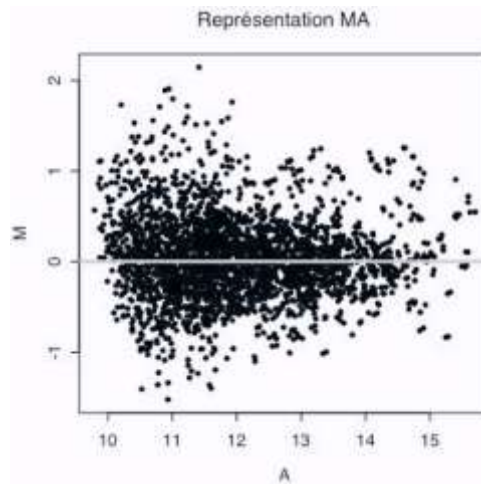


Figure 5 : Exemple de représentation MA pour l'ensemble des intensités d'une lame.

4.4.2 Filtration des données

L'étape de filtration a pour but d'éliminer les spots défectueux et d'extraire les informations relatives aux spots faiblement exprimés (*i.e.* avec une fluorescence proche du bruit de fond) ou aux spots avec des niveaux d'expression élevés (*i.e.* proche de la saturation). MADSCAN est construit sur la base d'un arbre de décision (Figure 6) permettant d'attribuer un score à chacun des spots en fonction de certains critères :

- marquage des spots lors de l'analyse des images par *GenePix*,
- la médiane du bruit de fond en Cy5 et en Cy3 (Rb et Gb),
- la médiane du ratio signal/bruit de fond pour chaque canal (R ou G) (Eq.1),
- le coefficient de variation de l'intensité des signaux en Cy3 et Cy5 (CV) (Eq. 2),
- la moyenne du diamètre des spots (Dia.),
- la déviation standard du diamètre (Dia. SD).

$$R(G) = \frac{\text{Médiane (Gf)} - \text{Rb(Gb)}}{\text{Déviation Standard Rb (Gb)}} \quad \text{Eq. 1}$$

$$CV = \frac{\text{Déviation Standard Rf (Gf)}}{\text{Moyenne (Rf (Gf) - Rb (Gb))}} \quad \text{Eq. 2}$$

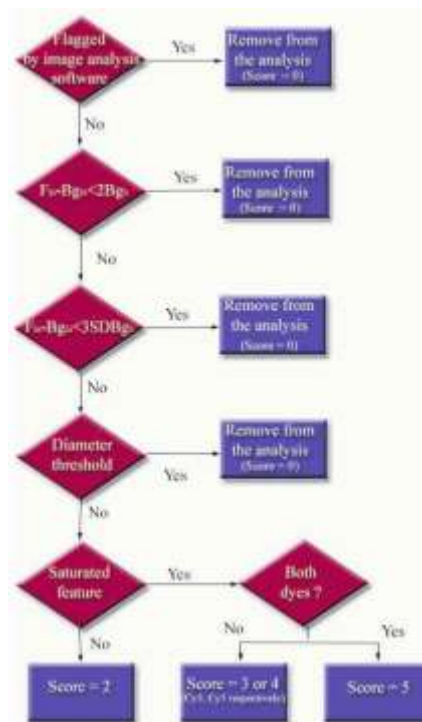


Figure 6 : Arbre de décision de MADSCAN pour la filtration des données.

Les gènes qui ont une qualité trop faible (score = 0) sont éliminés de l'analyse. Par la suite, MADSCAN ne retient que les gènes dont le signal est au moins deux fois supérieur à la médiane de l'intensité du bruit de fond et/ou trois fois supérieur à la déviation standard de la médiane de l'intensité du bruit de fond. De plus, les gènes dont le diamètre du spot est faible sont aussi écartés de l'analyse.

4.4.3 Normalisation des données

Le but de la normalisation est de minimiser les biais expérimentaux systématiques. Ainsi, les variations observées ne seraient dues qu'aux différences biologiques plutôt qu'aux artefacts de la technologie.

4.4.3.1 Méthode des gènes invariants

Les méthodes classiques de normalisation basées sur l'intensité des gènes 'invariants' (dits de ménage) semblent créer des biais échantillons-spécifiques (Yang, Dudoit *et al.* 2002). Il semble plus pertinent d'utiliser des gènes invariants non connus *a priori*. Cette méthode reprise par Tseng *et al.* est basée sur l'étude des rangs des intensités de fluorescence

R et G (Tseng, Oh *et al.* 2001). Un gène est considéré comme invariant si ses rangs sont égaux pour les deux fluorochromes. MADSCAN utilise cette méthode où les gènes invariants sont sélectionnés *a posteriori* i.e. après la filtration des données brutes. Ces gènes ainsi sélectionnés sont ainsi utilisés pour terminer l'étape de normalisation (Figure 7).

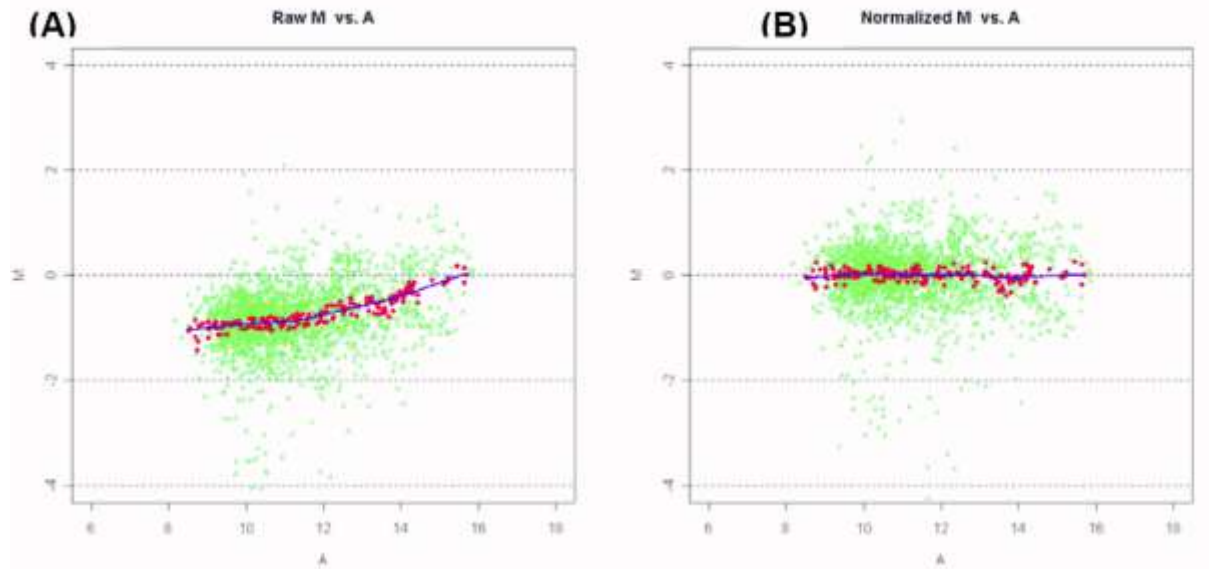


Figure 7 : Sélection des gènes invariants et normalisation.

Les gènes invariants sont estimés *a posteriori* par la méthode des rangs invariants. (A) Représentation des gènes invariants (points rouges) parmi les données brutes. (B) Représentation des données normalisées basées sur les gènes invariants (d'après le tutorial de MADSCAN).

4.4.3.2 Normalisation spatiale

La normalisation spatiale a pour but de corriger les biais issus de la répartition spatiale des fluorochromes. Une normalisation unique sur la lame présume d'une erreur systématique et uniforme sur toute la puce. Cependant, le déséquilibre des intensités R et G ne sont pas constantes sur la puce et peut varier selon l'intensité globale des spots, la localisation sur la lame, l'origine de la puce... (Yang, Buckley *et al.* 2001).

4.4.3.3 Normalisation par méthode Lowess

La méthode *Lowess* passe par une approche de normalisation dépendante de l'intensité A pour chaque gène (g) : $M_g' = M_g - c_g(A)$. Cette méthode permet de prendre en compte la non-linéarité de la relation qui existe entre R et G . La fonction $C_g(A)$ est estimée à l'aide d'une méthode de régression non linéaire (Cleveland 1979).

4.4.3.4 Réajustement (scaling)

Le réajustement (*scaling*) permet de ramener la variance interne au sein d'une lame ou entre lames dans la même gamme. Ceci permet de pouvoir comparer les lames issues d'une même expérience entre elles. La visualisation en boîtes à moustaches (*box plot*) permet de visualiser l'étendue de la variance avant et après le réajustement (Figure 8). L'utilisation de la déviation absolue de la médiane (MAD : *median absolute deviation*) et de la moyenne géométrique afin de réaliser le réajustement semble être plus pertinent que l'utilisation de la déviation standard usuelle (Yang, Buckley *et al.* 2001).

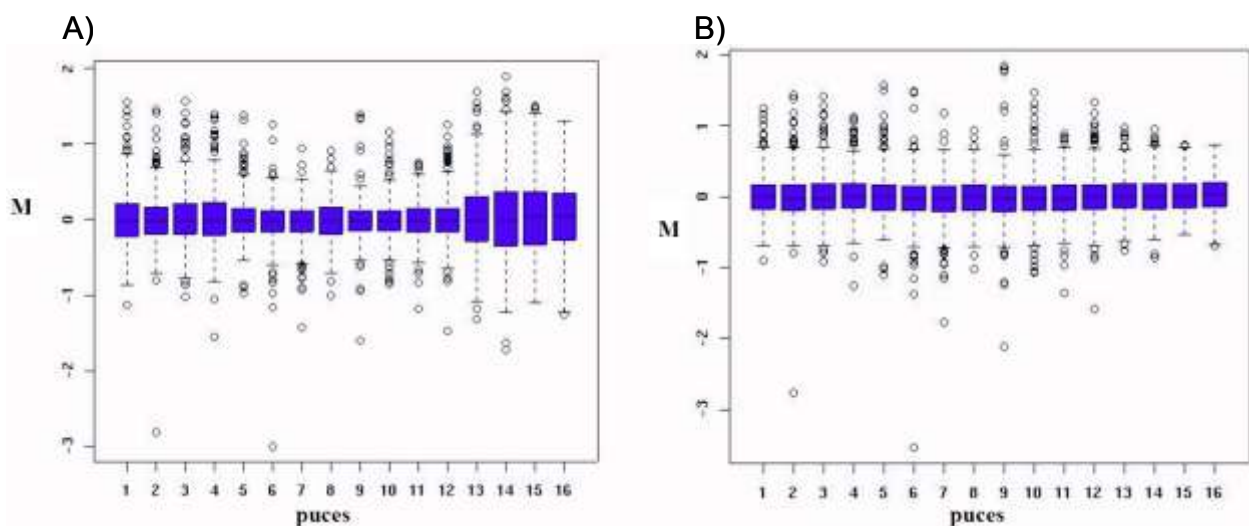


Figure 8 : intérêt du réajustement.

A) Avant le réajustement : seize puces identiques ont été normalisées (médiane proche de zéro) mais ont des variances différentes. B) Après le réajustement : Les variances intra-lames sont équivalentes c'est-à-dire que la déviation médiane absolue est réduite au même niveau.

4.4.4 Elimination des valeurs aberrantes

Une valeur aberrante (*outlier*) est un point ‘suspect’ en termes de distance relative à la moyenne des valeurs (Figure 9). MADSCAN utilise la méthode MAD décrite précédemment. La détection par la déviation absolue de la médiane est plus robuste que la déviation standard habituellement utilisée pour le z-test. Le test MAD est un z-test modifié :

$$MAD = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |x_i - \tilde{x}|$$

$$z = \frac{0.675 \cdot x_i - \tilde{x}}{MAD}$$

Si $z_i \geq 3.5$, alors x_i est une valeur aberrante.

Les points reconnus par MADSCAN comme étant des valeurs aberrantes sont éliminés de l’analyse.

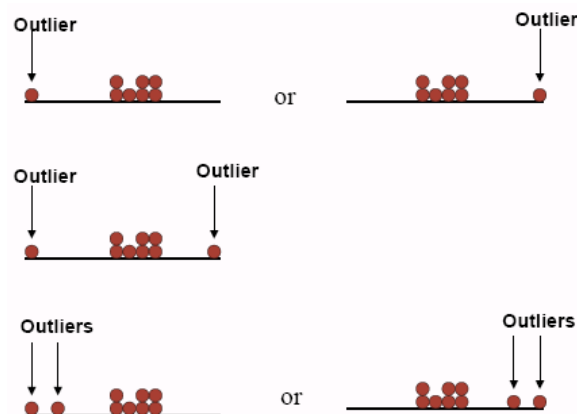


Figure 9 : Exemple d'*outliers*.

(tiré du manuel d’utilisation de MADSCAN (Le Meur, Lamirault *et al.* 2004))

4.5. Analyses des résultats

4.5.1 Stockage des données

La masse de données générées par les expériences de puces à ADN est considérable. Par exemple, une seule lame génère plusieurs valeurs numériques sur chacun des oligonucléotides présents sur la puce (intensités moyennes et médianes de chacun des

fluorophore, intensité du bruit de fond, estimation de l'erreur standard associée...). De plus, des dizaines voire des centaines de lames sont parfois nécessaires (ce qui a été le cas dans mon travail) pour pouvoir réaliser l'étude (e.g. réplicats techniques). Il est donc facile de comprendre l'intérêt de la gestion des données issues des études transcriptomiques. Plusieurs types de données doivent être stockés de manière accessible tout au long du projet :

- Les informations relatives aux expériences. Il est important de répertorier toutes les données issues des expériences pour le contrôle qualité : extractions, amplifications, marquages, hybridations des échantillons...
- Les images TIFF originelles, acquises par le scanner. Il est indispensable de conserver ces fichiers pour pouvoir revenir aux données initiales. Cependant, l'inconvénient est que ces fichiers ont une taille assez importante (21 Mo par fluorophore, soit 42 Mo par lame).
- Les tableaux de données brutes et normalisées. Les données numériques avant et après transformations (filtration, normalisation, traitement statistiques...) doivent être disponibles.

Nous avons utilisé une base de données disponible en ligne sur internet : BASE (*BioArray Software Environment*). BASE permet de stocker les fichiers de résultats issus de nos expériences et de les lier à divers paramètres expérimentaux, de protocoles et de fabrications des lames. Elle dispose d'un système de requête et de filtrage efficace afin de rechercher rapidement les informations voulues.

4.5.2. Détection des gènes différentiellement exprimés

Si deux conditions sont appelées 1 et 2 pour les N gènes de l'étude, le niveau d'expression du gène g dans chacune des deux conditions est appelé μ_{g1} et μ_{g2} . L'hypothèse que le gène n'est pas différentiellement exprimé dans les deux conditions est appelée $H_{0,g}$ et l'hypothèse alternative $H_{1,g}$. Ces hypothèses peuvent s'écrire de la façon suivante pour les deux conditions :

$$H_{0,g} \Leftrightarrow \mu_{g1} = \mu_{g2}$$

$$H_{1,g} \Leftrightarrow \mu_{g1} \neq \mu_{g2}$$

Pour identifier l'ensemble des gènes qui sont exprimés différentiellement, il suffit alors de réaliser les tests d'hypothèses pour chacun des N gènes et de conserver les gènes pour lesquels l'hypothèse nulle est rejetée.

La sélection des gènes différentiellement exprimés nécessite le choix approprié d'un test statistique qui permette l'identification des gènes en fonction d'un seuil de significativité.

La réalisation d'un test t de Student pour chaque gène peut être envisagée car elle n'impose pas une homogénéité des variances. Cependant, il est essentiel de ne pas oublier que la réalisation d'un nombre élevé de tests nécessite de prendre en compte les problèmes spécifiques de tests multiples (cf. § 4.5.3.). Ainsi, la puissance de ce test dans les expériences de puces à ADN diminue drastiquement.

Ainsi, pour pallier le problème lié à l'estimation et leurs fluctuations des petites variances, des variantes du test t ont été développées. C'est le cas du logiciel SAM³ (*Significance Analysis of Microarray*) connu aussi sous le nom du test S (Tusher, Tibshirani *et al.* 2001). SAM introduit une constante positive a (correspondant au quatre-vingt dixième percentile de la distribution des écarts-types de tous les gènes) au niveau du dénominateur du test t classique :

$$t_{SAM} = \frac{\bar{v} - \bar{v}_0}{\sigma_{\bar{v}} + a}$$

Le numérateur correspond à la différence des moyennes des niveaux d'expression dans les deux conditions et le dénominateur représente l'écart-type estimé de la différence des moyennes plus la constante a .

La méthode de SAMROC a été développée à partir de la méthode de SAM. Comme cette dernière, elle rajoute une constante positive avec la variance afin d'éviter la surestimation des variances. Cette constante est calculée en minimisant le nombre de gènes qui sont faussement déclarés positifs et ceux faussement déclarés négatifs à l'aide de la courbe ROC (*Receiver Operating Characteristics*) :

$$t_{SAMROC} = \frac{\bar{v} - \bar{v}_0}{\sigma_{\bar{v}} + b}$$

Le choix de b se fait en prenant la tangente de la courbe de ROC parallèle à la droite nulle, dite « Null line », qui détermine qu'il y a autant de sensibilité que de spécificité. La courbe ROC compare le taux de faux-positifs et le taux de faux-négatifs des gènes. Ceci permet de minimiser le nombre de gènes faux-positifs et faux-négatifs pour un niveau de

³ <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/SAM/>

sensibilité α et une constante b données (Figure 10). Cependant, ces tests restent soumis aux problématiques de tests multiples.

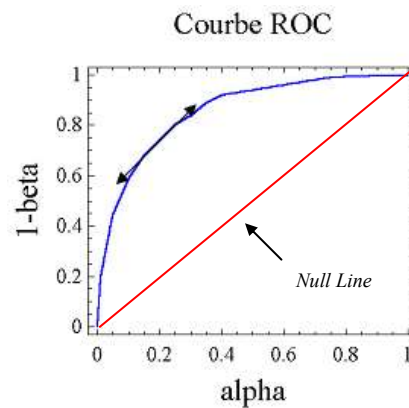


Figure 10 : Courbe de ROC.

4.5.3. Choix du seuil de significativité

Le nombre important d'hypothèses à tester simultanément sur les données de puces à ADN implique l'étude des deux erreurs associées aux tests multiples. La première erreur est l'erreur *FWER* (*Family Wise Error Rate*) qui correspond à la probabilité de rejeter au moins une hypothèse nulle alors qu'elles sont toutes vraies. Il s'agit de l'équivalent de l'erreur de première espèce α associée à un test simple. La probabilité de commettre l'erreur *FWER* augmente de façon dramatique avec le nombre N de tests. Le second type d'erreur est l'erreur *FDR* (*False Discovery Rate*) introduite par Benjamini et Hochberg. Cette erreur correspond à la proportion d'hypothèses qui sont rejetées à tort.

4.5.3.1. Erreur FWER

La méthode de correction de Bonferroni (Bland and Altman 1995) est la méthode la plus connue pour le calcul des probabilités ajustées. La probabilité ajustée est la probabilité obtenue pour un test simple dont l'erreur de première espèce est fixée à α/N . Cette méthode présente le désavantage d'être difficilement applicable lorsque le nombre de tests est supérieur à dix et lorsqu'il existe des corrélations entre les statistiques de test. Cette méthode est donc beaucoup trop conservatrice pour les milliers de tests liés aux expériences de puces (Satagopan and Panageas 2003). Par ailleurs, il existe une corrélation forte entre les tests

statistiques qui est liée à la co-régulation des gènes et à une dépendance des erreurs de mesures des niveaux d'expression.

4.5.3.2. Erreur FDR

Les méthodes contrôlant l'erreur *FWER* sont trop conservatrices pour des applications où peu de gènes sont différentiellement exprimés. Reiner *et al.* ont développé une méthode de contrôle du *FDR*, c'est-à-dire de la proportion de faux positifs parmi les gènes attendus comme différentiellement exprimés (Reiner, Yekutieli *et al.* 2003). La plupart des méthodes visant à contrôler le *FDR* sont basées sur la procédure proposée par Benjamini et Hochberg (Benjamini and Hochberg 1995). Cette méthode est largement utilisée dans plusieurs logiciels dont SAM.

Guo *et al.* révèlent que la significativité statistique (*P*-value) d'un gène est dépendante de la méthode de normalisation, alors que le classement par différence d'expression (*fold change*) ne l'est pas (Guo, Lobenhofer *et al.* 2006). De plus, ce classement par *fold change* permet une meilleure concordance des résultats entre différents sites (Shi, Reid *et al.* 2006). Ainsi, il faut être prudent sur l'interprétation des données statistiques et favoriser l'analyse de la liste de gènes différentiellement exprimés plutôt que la mesure d'un gène unique.

4.5.4. Regroupement hiérarchique des données d'expressions

Une méthode communément utilisée pour explorer les données est le regroupement (*clustering* en anglais) des gènes présentant des profils d'expression similaires dans les expériences. Ceci permet d'établir des groupes (*clusters*) de gènes co-régulés dans les conditions étudiées sans préjuger de leur fonction. Il existe plusieurs méthodes de regroupement (décrites dans la thèse de A. Sturn : regroupement hiérarchique, *Self Organizing Maps*, *k-means clustering*, l'analyse en composante principale...) (Sturn 2001).

4.5.4.1. Classification non-supervisée

Les méthodes de classification non supervisée sont des techniques de regroupement où un processus automatique sépare les données observées en groupes distincts sans aucune connaissance préalable des classes existantes.

L'un des logiciels les plus couramment utilisé pour le regroupement hiérarchique est le logiciel Cluster⁴ (Eisen, Spellman *et al.* 1998). Les gènes sont comparés deux à deux en fonction du degré de similitude entre leurs profils d'expression. Les gènes présentant la plus faible distance entre leurs profils sont groupés sous un nœud. Le nœud est ensuite lui-même comparé à un autre gène ou un autre nœud. Ainsi, de proche en proche, les gènes sont ordonnés de manière hiérarchique dans un dendrogramme qui peut être visualisé avec le logiciel TreeView⁴ (Figure 11).

TreeView permet de visualiser les profils des gènes sous forme d'une carte d'expression colorée ou carte thermique. Chaque ligne représente un gène et chaque colonne une expérience. La valeur du logarithme du ratio est reportée en rouge lorsqu'elle est positive et en vert lorsqu'elle est négative. L'intensité de la couleur est proportionnelle à l'amplitude de la variation. La longueur des branches de l'arbre représente la distance entre chaque nœud. Différentes métriques peuvent être utilisées pour calculer la distance entre les profils, comme de coefficient de Pearson, la distance euclidienne, la covariance, la distance de Manhattan, le Kendall's tau... Le coefficient de corrélation de Pearson est le plus couramment utilisé. En effet, il permet d'évaluer le degré de similitude entre les profils de variation sans tenir compte des différences d'amplitude (Alon, Barkai *et al.* 1999).

⁴ <http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>

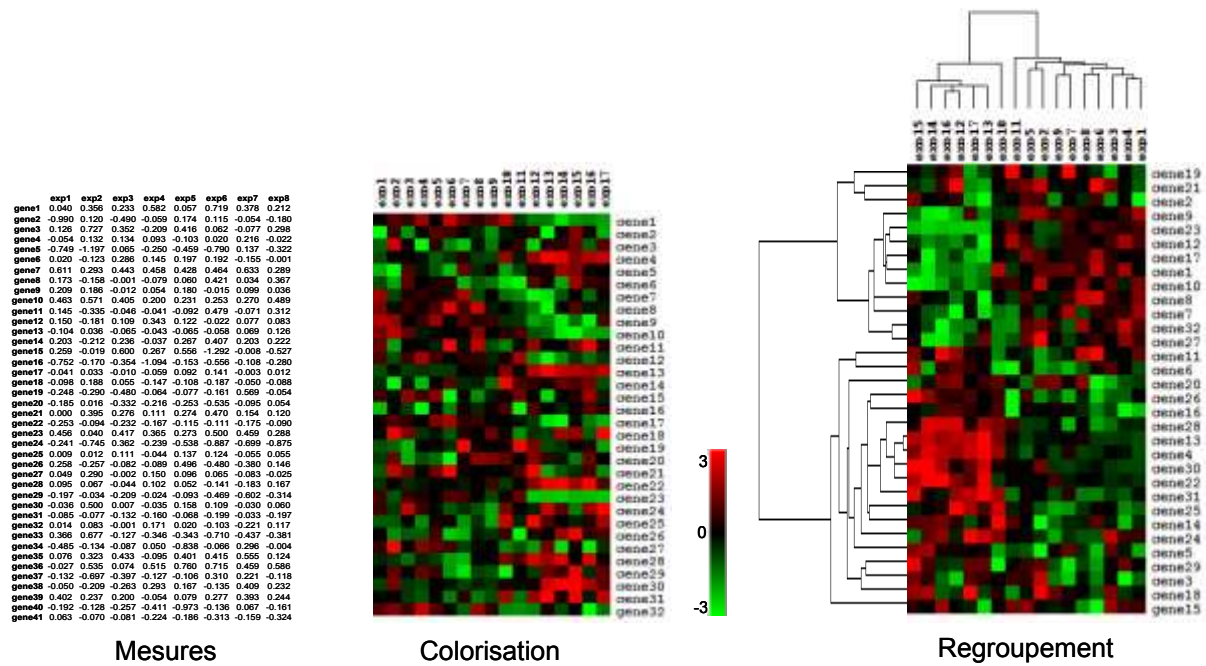


Figure 11 : Représentation graphique issue d'une analyse par classification hiérarchique.

A partir des tableaux de mesures dans lesquels chaque colonne correspond à une expérience et chaque ligne à un gène (à gauche), chaque valeur est représentée par une couleur qui est le reflet qualitatif et quantitatif du rapport des fluorescences (au centre). Les gènes dont le niveau d'expression est inchangé sont représentés en noir, ceux dont le niveau augmente en rouge et les autres en vert. Une échelle de couleur permet de quantifier les nuances de vert et de rouge. Finalement, les gènes ayant le même profil d'expression sur plusieurs expériences sont regroupés (à droite).

Une autre méthode de classification hiérarchique non-supervisée couramment utilisée est la méthode de partitionnement. Cette méthode a pour objectif de minimiser la distance intra-groupe pour un nombre fixé, K , de groupes. La méthode dite des k -moyennes (k -means), introduite en 1967 par MacQueen, est une variante des méthodes d'agréments autour de centres mobiles (techniques de ré-allocation dynamique des individus à des centres de classes eux-mêmes recalculés à chaque itération) (McQueen 1967). Le but de cet algorithme est de minimiser la distance de chaque objet (*e.g.* gènes) par rapport au centre du groupe auquel il appartient. La méthode des k -moyennes distribue les données en k groupes choisis a priori et répartis autour de k centres appelés noyaux ou centroïdes (Figure 12).

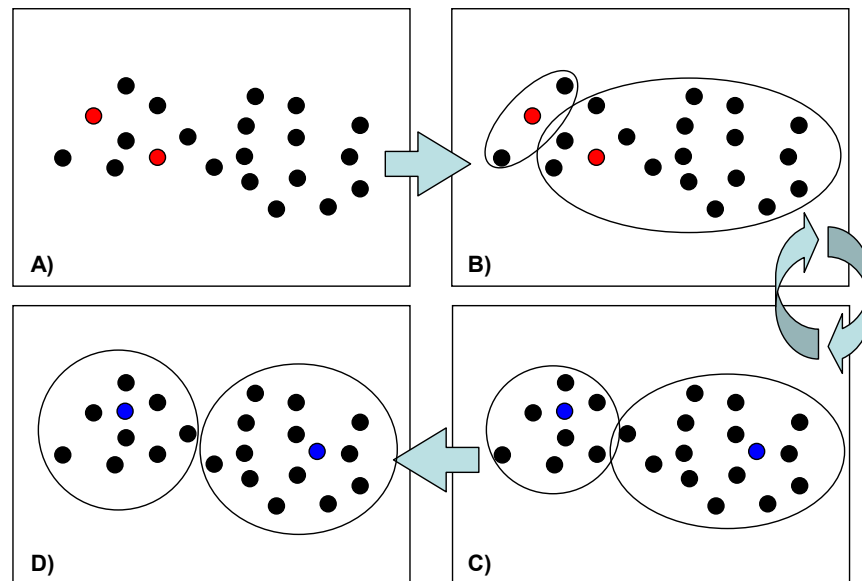


Figure 12 : Algorithme des k-moyennes.

A) Définition du nombre de classes et tirage aléatoire des centroïdes (cercle rouge). B) Allocation des gènes aux classes. C) Calcul des nouveaux centroïdes (bleu), ré-allocation des gènes de manière itérative (double flèche) jusqu'à obtention de la partition finale (D).

4.5.4.2. Classification supervisée

Les méthodes de classification supervisée utilisent de la connaissance *a priori* pour construire des classifications. Elles établissent des règles et un modèle de classification à partir d'un jeu de données connu et annoté, dit jeu d'apprentissage (*training set*), afin de prédire la classification de nouveaux cas appartenant à un jeu de données test (*test set*). Ainsi, la plupart des méthodes de classification supervisée comprennent : 1) une phase d'apprentissage sur des échantillons dont la classification est connue, et 2) une phase de test au cours de laquelle l'algorithme de classification est généralisé pour prédire la classification d'autres échantillons.

La classification par l'analyse des centroïdes (*centroid classifier*) permet une répartition rapide des données en plusieurs classes. Pour chaque classe connue, le barycentre est calculé. Ensuite, toutes les distances possibles entre l'échantillon à classer et les différents barycentres des différentes classes sont calculées. L'échantillon inconnu est alors agrégé à la classe pour laquelle la distance au barycentre est la plus faible. Cette approche possède deux inconvénients majeurs : elle est sensible aux données bruitées et sépare les données uniquement de façon linéaire. L'approche par centroïdes « rétrécis » (*shrunk centroid*) est une amélioration de l'analyse des centroïdes, développée par Tibshirani *et al.* (Tibshirani,

Hastie *et al.* 2002). Cette méthode permet de définir les jeux de gènes qui caractérisent au mieux chaque classe. Les centroïdes sont estimés à partir d'un plus petit nombre de gènes et sont donc moins bruités. La prédiction est plus précise. Cette méthode a l'avantage de pouvoir être également appliquée aux approches de classification non supervisée. En effet, elle permet, par exemple, de mettre en évidence les gènes qui contribuent le plus aux regroupements obtenus par une classification hiérarchique. Cette analyse est accessible à partir, entre autres, du logiciel PAM⁵ (*Prediction Analysis of Microarrays*).

Les analyses du transcriptome par la technologie des puces à ADN *via* les méthodes de classification permettent de classer les gènes par fonctions similaires ou par groupes de co-régulation et les échantillons par phénotype biologique identique. Cependant, elles ne permettent pas à elles seules de révéler la causalité des mécanismes de régulation (Quackenbush 2003). Aussi, l'intégration des méta-données, *i.e.* des informations issues de différentes sources contrôlées comme les ontologies, les résumés d'articles scientifiques ou les banques de données protéiques est devenue indispensable pour interpréter les données issues des expériences transcriptomiques.

4.5.5. Interprétations des données

Les gènes n'interviennent jamais seuls dans un organisme mais dans des réseaux et souvent en cascade. L'analyse des données issues des puces à ADN dans une perspective de modélisation des voies métaboliques, peut donc permettre la compréhension des systèmes vivants.

Les méta-données sont en général disponibles sous la forme de bases de données publiques. Cependant, la nomenclature des gènes reste assez disparate d'une base de données à une autre malgré les efforts du consortium HGNC⁶ (*HUGO Gene Nomenclature Committee*) afin de standardiser cette nomenclature. Ainsi, la communauté scientifique a développé des ontologies pour annoter les gènes, leurs fonctions et leurs produits. Une ontologie est un ensemble structuré de concepts permettant de donner un sens aux informations. Elle est aussi un modèle de données qui représente un ensemble de concepts dans un domaine et les rapports entre ces concepts.

⁵ <http://www-stat.stanford.edu/~tibs/PAM/>

⁶ <http://www.genenames.org/>

4.5.5.1. GO : Gene Ontology

*Gene Ontology*⁷, communément appelé GO, se compose de trois ontologies qui définissent les processus biologiques, les fonctions moléculaires et les localisations cellulaires des produits de gènes. Le processus biologique fait référence à l'objectif biologique auquel un gène ou produit de gène participe (e.g. la croissance cellulaire ou la transduction du signal). Un processus biologique est le résultat d'une ou plusieurs fonctions moléculaires associées dans un ordre donné. La fonction moléculaire décrit l'activité biochimique ou l'action du produit d'un gène (e.g. enzyme transporteur, ligand). La localisation cellulaire présente l'endroit de la cellule où se trouve la forme active du produit d'un gène. GO permet d'exprimer les phénomènes de régulation et offre la possibilité de représenter des données incomplètes.

4.5.5.2 Banques de données

Les banques de données généralistes pour le dépôt des données d'expression de gènes (*repository*) ont été développées dans le but de partager les données d'expression de gènes (notamment issues des expériences de puces à ADN) au niveau de la communauté scientifique internationale. L'une de leur priorité est le respect par les biologistes du standard international MIAME⁸ (Brazma, Hingamp *et al.* 2001) pour uniformiser les données et faciliter leur diffusion. Les trois principaux banques de données généralistes pour le dépôt des données d'expression de gènes sont ArrayExpress⁹ à l'EBI (Rocca-Serra, Brazma *et al.* 2003), GEO¹⁰ au NCBI (Edgar, Domrachev *et al.* 2002) et Cibex¹¹ (*Center for Information Biology gene EXpression database*) au DDBJ (DNA Data Bank of Japan) (Ikeo, Ishi-i *et al.* 2003). Ces *repositories* sont d'importance grandissante puisque, aujourd'hui, la majorité des journaux scientifiques requièrent, pour toutes publications dans le domaine des puces à ADN, le dépôt des données d'expression dans au moins une des banques de données publiques conforme au standard international MIAME.

Les *repositories* permettent de comparer les dessins expérimentaux réalisés pour répondre à diverses questions biologiques. Ils offrent la possibilité de confronter des matrices

⁷ <http://www.geneontology.org/>

⁸ www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html

⁹ <http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>

¹⁰ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

¹¹ <http://cibex.nig.ac.jp/index.jsp>

de données d'expression générées par différentes équipes, sur différents modèles et/ou différentes plates-formes. Les résultats de ces comparaisons permettent, entre autre, d'améliorer l'annotation et la connaissance sur les gènes dans les différentes conditions (McCarroll, Murphy *et al.* 2004; Stuart, Segal *et al.* 2003). L'autre intérêt de ces banques de données généralistes est la mise à disposition des jeux de données aux communautés de chercheurs en bioinformatique, mathématiques et statistiques pour le développement de nouvelles méthodologies d'analyse (Sivozhelezov, Giacomelli *et al.* 2006). De même, de nombreux articles, parus dans les journaux traitant de bioinformatique, présentent des algorithmes testés sur des jeux de données extraits des différentes banques de données publiques (Cordoba, Wang *et al.* 2006; Fishel, Kaufman *et al.* 2007; Park and Stegall 2007). Les résultats obtenus offrent même parfois un complément d'information sur les résultats biologiques (Elashoff, Higgs *et al.* 2007).

4.5.5.3. Confrontation, combinaison et recoupement des données

L'intégration des méta-données passe par l'interopérabilité des différentes sources. Cependant, les données biologiques dispersées dans les différentes banques de données sont le plus souvent hétérogènes, parfois redondantes et généralement de qualité inégale. De plus, l'absence ou le non-respect des standards de nomenclature pour annoter les objets biologiques rend délicat l'interopérabilité, l'intégration et la comparaison des différentes sources d'informations.

De nombreux outils sont actuellement disponibles afin de confronter, recouper et combiner des données. Par exemple, on trouve DAVID¹² (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*) et EASE (*Expression Analysis Systematic Explorer*) (Hosack, Dennis *et al.* 2003) ou encore Babelomics/FatiGO¹³ (Al-Shahrour, Diaz-Uriarte *et al.* 2004). Ces outils permettent de soumettre une liste de gènes sur laquelle on recherche une sur-représentation de certaines catégories fonctionnelles ou annotations grâce à un test exact de Fischer ou la distribution hypergéométrique. Ces différents outils diffèrent principalement par les catégories de données recherchées et les corrections appliquées aux p-valeurs obtenues par le test exact de Fischer pour ajuster leur significativité. Ils permettent la gestion des ensembles, le rapatriement de données, la recherche de sur-représentation d'annotations et la

¹² <http://niaid.abcc.ncifcrf.gov/>

¹³ <http://fatego.bioinfo.cipf.es/>

visualisation d'un ensemble dans un certain contexte : graphe de la *Gene Ontology*, carte du KEGG¹⁴ (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) (Kanehisa, Goto *et al.* 2004).

D'autres outils permettent l'intégration des données expérimentales et bibliographiques afin de les visualiser au sein de voies métaboliques comme par exemple *Ingenuity Pathway Analysis*¹⁵ ou MADSENSE¹⁶ (*MicroArray Data SENSE*).

4.5.6. Puces et art !

Les exemples précédents montrent bien l'importance de la quantité de travail à réaliser après les expérimentations à proprement parler pour valider, stocker, échanger et finalement comparer les données obtenues avec les puces à ADN et la littérature. Mais que faire des non moins nombreuses lames dont les données ne sont pas exploitables ? Il semble que certains aient trouvé la solution en développant un nouveau mouvement artistique autoproclamé *art array* (Figure 13).

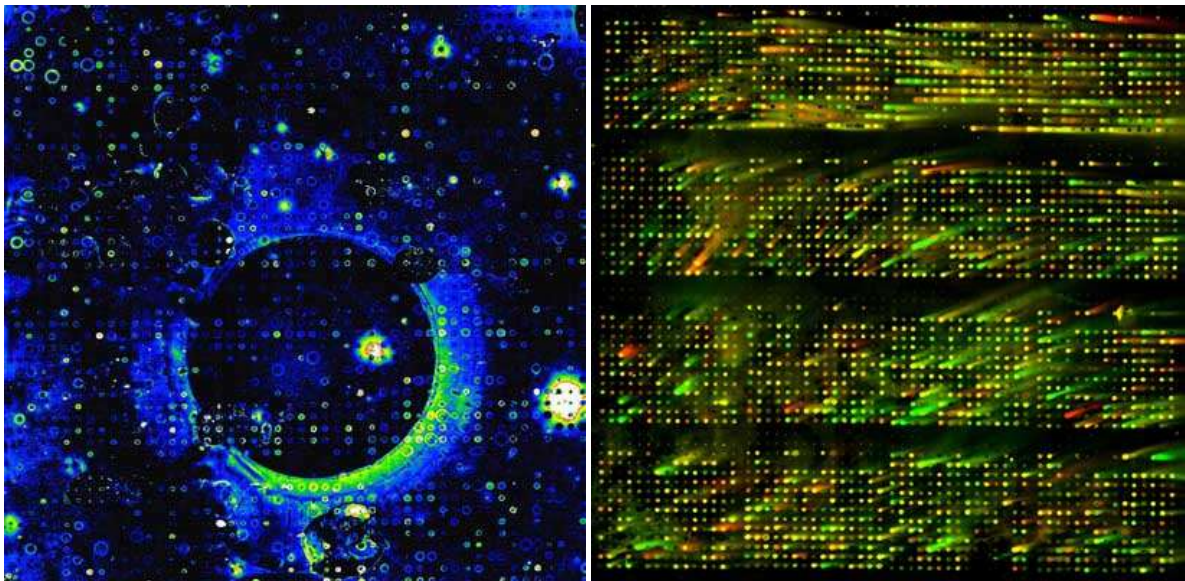


Figure 13 : Exemples de l'*art array* ou la « beauté de l'erreur ».

¹⁴ www.genome.jp/kegg/

¹⁵ <http://www.ingenuity.com/>

¹⁶ <http://cardioserve.nantes.inserm.fr/mad/madsense/index.html>

5. Objectifs

N'ayant pas de facteurs prédictifs fiables de la tolérance « opérationnelle » chez des patients transplantés rénaux, les puces à ADN semblent être un outil approprié pour la recherche de biomarqueurs sans *a priori*.

Mon travail de thèse a donc consisté à rechercher des gènes pouvant distinguer les patients « opérationnellement » tolérants des patients en rejet chronique sur la base d'une simple prise de sang. L'intérêt majeur d'une telle signature est de pouvoir explorer la possibilité que des patients greffés rénaux sous traitement immunosuppresseur classique avec une fonction rénale stable aient le même profil que les patients « opérationnellement » tolérants.

Initialement, le laboratoire a réalisé une collaboration avec l'université de Stanford afin de déterminer une signature transcriptionnelle de la tolérance « opérationnelle » par la technologie des puces à ADN. L'ARNm des patients a été hybridé sur des puces spotted avec des ADNc. L'objectif est de trouver une signature de gènes avec une valeur diagnostique et pronostique de la tolérance « opérationnelle » par rapport au rejet chronique et de tester cette signature sur des patients sous traitement immunosuppresseur avec une fonction rénale stable. Cette partie correspond à l'article I.

Suite à cela, nous avons voulu compléter ces résultats en utilisant des puces à ADN spotted avec des oligonucléotides. En effet, les puces à ADNc sont moins sensibles que les puces à oligonucléotides du fait de la longueur des sondes et induit des hybridations croisées (*i.e.* gènes d'une même famille). De plus, la qualité des sondes des puces à ADNc est dépendante de l'efficacité de la PCR (Mah, Thelin *et al.* 2004; Mansfield and Sarwal 2004). De plus, cette deuxième étude a consisté à utiliser une liste de gènes issue d'expériences préliminaires. Au cours de mon DEA, j'ai sélectionné les gènes les plus différentiellement exprimés entre une population de six patients « opérationnellement » tolérants et une population de huit patients en rejet chronique *via* l'utilisation d'une puce exhaustive (dites pangénomiques). Nous avons aussi décidé de déposer des gènes de la littérature ayant un intérêt en transplantation ou de recherches menées au laboratoire comme par exemple Foxp3, HO-1 (*Heme Oxygenase 1*), FSTL1, des gènes de la voie de signalisation NOTCH, certains TLR. La sélection de ces gènes a fait l'objet de la création d'une puce dédiée¹⁷ en

¹⁷ http://cardioserve.nantes.inserm.fr/ptf-puce/cancerochips_fr.php

collaboration avec d'autres équipes de recherche sur Nantes. Chaque patient a été testé une nouvelle fois individuellement sur la base de cette puce dédiée en augmentant le nombre de patients et en incluant des individus sains. Nous avons orienté l'analyse de ses résultats vers une approche plus mécanistique afin de caractériser les réseaux de gènes impliqués dans la tolérance « opérationnelle » et dans le rejet chronique par l'utilisation d'une analyse statistique classique (Article II) et une analyse bioinformatique non-statistique (Article III).

Résultats

1. Article I

Identification d'un panel de biomarqueurs transcriptionnels sanguins associé à la tolérance « opérationnelle » rénale

Sophie Brouard^{*}, Elaine Mansfield^{*}, Christophe Braud, Magali Giral, Szu-Chuan Hsieh, Dominique Baeten, Meixia Zhang, Joanna Asthon-Chess, Cécile Braudeau, Frank Hsieh, Alexandre Dupont, Annaïck Pallier, Anne Moreau, Stéphanie Louis, Catherine Ruiz, Oscar Salvatierra, Jean-Paul Soulillou[‡] et Minnie Sarwal[‡].

^{*,‡}: Les auteurs ont contribué de manière égale à ce travail

Publié dans *Proceeding the National Academy of Sciences*, 2007; **104**(39): 15448-15453

Titre original : *Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance.*

Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance

Sophie Brouard^a, Elaine Mansfield^{b,c}, Christophe Braud^a, Li Li^b, Magali Giral^a, Szu-chuan Hsieh^b, Dominique Baeten^{a,d}, Meixia Zhang^{b,e}, Joanna Ashton-Chess^a, Cécile Braudeau^a, Frank Hsieh^f, Alexandre Dupont^a, Annaik Pallier^a, Anne Moreau^g, Stéphanie Louis^a, Catherine Ruiz^h, Oscar Salvatierra^b, Jean-Paul Soullillou^{a,i}, and Minnie Sarwal^{b,j}

^aInstitut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U643, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, and Université de Nantes, Faculté de Médecine, F-44000 Nantes, France; ^bDepartment of Pediatrics, Stanford University, 300 Pasteur Drive, Stanford, CA 94304; ^cDepartment of Veterans Affairs Palo Alto Health Care System (151-K), Palo Alto, CA 94304; ^dService d'Anatomie Pathologique, CHU Hôtel-Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France; ^eTCLand, Halle 13 Bio-Ouest Ile de Nantes, 21 Rue de la Noue Bras de Fer, 44200 Nantes, France; ^fAffymetrix, Inc., 3380 Central Expressway, Santa Clara, CA 95051; ^gClinical Immunology and Rheumatology, Academic Medical Center/University of Amsterdam, Meibergdreef 9, 1105 AZ, Amsterdam, The Netherlands; and ^hDepartment of Clinical Pharmacology, China Medical University, Shenyang 110001, China

Communicated by Jean Dausset, Centre d'Etude du Polymorphisme Humain, Paris, France, July 2, 2007 (received for review October 11, 2006)

Long-term allograft survival generally requires lifelong immunosuppression (IS). Rarely, recipients display spontaneous "operational tolerance" with stable graft function in the absence of IS. The lack of biological markers of this phenomenon precludes identification of potentially tolerant patients in which IS could be tapered and hinders the development of new tolerance-inducing strategies. The objective of this study was to identify minimally invasive blood biomarkers for operational tolerance and use these biomarkers to determine the frequency of this state in immunosuppressed patients with stable graft function. Blood gene expression profiles from 75 renal-transplant patient cohorts (operational tolerance/acute and chronic rejection/stable graft function on IS) and 16 healthy individuals were analyzed. A subset of samples was used for microarray analysis where three-class comparison of the different groups of patients identified a "tolerant footprint" of 49 genes. These biomarkers were applied for prediction of operational tolerance by microarray and real-time PCR in independent test groups. Thirty-three of 49 genes correctly segregated tolerance and chronic rejection phenotypes with 99% and 86% specificity. The signature is shared with 1 of 12 and 5 of 10 stable patients on triple IS and low-dose steroid monotherapy, respectively. The gene signature suggests a pattern of reduced costimulatory signaling, immune quiescence, apoptosis, and memory T cell responses. This study identifies in the blood of kidney recipients a set of genes associated with operational tolerance that may have utility as a minimally invasive monitoring tool for guiding IS titration. Further validation of this tool for safe IS minimization in prospective clinical trials is warranted.

kidney transplantation | microarray | tolerant | genomics | immunosuppression titration

Despite continuous improvement in renal allograft survival over the last decade, the half-life of renal allografts has increased marginally because of accrual of chronic graft nephropathy from drug-related nephrotoxicity and chronic rejection (1, 2). Patients facing life-long immunosuppression (IS) have increased risk of infection and malignancy (3), whereas insufficient immunosuppressive drug exposure or interruption usually increases rejection risk (4). However, spontaneous and long-term graft acceptance is observed in a small number of patients after solid-organ transplantation (5, 6), years after total withdrawal of immunosuppressive drugs, confirming that a clinical operational state of tolerance to a mismatched graft, described as "a state of quiescence of the transplanted organ, functioning without a destructive immune response" (7), can indeed occur and exist in humans. However, the frequency of this observation in the kidney transplant population is unknown and, currently, we cannot identify patients primed to

develop this immune adaptation or monitor for the stability of this status of "operational tolerance."

The operationally tolerant kidney transplant patients in this study have been previously described (8) and show an altered T cell-receptor repertoire (9) and distinct lymphocyte phenotypes (10). However, none of these observations have been validated as being functionally involved in operational tolerance in humans.

The identification of biomarkers of drug-free operational tolerance in graft recipients is an important and challenging issue allowing for individualized therapy and personalized safe IS minimization (11). In the present study, we studied a cohort of 17 highly informative kidney-transplanted patients presenting clinical operational tolerance years after complete IS withdrawal with the aim of identifying reliable minimally invasive biomarkers diagnostic of clinical operational tolerance in kidney transplantation.

Gene-expression patterns from peripheral blood samples, examined across 91 adults represented by normal adults and five cohorts of renal-transplant recipients in different clinical contexts, identified a minimal set of 49 genes, differentially expressed gene transcripts in drug-free tolerant patients when compared with other patients, with tolerance class prediction scores of >90%. Quantitative RT-PCR across a subset of 33 of these 49 genes can accurately confirm tolerance in an independent-validation group of tolerant patients with a specificity of 99%. Additionally, 1 of 12 stable patients on standard maintenance immunotherapy and 5 of 10 minimally immunosuppressed patients on steroid monotherapy have tolerance class-prediction scores of >80%.

Our data suggest that identification of natural operational tolerance in renal-transplant recipients is possible by gene expression

Author contributions: S.B. and E.M. contributed equally to this work as first authors; J.-P.S. and M.S. contributed equally to this work as senior authors; J.-P.S. and M.S. designed research; S.B., E.M., C. Braud, M.G., S.-C.H., D.B., M.Z., J.A.-C., C. Braudeau, A.D., A.P., A.M., S.L., C.R., J.-P.S., and M.S. performed research; S.B., C. Braud, C. Braudeau, A.P., and M.S. contributed new reagents/analytic tools; S.B., E.M., C. Braud, L.L., M.G., D.B., J.A.-C., F.H., J.-P.S., and M.S. analyzed data; and S.B., E.M., L.L., O.S., J.-P.S., and M.S. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations: TOL, immunosuppressive-drug-free tolerant transplant recipients; TOL-Test, TOL test group; TT, TOL-Test patient; CT, CR-Test patient; N, age-matched healthy volunteers; IS, immunosuppression; MIS, minimal immunosuppression (steroid monotherapy); MIS-Test, MIS test group; CR, chronic rejection; CR-Test, CR test group; STA, long-term stable test-group; AR, acute rejection; AR-Test, AR test group; PAM, predictive analysis of microarrays; SAM, statistical analysis of microarrays; SAS, statistical analysis software.

To whom correspondence may be addressed. E-mail: jps@nantes.inserm.fr.

To whom correspondence may be addressed at: Department of Pediatrics, G320, 300 Pasteur Drive, Stanford, CA 94304. E-mail: msarwal@stanford.edu.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/cgi/content/full/0705834104/DC1.

© 2007 by The National Academy of Sciences of the USA

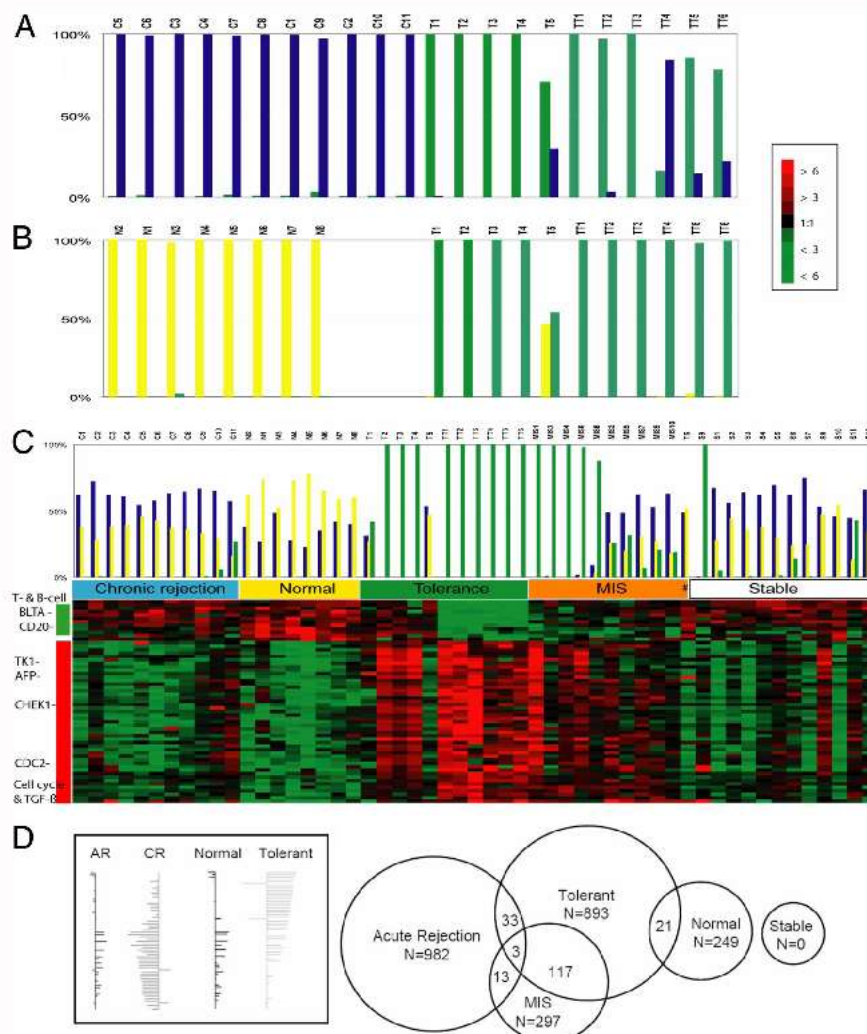


Fig. 1. Identification of “tolerance genes” in training- and test-set patient samples. (A) Tolerance prediction by two-class comparison of TOL (T) and CR (C). A cross-validated comparison of a training set of 5 TOL (green bars), 11 CR patients (blue bars), and 6 additional TOL-Test (TT) patients show a >80% fit to phenotype for most samples across this selected gene set. (B) Tolerance prediction by two-class comparison of TOL and N. A cross-validated comparison of a training set of five TOL (green bars) and eight N (yellow bars) blood samples. (C) Tolerance prediction by three-class comparison of TOL, CR, and N performs best for tolerance. A cross-validated comparison of a training set of 5 TOL, 11 CR, and 8 N blood samples by using three-class prediction identifies a subset of 49 known unique genes (59 transcripts). In the training set, class prediction scores for the CR (blue bars) and N (yellow bars) groups are weaker in three-class over two-class analysis. For the tolerance phenotype (green bars), consistently weak class prediction is seen for T5 by three-class analysis, as also seen by two-class analysis, but >90% tolerance prediction scores come up for most of the TOL and TOL-Test samples. Given the strength of this gene set for tolerance prediction, MIS and STA (S1–12) patients were also typed by PAM for their best fit to TOL, N, or CR class. Patients MIS1, MIS3, MIS4, MIS6, MIS8, and STA9 had very strong expression signatures that match operational tolerance. (D Right) Venn diagram of statistically significant genes ($q < 0.05$) by SAM for all patient groups, relative to chronic rejection, using two-class comparison with CR ($n = 11$) as the reference group. More genes distinguish CR from TOL ($n = 893$) and AR ($n = 982$) than either MIS ($n = 297$) or N ($n = 249$). (D Left) Relative expression of the top 100 transcripts discriminating AR, CR, N, and TOL patients by PAM four-class analysis. The majority of these transcripts are expressed in highest abundance in TOL and lowest abundance in CR, suggesting that these two patient groups are the most distinct. A dendrogram of the relatedness of all patient samples across 11 K genes is shown in SI Fig. 3.

pattern recognition across a modest number of genes in blood. Customized PCR-based gene expression of peripheral blood may target patients on conventional IS as candidates for safe IS minimization.

Results

Biomarker Discovery and Biomarker Validation for a Tolerance Footprint. Immunosuppressive-drug-free tolerant transplant recipients (TOL) were divided into a training group ($n = 5$) included in the study between 2000 and 2004 and an independent test group [$n = 12$; TOL test group (TOL-Test); TOL-Test patients TT1–TT6] included in the study between 2005 and 2006. Microarray analysis was performed on 24 training-group blood samples [5 TOL, 11 chronic rejection (CR), and 8 age-matched healthy volunteers (N)].

Two-class prediction tests using the predictive analysis of microarrays (PAM) class prediction tool (12) was applied between TOL and CR (Fig. 1A) and TOL and N (Fig. 1B). Additional microarrays were next performed on six independent blinded TOL-Test patients (TT1–TT6) but were not used to train the class-prediction algorithm. All patients in the TOL-Test group have tolerance scores of >80% with the exception of patient TT4, showing a strong similarity between the TOL and TOL-Test samples (Fig. 1B). PAM three-class prediction was next applied across TOL, CR, and N blood samples and identified a minimal gene set of 49 unique genes. The expression of these genes distinguishes all N controls and CR patients from tolerance and classifies most tolerant patients accurately. None of the CR or N controls score as tolerant in this analysis, although 10 of 11 TOL patients do (fit-to-phenotype scores

Table 1. Demographic summary of patient groups (median and range)

	Training groups			Test groups					
	TOL	CR	N	TOL-test	CR-test	MIS	STA	AR	N-test
Number	5	11	8	12	11	10	12	14	8
Age, years	67	56	23	37.5	52	55.5	49	20	46
	58–73	28–75	11–27	20–87	10–59	28–83	31–67	16–24	30–66
% Male	80	63.60	37.5	75	63.6	54.50	58	64.20	0
Time post-transplant, months									
Mean	178	59	NA	137	48	139.5	172	12	NA
Range	108–360	20–158		86–372	11–158	47–262	48–269	0.5–108	
Serum creatinine, μ M/liter									
Mean	122	244	NA	115	244	98.5	107	152	NA
Range	82–139	127–492		70.4–149.6	100–686	64–161	63–147	110–704	
Proteinuria per day, g/24 h									
Mean	0.83	1.93	NA	0.225	2.71	0.15	0.11	0.9	NA
Range	0–1.28	0.34–11.75		0.0–1.42	0.56–11.75	0–0.77	0–0.35	0.3–1.9	
Prior AR, %	20	36	NA	58	63.6	9	16.60	57	NA
Prior CA, %	20	0	NA	17	0	72.50	16.60	0	NA
Prior CMV, %	0	27	NA	0	1	9	0	0	NA
HLA incompatibilities									
Mean	3.2	3	NA	3	2	2	3	3	NA
Range	3–4	1–5		2–4	2–5	0–5	0–4	2–5	
LRD, %	0	0	NA	0.8	36.3	0	9	64.20	NA

CA, cancer; NA, not applicable; LRD, living related donor.

of >90%; T5 scored \approx 50%; Fig. 1C). These 49 genes have been designated the tolerance footprint [supporting information (SI) Table 2]. Patient T6 classified with highest similarity to CR. Thus, the tolerance footprint has a specificity of 100% and a sensitivity of 90% in the training set samples and the test-set of TOL samples. Given the strength of this 49-gene set for tolerance prediction, microarray experiments were performed on all minimal IS [MIS (steroid monotherapy)] patients ($n = 10$) and long-term stable test-group (STA) ($n = 12$) patients, and PAM class prediction of tolerance was applied by using these 49 genes. A surprisingly high (50%; 5 of 10 patients) number of MIS patients as well as 1 of 12 (\approx 8%) STA patients (Fig. 1C) matched tolerance prediction scores of >90%, highlighting the potential detection of operational tolerance in patients on weaning (one drug) and maintenance (three drugs) IS. Global expression variance across these data, when compared with published peripheral blood data sets (13–15), shows that operational tolerance state is not just a paradigm shift toward a normal resting state (SI Fig. 2).

“Minimal Tolerance Footprint” Predictive of a Potential Tolerant State in Transplant Patients by Using RT-PCR. Quantitative RT-PCR for the 49 genes from the tolerance microarray data set and hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase were performed in triplicate on RNA extracted from the peripheral blood mononuclear cells of six independent TOL-Test patients (TT7–TT12) and six independent CR-Test patients (CT6–CT11), none of whom were included in microarray analysis (Table 1 and SI Table 3), and seven stable transplant patients randomly chosen among the 12 STA patients (S2, S3, S7, S8, S9, S10, and S12). Gene candidates described in the literature as being associated with tolerance [FOXP3 (16), GITR (17), and Neuropilin-1 (18)] were also tested. Increased expression of FOXP3 ($P = 0.009$) in TOL relative to CR was confirmed. Expression of neuropilin-1 and GITR was \approx 2- and \approx 8-fold greater, respectively, in TOL vs. CR, although statistical significance was not reached (data not shown). Many individual gene-expression measurements, from the 49-gene set, were statistically significant by PCR for the tolerance group when compared with the CR group ($P < 0.001$ for CCL20, TLE4, CDH2, PARVG, and SPON1; $P < 0.006$ for RAB30, BTLA, and SMILE; $P < 0.03$ for SOX3, CHEK1, HBB, and DEPDC1; $P = 0.045$ for CDC2) (SI Fig. 4A). A

composite model of 33 of 49 of the most-abundant PCR gene-expression measurements, used in a blind cross-validated PAM two-class analysis, correctly classified TT7–TT11 as tolerant and CT6–CT11 as CR, with a single misclassification (TT12 as CR) (SI Fig. 4B). Interestingly, although TT12 fulfilled the full clinical description of operational tolerance 2 years before and at the time of harvesting (6 months after testing), decline in renal function was observed (creatinemia: 165 μ m per liter; proteinuria: 1g per day), with demonstration of anti-donor class II (anti-HLA DR4) antibodies. Given the small tolerant-sample size, it is difficult to speculate on the status of this patient, but this clinical picture suggests that the operational-tolerance gene-expression signature is likely a metastable rather than a permanent state. Composite PCR expression of the 33 genes was next used to classify seven STA posttransplant patients as TOL or CR. Consistent with the microarray-based classification, a single stable patient (S9; see Fig. 1C) was predicted to share the TOL phenotype with a classification score of >99% (0.996) (SI Fig. 4C). Thus, PCR-based blood expression of operational tolerance in renal-transplant recipients appears robust across a modest number of genes.

Global Unsupervised Gene Expression: Immunological Quiescence and Cell Cycling Distinguish Tolerance. Unsupervised clustering across all 11,820 expressed genes on the lymphochip platform and all patient samples shows that the samples largely segregate by clinical phenotypes, with almost complete segregation of TOL or CR samples across a higher-stringency 2,986-gene list (SI Figs. 2 and 5A). CR patients not under IS (indicated by outlined squares in SI Fig. 5A) coclustered with other CR patients, suggesting that the rejection phenotype was stronger than the effect of treatment. Training-TOL and Test-TOL patients cluster together when combined into a single data set, confirming the homogeneity of the training and test groups.

Three gene clusters were identified to drive the segregation of the tolerant samples from CR and stable blood samples (SI Fig. 5A and SI Table 4). Overall, cluster I suggests reduced immune activation in clinical tolerant patients. Cluster II contains several significantly down-regulated signal transduction genes and RNA binding genes. Cluster III contains the discriminating up-regulated cell cycle

regulator genes with a significant enrichment of genes expressed primarily during mitosis and in cellular energetic processes.

Biological Relevance of Tolerance Signature. To assess potential overlap among acute rejection (AR), chronic rejection (CR), and TOL expression signatures in peripheral blood, 14 blood samples collected from patients at the time of biopsy-proven AR (before treatment intensification) were also examined by microarrays. Statistical analysis of microarrays (SAM) identified 893 genes and 982 genes differentially expressed ($q < 0.025$) in tolerance when compared with CR (SI Fig. 5B) and AR (SI Fig. 4C), respectively. We observed a <4% overlap between differentially expressed genes in AR and TOL (Fig. 1D) in this analysis. Furthermore, the abundance of several transcripts identified by using four-class discrimination of AR, CR, N, and TOL suggests that the greatest expression differences exist between the CR and TOL groups, regardless of IS usage in the former group (Fig. 1D).

Hypergeometric gene-enrichment analysis shows that the majority of the differentially expressed genes expressed at higher levels in TOL show a strong bias toward cell-cycle regulation (19) ($P = 0.00038$), T cell-specific expression (20) ($P = 0.006$), with regulation during T cell suppression and costimulation experiments [T cell α -CD3/ α -CD28 *in vitro* costimulation with and without concurrent calcineurin inhibitor, Prograf (FK506) treatment, $P = 1 \times 10^{-8}$ and $P = 0.00002$ (21)]. In agreement with the Expression Analysis Systematic Explorer (EASE) analysis, clusters of chemokines and cell-adhesion molecules show reduced expression in TOL relative to CR, whereas several ribosomal protein genes, cell cycle and proliferation markers, and key transcription factors show increased expression. Additionally, $\approx 25\%$ of the genes that differentiate TOL and CR on SAM two-class analysis overlap with the genes that differentiate TOL from N controls by similar analysis (SI Table 5).

TGF- β Plays a Role in Operational Tolerance. TGF- β is not differentially expressed between TOL and CR, and this is confirmed by the absence of difference at the protein level in the sera of training-group patients. Indeed, the TGF- β 1 serum levels of TOL patients ($n = 5$) were 39.5 ± 3.7 ng/ml compared with those of the CR patients (27 ± 2 ng/ml; $n = 7$) and were comparable to the levels observed in the normal healthy controls ($n = 8$). Interestingly, however, we found that TGF- β regulates the function of 27% of the peripheral blood genes that differentiate tolerance from CR. These TGF- β -regulated genes include latent TGF- β binding protein 4 (LTBP4) (2.6-fold), which functions to convert latent TGF- β protein into the active form; N-cadherin (CDH2) (5-fold), which is known to enhance the ability of TGF- β to induce cell-cycle arrest in the G₁ phase (22, 23); and CD9, a surface antigen initiating the TGF- β signaling pathway (24) that was expressed at $\approx 40\%$ higher levels in tolerance. Additional TGF- β -regulated genes include α -fetoprotein, natural killer cell group 7 (NKG7) (25), connective tissue growth factor (CTGF), and fibronectin (FN1) (26), which are gene markers for apoptosis, immune suppression, growth arrest, and the stress-response, respectively, and are also involved in early T and NK cell activation (27).

Altered Immunological Circuits in Operational Tolerance. A second important finding in this transcription profiling study was that known costimulatory genes were underexpressed in TOL patients compared with CRs (SAM analysis). This finding is cross-validated by a down-regulation of many other genes previously identified as being differentially expressed during independent T cell costimulation experiments *in vitro* (13). Mirroring the costimulation response, we also observed an absence of up-regulation of genes generally associated with T cell activation. Indeed, classical markers for early and late T cell activation (CD69, TACTILE, LAG3, or SLAMF), expression of cytotoxicity-associated genes such as granzyme, perforin, fas, and granulysin (28), and genes characterizing proinflammatory Th1/Th2 responses (TNF α , IL-4, and IL-10) were

consistently reduced in TOL patients. Approximately 90% of known proinflammatory cytokines were reduced in TOL patients, supporting evidence for immune quiescence and ignorance of donor antigen (29, 30). Interestingly, a modest enrichment ($P = 0.025$) for genes identified in memory T cells (31) was seen in the expression signature from our TOL patients.

Analyses for Potential Clinical Confounders for Gene-Expression Measurements. SAS multivariate analysis and SAM quantitative analysis were performed to test whether differences between the patient groups, such as type of medication, gender, and prior history of malignancy or CMV infection, could act as confounding factors on the gene-expression measurements. Age-related differences were observed for six genes: IL13RA2 ($P = 0.05$), RAB30 ($P = 0.03$), RASGRP1 ($P = 0.04$), TACC2 ($P = 0.03$), TBX3 ($P = 0.05$), and TLE4 ($P < 0.001$). However, with the exception of the transcription factor TLE4 that was also found to correlate with renal function (as measured by serum creatinine levels; $P = 0.01$), expression of the six genes correlates more tightly with tolerance than with age and remains significantly differentially expressed between the TOL-phenotype patients and MIS, STA, and CR patients ($P = 0.0003$, $P < 0.0001$, and $P < 0.015$, respectively), as observed by using a multiple linear regression model (P value of the model's global test: 0.0001; adjusted $R^2 = 0.47$). Polymorphonuclear cell, lymphocyte, and monocyte counts were measured to test the hypothesis that cell population differences in the periphery may underlie the expression signature identified. No statistical difference in composition was found between the CR and TOL training groups (SI Table 6). Finally, no statistical correlation was found in the fold expression of 10 randomly chosen genes (TK1, PCP4, Serpina5, DHRS2, CCNB2, CYR61, CDH2, SLC38A6, PARVG, and AFP) and the cell counts ($R^2 = 0.04 \pm 0.06$ for leucocytes, $R^2 = 0.14 \pm 0.07$ for PNN, $R^2 = 0.006 \pm 0.007$ for lymphocytes, and $R^2 = 0.18 \pm 0.12$ for monocytes). These data, together with the fact that the tolerance phenotype was identified in most of the TOL-Test patients, reinforces the idea that operational tolerance is associated with a distinct and reproducible transcriptional pattern.

Discussion

Kidney transplantation remains the major treatment for end-stage renal diseases but is often complicated either by AR or CR or by side effects of the long-term IS. The molecular basis of these processes have been analyzed by gene-expression profiling in various studies focusing on AR (32, 33) and CR (34) demonstrating the potential of this approach to decipher complex pathological processes in human disease. Despite some empirical progress in IS minimization (3), reliable biological markers to identify operational tolerance in kidney transplantation do not exist. We have studied a rare immunosuppressive drug-free cohort of 17 TOL transplant patients from different continents, and these studies have validated a specific biomarker footprint of tolerance where peripheral tolerance is predicted with >99% fit-to-class scores in an independent set of immunosuppressive drug-free TOL patients as well as a subset of stable transplant patients on triple- (8% incidence) and single-drug (50% incidence) immunosuppressive therapy. With the exception of a modest number of genes showing age-associated variation in expression, no association with other potential confounding factors such as immunosuppressive drugs, gender, serum creatinine, and CMV or cancer history was observed. This finding lends credence to the fact that the identified gene signature is directly related to the state of tolerance. For the first time, we may be able to define the patients who could be eligible for a progressive decrease of their immunosuppressive medications and, more importantly, identify the patients who need to stay on their current IS dose.

We previously showed that the TOL patients studied are healthy, free of infection and malignancy, and do not display clinical evidence of immunoincompetency (8). Nevertheless, the fact that

the operational tolerance definition refers to a clinical status precludes a possible response of the recipient against his donor, and nothing proves that operational tolerance will be indefinite. Two patients (T6 and TT12) were predicted to resemble chronic rejection. However, their transcriptional profiles and class prediction scoring distinguish them from other TOL patients even before eventual decline in graft dysfunction. Furthermore, the loss of the peripheral signature for tolerance correlates clinically to a change in clinical phenotype from operational tolerance to rejection.

DNA microarrays, which allow detailed measurements of gene expression on an unprecedented global scale (35), have been criticized for variability, lack of reproducibility, and difficult data management. Although more recent technical developments have largely circumvented these issues (36), they remain relevant to the present study because of the rarity of TOL kidney graft recipients and the multiplicity of mechanisms which have been shown to be involved in experimental tolerance models (37). Therefore, several strategies were used to ascertain the robustness and reproducibility of the obtained gene expression profile. (i) Although still a relatively small study because of the extreme scarcity of spontaneous tolerance in kidney transplantation, all 17 patients with operational tolerance and the 74 reference samples were carefully phenotyped and age/gender-matched. As such, the analyses were performed on the largest cohort of TOL kidney graft recipients ever studied. (ii) Gene expression data were tested for potential confounding factors. (iii) Both CR and healthy volunteers were used as reference groups to ascertain that the obtained profile was specific for operational tolerance and not due to an absence of IS or the presence of good renal function. (iv) The gene expression was confirmed on RNA samples with an independent technique by using quantitative RT-PCR. (v) Finally, the peripheral blood-based expression profile was validated on independent samples both by microarrays and RT-PCR.

Although highly convenient for serial analysis in clinics, blood may not be the ideal tissue source for deciphering the underlying molecular mechanisms in graft acceptance. Nevertheless, changes in peripheral blood expression profile have been shown to correlate with biopsy-proven heart rejection (38) and may be useful in immunosuppressive management (39). Moreover, regulatory lymphocytes from peripheral blood transfer long-term survival in a fully mismatched liver allograft rat model (40), suggesting that regulatory mechanisms may be accessible in the periphery. Thus, despite the limitations inherent to peripheral blood sampling, several interesting observations emerge from this study. Although the mRNA levels of TGF- β were not substantially different between patient groups, this chemokine regulates the function of $\approx 27\%$ of the genes that define the naturally acquired tolerance signature. TGF- β has been shown to be involved in various animal models of tolerance during both the induction (41) and maintenance phases (42). It is also important for homeostasis of CD4⁺CD25⁺/CD4⁺CD25⁻ FOXP3⁺ regulatory T cells (43) and TGF- β -producing Th3 (44) cells that are known to have suppressive activity. The exact mechanisms driving and maintaining spontaneous tolerance in these patients yet remains unclear; however, there are data emerging about the diverse roles of tissue and peripheral TGF- β in protective (43) and injurious (45) alloresponses. The finding of increased expression of certain molecular markers of regulatory T cells in TOL patients over CR patients suggests differences in T cell subsets between these two groups.

As we have previously shown, no evidence of immunoincompetency was observed among the TOL patients studied (8). Peripheral down-regulation of costimulatory signals and Th1/Th2-related cytokines observed in this study thus suggests that these patients have a normal immune system with donor-specific hyporesponsiveness. FOXP3, as previously shown (46), GITR, and neuropilin were elevated by RT-PCR in the TOL and N controls when compared with CR patients, suggesting a role for an intact T cell regulation in tolerance and, conversely, its loss during CR. We have previously

shown decreased numbers of regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells in the blood of CR patients compared with TOL patients and healthy individuals (46). Phenotyping revealed also an increase of CD8⁺CD28⁻ cells with higher expression of perforin and granzyme A in CR patients compared with TOL patients and healthy individuals (10). The combination of multiple immune-monitoring parameters such as the tolerance expression footprint identified in this study, T cell receptor repertoire alteration (9, 47), changes in mononuclear cell phenotype (6, 10, 46), or *ex vivo* inhibition of allospecific responses could increase the accuracy of identifying and predicting the tolerant phenotype.

In summary, we have identified a small biomarker panel using gene-expression profiling of peripheral blood from spontaneously tolerant renal-transplant recipients. The expression signature suggests that TGF- β might contribute to this process, possibly by regulating specific phenotypes of peripheral regulatory T cells or altering the threshold for T cell activation (48). Large-scale clinical studies are now warranted to validate the utility of this tolerance footprint as a means to identify spontaneous clinical operational tolerance in long-term kidney recipients with stable graft function, to determine the timing of appearance of the observed tolerant footprint posttransplantation, and to test the stability of this profile over time. In this context, the present study provides a unique, tolerance-specific, clinical monitoring tool to screen a large cohort of stable patients under conventional IS and identify patients that could be subsequently randomized for progressive and controlled reduction in IS.

Materials and Methods

Patient Selection. Peripheral blood samples were collected from 75 adult renal-transplant patients (grouped into TOL, STA, AR, and CR; *SI Table 2*) and 16 N adult controls enrolled in this study at Nantes University (Nantes, France) and Stanford University (Palo Alto, CA). The protocol was approved by each of the university hospital ethical committees and institutional review boards, and required written informed consent was obtained. Samples were separated into Training-group and Test-group cohorts containing patient with different clinical phenotypes (see *SI Tables 2 and 3*). Apart from tolerant patients for whom biopsy was refused by the patients and the relevant hospital ethical committees, all patients had biopsy-confirmed clinical phenotypes.

To generate informative biomarkers by microarray for operational tolerance, Training-group samples ($n = 24$) were chosen from three clinical phenotypes.

1. Immunosuppressive drug-free TOL ($n = 5$) patients with long-term stable graft function, without IS for at least 2 years (mean duration drug-free, 8.8 ± 4.9 years). Stable graft function was defined as stable Cockcroft-calculated creatinine clearance >60 ml per min per 1.73 m² with absent or low-grade proteinuria (<1.5 g/day). Causes of IS withdrawal were medical necessity (calcineurin-inhibitor nephrotoxicity, $n = 1$; posttransplant lymphoproliferative disease, $n = 1$; complete remission from posttransplant lymphoproliferative disease 7 years before study) and patient treatment nonadherence ($n = 3$). The clinical and biological characteristics of these patients have been described in detail previously (8), and the most relevant demographic and clinical data of the entire population studied are summarized in *SI Tables 2 and 3*.
2. CR patients ($n = 11$). This group was defined according to clinical and histological criteria. All CR patients had a progressive degradation of their renal function (creatinine clearance of <60 ml per min per 1.73 m² and/or proteinuria of >1.5 g/day) and histological signs of vascular CR defined as endarteritis and allograft glomerulopathy with basement membrane duplication (49, 50). Because CR patients differ from TOL patients by a "maintenance" IS, 4 of the 11 CR patients chosen had been on dialysis and off immunosuppressive treatment for 1.5 ± 0.5 years

and were intentionally enrolled to enable analysis of the confounding effect of treatment. Transplant renal biopsy showed Banff-classified chronic active humoral rejection with C4d deposition in three (undetermined for one) circulating anti-donor class II antibodies. A single patient (TT6; see SI Table 3) was without IS for 19 years with stable function before testing but, 6 months after sampling, was found to have proteinuria above the defined threshold (>1.5 g/day) and graft dysfunction. Because the patient refused a biopsy, he was not assigned to a specific group (labeled # in Fig. 1) and clusters with CR samples on microarray analysis of the sample, even many months before his graft dysfunction event.

3. N ($n = 8$) were included as controls. They all had a normal blood formula and no infectious or other concomitant pathology for at least 6 months before the study.

To allow for validation of the discovered biomarkers for operational tolerance, an independent, blinded Test-group of samples ($n = 67$) from six different posttransplant clinical phenotypes, including patients with AR and stable graft function, were examined by expression profiling (microarray and real-time PCR). Descriptions of these different test-group cohorts are as follows.

1. TOL-Test ($n = 12$). All new patients shared the same clinical and pathological criteria as described above. All stopped their IS for nonadherence reasons.
2. MIS ($n = 10$). Patients with stable graft function on steroid monotherapy (<10 mg/day) for 4.6 ± 2.6 years. Calcineurin inhibitors and CellCept were removed in these patients because of previous posttransplant lymphoproliferative disease ($n = 6$), cancer ($n = 2$), or uncontrolled infectious disease ($n = 2$).
3. STA ($n = 12$). Patients with stable kidney graft function at >5 years posttransplantation while under mycophenolate mofetil or azathioprine and maintenance steroids with ($n = 5$) or without ($n = 7$) an associated calcineurin inhibitor.
4. AR-Test ($n = 14$). Patients experiencing rapid decline (>20% from baseline) in graft function and biopsy-proven AR (51).

5. CR-Test ($n = 11$). This group had biopsy-proven chronic rejection with deteriorating graft function and proteinuria.
6. N ($n = 8$). These subjects all had normal blood formulae and no infectious or other concomitant pathology for at least 6 months before the study. To limit the number of array experiments, this group was used for RT-PCR validation only. Detailed demographic and clinical data for all of these patients are shown in SI Tables 2 and 3.

For details on microarray experiments, ELISA for TGF- β , and real-time PCR, please see SI Methods. Raw gene-expression files are available as SI Raw Data.

Statistics. Wilcoxon rank sum test, logistic regression, and Pearson's correlation test (expressed as R^2) were run on the clinical data. SAS multivariate analysis and SAM quantitative analysis were performed to test whether clinical differences between the patient groups, such as type of medication, gender, prior history of malignancy, or CMV infection, could act as confounding factors on the gene-expression measurements assessed as group-specific. Hypergeometric enrichment analysis was run on gene-expression data by using published gene-expression data lists. Cluster (52), Expression Analysis Systemic Explorer, and PAM (12) were used to determine the "expression phenotypes" of the unidentified, independent test-group samples.

We thank Xin Chen, Balasubramanian Narasimhan, Mei-Sze Chua, Rosa Liu, Christophe Legendre, Eric Thervet, Janie Waskerwitz, Sheryl Shah, Phillip Halloran (University of Alberta, Edmonton, AB, Canada), and the Stanford Microarray Database for sample/data collection and/or analysis; and Patrick Miqueu for editing. This work was supported by grants from the National Institutes of Health (U01 AI55795-02 and R01 AI 61739-01 to M.S.), the Clinical Center for Immunological Studies at Stanford University (to M.S.), the Lucille Packard Foundation (to M.S. and E.S.M.), the "Foundation Progreffe," the "Establishment Français des Greffes," Roche Organ Transplantation Research Foundation, the National Institute of Allergy and Infectious Diseases, the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, and the Juvenile Diabetes Research Foundation.

1. Opelz G (1995) *Transplantation* 60:1220-1224.
2. Nankivell BJ, Borrows R, Fung CL, O'Connell PJ, Allen R, Chapman JR (2003) *N Engl J Med* 349:2326-2333.
3. Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D, Giral M, Blanche G, Dreno B, JP, S (1998) *Lancet* 351:623-628.
4. Iman A, Rao M, Juneja R, Jacob CK (2001) *Natl Med J India* 14:75-80.
5. Strober S (2000) *J Allergy Clin Immunol* 106:S113-S114.
6. Li J, Spletter ML, Johnson JA (2004) *Physiol Genomics* 21:43-58.
7. Waldmann H, Cobbold S (2001) *Immunity* 14:399-406.
8. Ballet C, Roussey-Kesler G, Aubin JT, Brouard S, Giral M, Miqueu P, Louis S, van der Werf S, Souillou JP (2006) *Am J Transplant* 6:2796-2801.
9. Brouard S, Dupont A, Giral M, Louis S, Lair D, Braudeau C, Degauque N, Moizant F, Pallier A, Ruiz C, et al. (2005) *Am J Transplant* 5:330-340.
10. Baetens DL, Eraud C, Braudeau C, Ballet C, Moizant F, Pallier A, Giral M, Brouard S, Souillou JP (2006) *J Am Soc Nephrol* 17:294-304.
11. Martinez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, Lerut J, Latime D, Margarit C, Bilbao I, et al. (2007) *Am J Transplant* 7:309-319.
12. Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99:6671-6672.
13. Boldrick JC, Alizadeh AA, Diehn M, Dudait S, Liu CL, Belcher CE, Botstein D, Staudt LM, Brown PO, Reiman DA (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99:972-977.
14. Alizadeh A, Eisen M, Davis RE, Ma C, Sabet H, Tran T, Powell JJ, Yang L, Marti GE, Moore DT, et al. (1999) *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 64:71-78.
15. Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, Alizadeh AA, Boldrick JC, Reiman DA, Brown PO (2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1896-1901.
16. Cobbold SP, Castejon R, Adams E, Zelenika D, Graca L, Humm S, Waldmann H (2004) *J Immunol* 172:6003-6010.
17. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S (1999) *J Immunol* 163:5211-5218.
18. Bruder D, Probst-Keppler M, Westendorp AM, Geffers R, Beissert S, Loser K, Von Boehmer H, Buer J, Hansen W (2004) *Eur J Immunol* 34:623-630.
19. Whitfield ML, Sherlock G, Sidana AJ, Murray JI, Ball CA, Alexander KE, Matese JC, Perou CM, Hurt MM, Brown PO, et al. (2002) *Mol Biol Cell* 13:1977-2000.
20. Su AI, Cooke MP, Ching KA, Hakak Y, Walker JR, Wiltshire T, Orth AP, Vega RG, Sapinoso LM, Moqrich A, et al. (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99:4466-4470.
21. Diehn M, Alizadeh AA, Rando OJ, Liu CL, Stankunas K, Botstein D, Crabtree GR, Brown PO (2002) *Proc Natl Acad Sci USA* 99:11796-11801.
22. Satterwhite DJ, Neufeld KL (2004) *Cell Cycle* 3:1069-1073.
23. Verrecchia F, Tacheau C, Wagner EF, Mauviel A (2003) *J Biol Chem* 278:1585-1593.
24. Hattori T, Kawaki H, Kubota S, Yutani Y, de Crombrughe B, von der Mark K, Takigawa M (2003) *J Cell Physiol* 197:94-102.
25. Bellone G, Aste-Amezaga M, Trinchieri G, Rodeck U (1995) *J Immunol* 155:1066-1073.
26. Saed GM, Kruger M, Diamond MP (2004) *Wound Repair Regen* 12:557-564.
27. Xu Y, Kapp JA (2002) *Invest Ophthalmol Visual Sci* 43:3473-3479.
28. Harris MA, Clark J, Ireland A, Lomax J, Ashburner M, Foulger R, Eilbeck K, Lewis S, Marshall B, Mungall C, et al. (2004) *Nucleic Acids Res* 32:D258-D261.
29. Toyo-oka K, Tai XG, Yashiro Y, Ahn HJ, Abe R, Hamaoka T, Kobayashi M, Neben S, Fujiwara H (1997) *Immunol Lett* 58:19-23.
30. Park CS, Yashiro Y, Tai XG, Toyo-oka K, Hamaoka T, Yagita H, Okumura K, Neben S, Fujiwara H (1998) *J Immunol* 160:5790-5796.
31. Holm AM, Sivertsen EA, Tunheim SH, Haug T, Ejerkevi V, Yndestad A, Aukrust P, Frøland SS (2004) *Clin Exp Immunol* 138:278-289.
32. Sarwal M, Chua MS, Kambham N, Hsieh SC, Satterwhite T, Masek M, Salvatierra O, Jr (2003) *N Engl J Med* 349:125-138.
33. Gimino VI, Lande JD, Berryman TR, King RA, Hertz MI (2003) *Am J Respir Crit Care Med* 168:1237-1242.
34. Flechner SM, Kurian SM, Head SR, Sharp SM, Whisenant TC, Zhang J, Chismar JD, Horvath S, Mondala T, Gilmartin T, et al. (2004) *Am J Transplant* 4:1475-1489.
35. Stegall M, Park W, Kim D, Kremers W (2002) *Am J Transplant* 2:913-925.
36. Jeon MS, Atfield A, Venuprasad K, Krawczyk C, Sarao R, Bily C, Yang C, Arya S, Bachmaier K, Su L, et al. (2004) *Immunity* 21:167-177.
37. Ashton-Chess J, Brouard S, Souillou JP (2006) *Transplant Int* 19:539-548.
38. Horwitz PA, Tsai EJ, Pitt ME, Gilmore JM, Lepore JJ, Parmacek MS, Kao AC, Desai SS, Goldberg LR, Brozna SC, et al. (2004) *Circulation* 110:3815-3821.
39. Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, Billingham M, Marboe CC, Berry G, Kobashigawa J, Johnson FL, Starling RC, Murali S, et al. (2006) *Am J Transplant* 6:150-160.
40. Fujino M, KY, Kawasaki M, Funeshima N, Kimura H, Nakajima T, Saito H, Li XK (2004) *Liver Transplant* 10:379-391.
41. Gagne K, Brouard S, Guillet M, Cuturi MC, Souillou JP (2001) *Eur J Immunol* 31:3111-3120.
42. Knechtle SJ, Burlingham WJ (2004) *Transplantation* 77:936-939.
43. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S (2003) *Science* 299:1057-1061.
44. Weiner HL (2001) *Microbes Infect* 3:947-954.
45. Chua MS, Barry C, Chen X, Salvatierra O, Sarwal MM (2003) *Am J Transplant* 3:17-22.
46. Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, Moreau A, Souillou JP, Brouard S (2006) *Transplantation* 81:398-407.
47. Alvarez CM, Opelz G, Giraldo MC, Feliz S, Renner F, Weimer R, Schmidt J, Arbelaez M, Garcia LF, Susal C (2005) *Am J Transplant* 5:746-756.
48. Graca L, Chen TC, Moine AL, Cobbold SP, Howie D, Waldmann H (2005) *Trends Immunol* 26:130-135.
49. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, Campbell FM, Cascalho M, Collins AB, Demetris AJ, et al. (2007) *Am J Transplant* 7:518-526.
50. Colvin RB (2007) *J Am Soc Nephrol* 18:1046-1056.
51. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Borsini SM, Castro MC, Cavallo T, Croker BP, Demetris AJ, Drachenberg CB, Fogo AB, et al. (1999) *Kidney Int* 55:713-723.
52. Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998) *Proc Natl Acad Sci USA* 95:14863-14868.

1.2. Résumé de l'article I

La survie à long terme des allogreffes nécessitent généralement une immunosuppression à vie à l'origine d'effets secondaires important comme une néphrotoxicité (Nankivell, Borrows *et al.* 2004). Il est rare que les receveurs ayant reçu une transplantation rénale présentent une tolérance « opérationnelle » spontanée avec une fonction du greffon stable en l'absence d'immunosuppression. Le manque de marqueurs biologiques de ce phénomène empêche l'identification de patients potentiellement tolérants chez qui l'immunosuppression pourrait être diminuée et empêche le développement de nouvelles stratégies d'induction de tolérance. L'objectif de cette étude est d'identifier des biomarqueurs sanguins de la tolérance « opérationnelle » et d'utiliser ces biomarqueurs afin de déterminer la fréquence de cet état chez des patients sous immunosuppression avec une fonction rénale stable. Le profil d'expression des gènes issus du sang périphérique d'une cohorte de patients transplantés rénaux (tolérance « opérationnelle » : n=17 ; rejet aigu : n=14 ; rejet chronique : n=22 ; fonction rénale stable sous immunosuppression : n=22) et de seize individus sains a été analysé. Une partie des échantillons a été utilisée pour l'analyse des trois différents groupes de patients (tolérance « opérationnelle », rejet chronique et individus sains) et a permis d'identifier une « empreinte transcriptionnelle » de quarante-neuf gènes spécifiques de la tolérance. Ces gènes ont été utilisés pour la prédiction de la tolérance « opérationnelle » sur un groupe indépendant de patients test (patients tolérants et patients en rejet chronique). Trente-trois de ces quarante-neuf gènes suffisent pour discriminer correctement les phénotypes de tolérance et de rejet chronique avec une spécificité de 99% et de 86% respectivement par PCR en temps réel. Cette signature a été retrouvée chez cinq patients sur dix sous faible dose de stéroïdes en monothérapie (<10 mg/j) et chez un patient sur douze présentant une fonction rénale stable sous trithérapie (mycophénolate mofétil ou azathioprine, stéroïdes avec (n=5) ou sans (n=7) inhibiteurs des calcineurines). Cette signature transcriptionnelle suggère une diminution de la signalisation de la costimulation, une quiescence immunitaire et une réponse des cellules T mémoires chez les patients « opérationnellement » tolérants.

1.3. Discussion de l'article I

1.3.1. Analyse non supervisée

Une analyse non supervisée a été réalisée à partir des gènes exprimés dans le sang de quarante-cinq patients : onze patients « opérationnellement » tolérants (TOL) ; onze patients en rejet chronique (CR) ; un patient en rejet chronique (prouvé par biopsie) ayant perdu les critères de la tolérance « opérationnelle » quatre ans après l'arrêt de son traitement (#) ; dix patients avec une fonction rénale stable sous faible dose de stéroïdes en monothérapie (MIS : *Minimal Immunosuppression*) ; douze patients avec une fonction rénale stable sous trithérapie (STA). Les gènes retenus pour la classification présentent une différence d'expression d'au moins trois fois entre les différents groupes.

Ainsi, 2986 gènes ont été retenus et permettent une bonne ségrégation des patients tolérants et des patients en rejet chronique par une classification hiérarchique non supervisée comme le montre la Figure 14 A). De plus, quatre patients MIS et un patient STA sont classés dans la même branche du dendrogramme que les patients tolérants. Quatre patients sous dialyse ne recevant plus de traitement immunosuppresseur (■) ont été inclus afin d'étudier l'impact du traitement sur la signature transcriptionnelle. Ces patients sont classés dans la même branche du dendrogramme que les patients en rejet chronique. Ceci indique donc que l'effet du traitement est moins fort que le phénotype du rejet chronique. Si les patients en rejet chronique sans traitement étaient classés dans une branche à part ou bien s'ils étaient classés avec les patients « opérationnellement » tolérants, alors nous aurions conclu que la signature était dépendante du traitement immunosuppresseur.

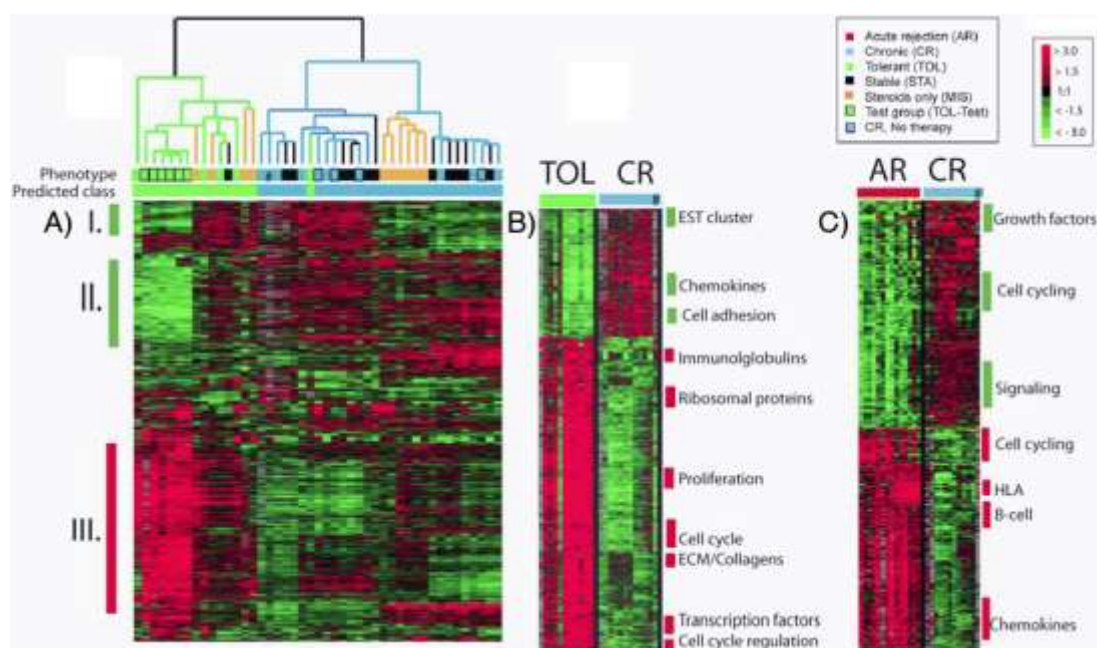


Figure 14 : Classification hiérarchique non-supervisée des patients.

A) Classification non-supervisée des 2986 gènes sur 45 patients. Quatre CR sous dialyse et sans immunosuppression (■) sont groupés avec d'autres CR, STA et MIS. Les patients présentant le phénotype de tolérance (T1 à T4, TT1 à TT6, MIS1, MIS3, MIS6, MIS9 et S9) appartiennent à une branche du dendrogramme bien distincte. **B)** 893 gènes ont été déterminés par l'analyse SAM discriminant les TOL des CR (FDR<0,01). **C)** 982 clones correspondants à 578 gènes connus ont été déterminés par l'analyse SAM discriminant les patients en rejet aigu (AR) des patients en rejet chronique (CR).

Trois clusters de gènes majeurs ont été identifiés permettant la discrimination des TOL et des CR (Figure 14, Tableau 2). L'enrichissement des familles de gènes au sein de ces trois groupements a été calculé grâce au logiciel EASE. Le cluster I suggère une quiescence du système immunitaire chez les patients « opérationnellement » tolérants par rapport aux patients en rejet chronique. En effet, les marqueurs classiques de l'activation lymphocytaire T (CD69 (Sancho, Gomez *et al.* 2005), TACTILE (Fuchs, Cella *et al.* 2004), LAG3 (Grosso, Kelleher *et al.* 2007; Yi, Zhen *et al.* 2006) ou SLAM (Ostrakhovitch and Li 2006)), les gènes associés à la cytotoxicité (granzyme, perforine, fas (Russell and Ley 2002) et granulysine (Pena and Krensky 1997)) ainsi que les gènes caractéristiques de la réponse Th1/Th2 (TNF α , IL-4 et IL-10) ont une expression diminuée chez les patients tolérants. De plus, 90 % des gènes codant pour les cytokines pro-inflammatoires ont une expression réduite chez les patients « opérationnellement » tolérants par rapport aux patients en rejet chronique.

Le cluster II contient plusieurs gènes relatifs à la transduction du signal (JAK1, LCP2, RAB1A, RAPIA) et des gènes codant des protéines se liants à l'ADN (NFATC1, IRF2, TBRG1, TRIM26) significativement diminués. Le cluster III contient des gènes relatifs à la régulation du cycle cellulaire significativement augmentés chez les patients « opérationnellement » tolérants par rapport aux patients en rejet chronique avec un enrichissement de gènes exprimés durant la mitose (MCM5, -6, -7, Survivin, CyclinA2, B1, D1) et le processus énergétique cellulaire (ATP5F1, -5J, -5O, -5G2, C1QBP, TIMM8B).

Tableau 2 : Enrichissement des familles de gènes.

	Gènes représentatifs
Cluster I	
Réponse immunitaire	GZMA, -B, -C, KLRK1, LY64
Réponse au stress	MAP4K1, SCAP1, ZAP70
Communication cellulaire	BIN2, CCL5, CD3E, CD5, IL17R, ITPR1
Activité protéine kinase	SYK, STK4, ITK, STK39, ZAP70
Transduction du signal	ADRB2, AKAP10, HLA-DPA1, IL16
Modifications post-traductionnelles	STK39, PTPN22, SIAT4A, SYK
Régulation de la prolifération cellulaire	CD3E, MXD4, PCAF, SLAMF1
Réponse immunitaire innée	NCR3, LY64, CCL5, IL18RAP
Cluster II	
Transduction du signal	JAK1, LCP2, RAB1A, RAPIA
Fixation à l'ARN	RBM5, CUGBP2, DHX9, HDLBP
Cascade de signalisation intracellulaire	ABL2, FYN, LIMK1, RHOH
Réponse immunitaire	CD74, CD2, FN1, TRIM, IL2RB
RNA processing	HNRPK, HNRPU, ROD1, SF1
Fixation à l'ARN double brin	DHX9, MBNL1, PRKRA
Réponse immunitaire humorale	OCIL, IL7R, LY9, POU2F2, PAG
Fixation à l'ADN	NFATC1, IRF2, TBRG1, TRIM26
Cluster III	
Cycle cellulaire (mitose)	MCM5, -6, -7, Survivin, CyclinA2, B1, D1
Régulation du cycle cellulaire	BUB1, CDC2, -20, -25C, CDKN3, -N2A
Transport d'électron	COX11, ETFA, GPX4, PLOD, TXNL2
Activité mitochondriale	ATP5F1, -5J, -5O, -5G2, C1QBP, TIMM8B
Croissance cellulaire	ENO1, FHL1, TSG101, SOCS5, LTBP4
Fixation aux facteurs de croissance liés à l'insuline	CTGF, CYR61, ESM1, IGFBP3, NOV
Migration cellulaire	JAG1, FEZ2, RTN4, SDCBP, LAMA1
Cytosquelette	FLNA, DST, GAS2, MYO1B, -5B
Homéostasie calcique	CXCL12, CCL2, -15, -19, S10B, STC1

1.3.2. Identification d'un groupe de gènes liés à la tolérance « opérationnelle »

Cette étude a permis d'identifier quarante-neuf gènes discriminant les patients « opérationnellement » tolérants (TOL) de ceux en rejet chronique (CR) ainsi que les individus sains (N) par une analyse prédictive par l'utilisation du logiciel PAM. Le Tableau 3 résume les différences d'expressions (*fold change*) de ces quarante-neuf gènes entre les différents groupes.

L'expression de ces quarante-neuf gènes permet de discriminer les huit individus sains et les onze patients en rejet chronique ainsi que quatre patients tolérants sur cinq avec une spécificité de 100% et une sensibilité de 90%. Afin de valider le modèle, un test de prédiction sur six nouveaux patients tolérants indépendants a été réalisé. Tous les nouveaux patients tolérants sont prédits comme TOL avec une sensibilité > 99 %. Par la suite, un test de prédiction a été réalisé sur vingt-deux patients sous traitement immunosuppresseur (MIS et STA). Cinq patients MIS sur dix et un patients STA sur douze partagent la signature de tolérance avec une sensibilité > 90%.

Tableau 3 : Liste des 49 gènes (Article I).

Symbole	Gene	TOL vs N	TOL vs CR	N vs CR	TOL vs AR
AFP*†	Alpha-fetoprotein	5.09	4.4	0.87	4.83
AKR1C1	Aldo-keto reductase family 1, member C1	4.02	4.45	1.11	2.81
AKR1C2	Aldo-keto reductase family 1, member C2	4.08	4.35	1.07	2.17
AREG	Amphiregulin (growth factor)	7.35	1.62	0.22	3.57
BRRN1	Barren homolog (Drosophila)	5.27	2.88	0.55	1.53
BTLA	B and T lymphocyte associated	0.22	0.76	3.51	0.31
BUB1B*	BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles 1	3.87	2.22	0.57	1.91
C1S†	Complement component 1, s subcomponent	9.08	3.66	0.4	4.19
CCL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	10.79	6.17	0.57	5.15
CDC2*†	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	6.06	2.96	0.49	2.34
CDH2*†	Cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	8.54	5.61	0.66	3.22
CHEK1*	CHK1 checkpoint homolog (S. pombe)	6.02	2.97	0.49	1.86
D2S448	Melanoma associated gene	5.24	3.96	0.76	1.41
DEPDC1	DEP domain containing 1	4.96	2.54	0.51	2.75
DHRS2	Dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2	8.15	7.47	0.92	5.06
ELF3	E74-like factor 3 (transcription factor)	6.34	2.92	0.46	1.83
FLJ10036	Zwilch	3.5	2.34	0.67	0.97
GAGE2	G antigen 7	5.04	4.2	0.83	1.93
HBB	Hemoglobin, β	0.14	0.43	3.03	0.25
IGFBP3†	Insulin-like growth factor binding protein 3	4.51	2.63	0.58	6.83
IL13RA2	Interleukin 13 receptor, alpha 2	5.48	3.1	0.56	2.1
LTB4DH†	Leukotriene B4 12-hydroxydehydrogenase	6.57	4.08	0.62	0.86
MS4A1*†	CD20 Antigen	0.18	0.88	4.85	0.36
MTHFD2	Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	4.54	2.23	0.49	1.87
NR2F1	Nuclear receptor 2F1	4.97	3.92	0.79	4.34
PARVG	Parvin, gamma	4.78	5.17	1.08	3.4
PCP4	Purkinje cell protein 4	8.12	7.15	0.88	4.83
PLEKHC1	Pleckstrin homology domain C1	6.55	2.53	0.39	1.66
PLXNB1	Plexin B1	4.61	2.16	0.47	1.53
PODXL†	Podocalyxin-like	5.88	2.68	0.46	3.01
PPAP2C	Phosphatidic acid phosphatase type 2C	9.55	4.95	0.52	3.71
RAB30	RAB30, member RAS oncogene family	0.16	0.56	3.48	0.3
RASGRP1	RAS guanyl releasing protein 1	0.17	0.19	1.07	0.49
RBM9	RNA binding motif protein 9	9.07	6.7	0.74	3.37
RGN	Regucalcin (senescence marker protein-30)	7.81	4.03	0.52	2.24
RHOH	Ras homolog gene family, member H	0.13	0.27	2.09	0.33
SERPINA3 *	Alpha-1 antiproteinase, antitrypsin 3	5.24	3.51	0.67	2.89
SERPINA5	Alpha-1 antiproteinase, antitrypsin 5	6.24	6.14	0.98	3.21
SLC29A1†	Solute carrier family 29A1 (nucleoside transporters)	3.47	2.02	0.58	0.78
SMILE	SMILE protein	4.37	2.53	0.58	1.18
SOX3 *	SRY (sex determining region Y)-box 3	4.55	3.51	0.77	2.09
SP5	Sp5 transcription factor	7.37	3.81	0.52	2.26
SPON1	Spondin 1, extracellular matrix protein	5.7	4.68	0.82	1.94
STK6 *	Serine/threonine kinase 6	4.8	4.24	0.88	3.24
SYNGR3	Synaptogyrin 3	3.35	2.19	0.65	1.31
TACC2	Transforming, acidic coiled-coil containing protein 2	3.78	2.93	0.77	2.76
TBX3	T-box 3 (ulnar mammary syndrome)	5.07	3.34	0.66	2.28
TK1*	Thymidine kinase 1, soluble	5.02	5.29	1.05	3.15
TLE4	Transducin-like enhancer (sp1) homolog)	0.15	0.17	1.15	0.47

* gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire.

† gènes connus pour être régulés par le TGF- β .

1.3.3. Pertinence de la signature transcriptionnelle de la tolérance

Afin de tester le recoupement des gènes sanguins différenciellement exprimés entre le rejet aigu (AR), le rejet chronique (CR) et la tolérance (TOL), le sang de quatorze patients a été prélevé au moment du diagnostic histologique d'un rejet aigu et a été testé sur les puces à ADN. SAM a identifié 893 gènes différenciellement exprimés entre les patients « opérationnellement » tolérants et les patients en rejet chronique (Figure 14B) et 982 gènes différenciellement exprimés entre les patients en rejet chronique et les patients en rejet aigu (Figure 14C). Parmi ces deux listes, moins de 4% des gènes sont communs. De plus, l'abondance des transcrits identifiés par une analyse discriminative de classes (PAM) entre les TOL, N, AR et CR montre que les plus grandes différences d'expression des gènes sont retrouvées entre les patients en rejet chronique et les patients « opérationnellement » tolérants (Figure 1D – Article I). Ceci prouve que la signature de la tolérance « opérationnelle » est différente de la signature du rejet aigu.

1.3.4. Validation de la liste de gènes

Afin de valider cette signature, l'expression des quarante-neuf gènes ainsi que des gènes de la littérature associés à la tolérance (FOXP3 (Cobbold, Castejon *et al.* 2004), GITR (Shimizu, Yamazaki *et al.* 1999) et la neuropiline-1 (Bruder, Probst-Kepper *et al.* 2004)) a été testé par la technique de PCR en temps réel dans le sang de nouveaux patients indépendants (six patients tolérants et six patients en rejet chronique) et dans le sang de sept patients sous traitement immunosuppresseur avec une fonction rénale stable déjà testés par les puces à ADN (S2, S3, S7, S8, S9, S10 et S12). Des quarante-neuf gènes, trente-trois ont été retrouvés exprimés en PCR en temps réel. Treize des trente-trois gènes exprimés sont significativement exprimés (Figure 15A). L'expression du gène FOXP3 est significativement augmentée chez les patients tolérants par rapport aux patients en rejet chronique ($P=0,009$). La différence d'expression des gènes de la neuropiline-1 et du GITR entre les patients « opérationnellement » tolérants et les patients en rejet chronique n'est pas significative mais on note une augmentation de deux et huit fois respectivement entre les patients tolérants et les patients en rejet chronique.

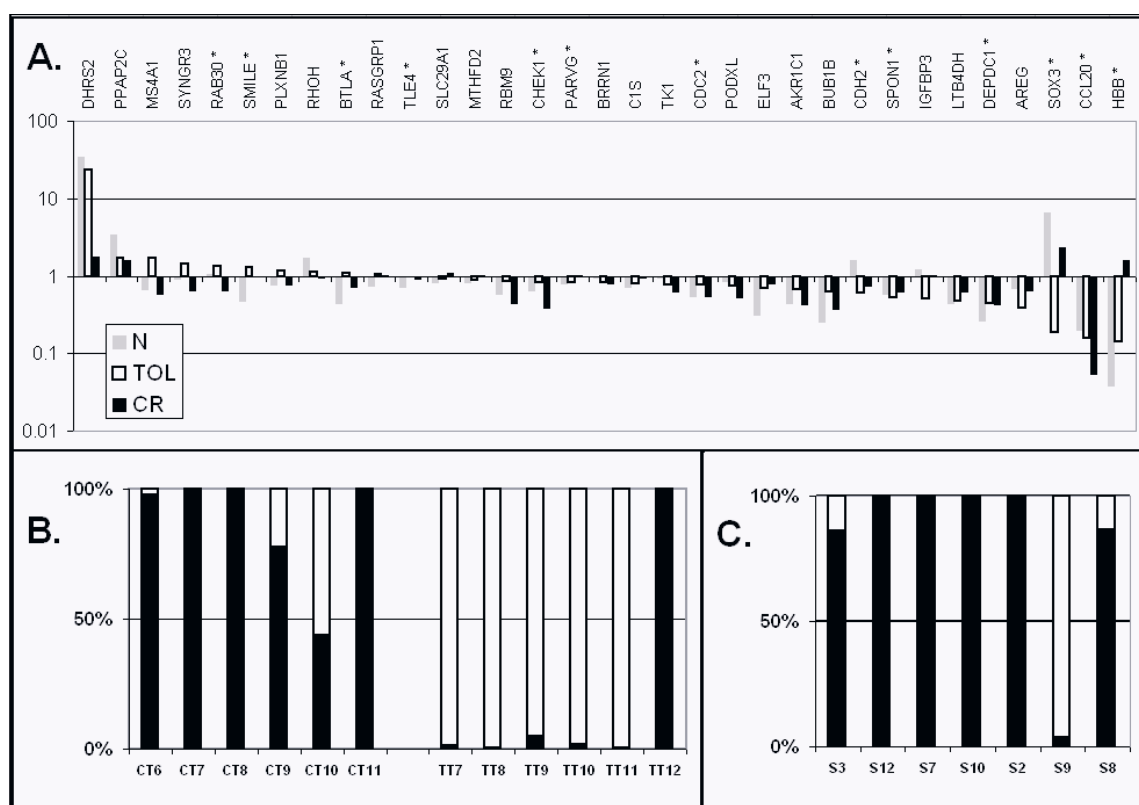


Figure 15 : Prédiction de la signature de la tolérance « opérationnelle » dans le sang de nouveaux patients tolérants et de patients en rejet chronique indépendants par RT-PCR.

A) Expression médiane des trente-trois gènes les plus abondants par la technique de RT-PCR sur les sept patients sains (N1 à N7), sur six nouveaux patients indépendants en rejet chronique (CT6 à CT11) et sur six nouveaux patients indépendants « opérationnellement » tolérants (TT7 à TT12). Les gènes significativement exprimés entre les patients tolérants et les patients en rejet chronique sont indiqués par un astérisque. **B)** Analyse prédictive par validation croisée des trente-trois gènes par le logiciel PAM. Le patient TT12 ne présente pas la signature de la tolérance (barre noire). Ce patient a développé un rejet chronique six mois après le prélèvement sanguin. **C)** Le test de prédiction de classe sur l'expression de ces trente-trois chez les patients stable indique que le patient S9 partage la signature de la tolérance (barre blanche).

Enfin, la valeur prédictive de l'expression de ces trente-trois gènes mesurée par RT-PCR a été testée par le logiciel PAM (Figure 15B et C). La validation croisée sur les patients tolérants et les patients en rejet chronique prédit correctement ces patients sauf pour le patient tolérant TT12. Au moment du prélèvement, ce patient remplissait les critères de la tolérance « opérationnelle ». Six mois après le prélèvement sanguin, ce patient présentait des signes de dysfonction du greffon (créatinémie : 165 μ mol/l ; protéinurie : 1g/j). La biopsie a révélé des

signes de rejet chronique avec la présence d'anticorps anti-donneur. De plus, le test de prédiction des patients sous traitement immunosuppresseur avec une fonction rénale stable indique que le patient S9 partage la signature de la tolérance. Ce résultat est en accord avec la prédiction réalisée sur l'expression des gènes mesurée par les puces à ADN (Figure 1 de l'article I).

1.4. Conclusion de l'article I

Cette étude a permis d'identifier un groupe de quarante-neuf gènes correspondant à une signature sanguine de la tolérance « opérationnelle » chez les patients greffés rénaux. Cette signature a été validée par PCR en temps réel sur de nouveaux patients indépendants. De plus, le patient tolérant TT12 a été identifié comme étant en rejet chronique six mois avant la confirmation histologique. Par ailleurs, le patient sous traitement avec une fonction rénale stable (S9) a été prédit comme étant tolérant par PCR en temps réel et par les puces à ADN. Ceci suggère que cette signature possède une valeur pronostique qui doit être confirmée sur une cohorte de patients plus importante.

Cette signature va être recherchée dans le sang de deux-cent patients sous traitement immunosuppresseur avec une fonction rénale stable. Le but est d'identifier les patients qui pourrait entrer dans un protocole de minimisation programmée et progressive de leur traitement immunosuppresseur.

2. Article II

*Tolérance « opérationnelle » sans traitement
immunosuppresseur chez des patients
transplantés rénaux : I. Analyse statistique de
l'expression des gènes sanguins.*

Christophe Braud^{*}, Dominique Baeten^{*}, Magali Giral, Annaïck Pallier, Joanna Asthon-Chess, Cécile Braudeau, Catherine Chevalier, Alice Le Bars, Jean Léger, Anne Moreau, Eugenia Pechkova, Claudio Nicolini, Jean-Paul Soulillou[‡] et Sophie Brouard[‡].

^{*,‡} Les auteurs ont contribué de manière égale à ce travail

Publié dans *Journal of Cellular Biochemistry*, 2007, In press

Titre original : *Immunosuppressive Drug-Free Operational Immune Tolerance in Human Kidney Transplant Recipients: I. Blood Gene Expression Statistical Analysis.*

Immunosuppressive Drug-Free Operational Immune Tolerance in Human Kidney Transplant Recipients: I. Blood Gene Expression Statistical Analysis

Christophe Braud,^{1,2} Dominique Baeten,^{2,3} Magali Giral,^{1,4} Annaïck Pallier,¹ Joanna Ashton-Chess,¹ Cecile Braudeau,¹ Catherine Chevalier,⁵ Alice Lebars,⁵ Jean Léger,⁵ Anne Moreau,⁴ Eugenia Pechkova,⁶ Claudio Nicolini,^{6*} Jean-Paul Souillou,^{1,2,4} and Sophie Brouard^{1**}

¹Institut de Transplantation Et de la Recherche en Transplantation (ITERT), INSERM U643, Nantes, F-44093 France

²Université de Nantes, Faculté de médecine, Nantes, F-44000 France

³Clinical Immunology and Rheumatology, Academic Medical Center/University of Amsterdam, Meibergdreef 9, 1105 AZ Amsterdam, The Netherlands

⁴CHU Nantes, Institut de Transplantation Et de la Recherche en Transplantation (ITERT), Nantes, F-44093 France

⁵INSERM U533, Faculté de Médecine, Nantes, F-44035 France

⁶Nanoworld Institute-CIRSDNNOB University of Genova and Fondazione Elba, Italy

Abstract Survival of solid organ grafts depends on life-long immunosuppression, which results in increased rates of infection and malignancy. Induction of tolerance to allografts would represent the optimal solution for controlling both chronic rejection (CR) and side effects of immunosuppression. Although spontaneous "operational tolerance" can occur in human kidney transplantation, the lack of noninvasive peripheral blood biological markers of this rare phenomenon precludes the identification of potentially tolerant patients in whom immunosuppression could be tapered as well as the development of new tolerance inducing strategies. Here, the potential of high throughput microarray technology to decipher complex pathologies allowed us to study the peripheral blood specific gene expression profile and corresponding EASE molecular pathways associated to operational tolerance in a cohort of human kidney graft recipients. In comparison with patients with CR, tolerant patients displayed a set of 343 differentially expressed genes, mainly immune and defense genes, in their peripheral blood mononuclear cells (PBMC), of which 223 were also different from healthy volunteers. Using the expression pattern of these 343 genes, we were able to classify correctly >80% of the patients in a cross-validation experiment and classified correctly all of the samples over time. Collectively, this study identifies a unique PBMC gene signature associated with human operational tolerance in kidney transplantation by a classical statistical microarray analysis and, in the second part, by a nonstatistical analysis. *J. Cell. Biochem.* 9999: 1–13, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: gene expression; DNA microarray; kidney transplant; transplant tolerance; chronic rejection

This article contains supplementary material, which may be viewed at the Journal of Cellular Biochemistry website at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/0730-2312/suppmat/index.html>.

Christophe Braud, Dominique Baeten, Jean-Paul Souillou (Senior), and Sophie Brouard (Senior) contributed equally to this work^{Q1}.

Grant sponsor: [PHRC-Genhomme-2003 grant](#)^{Q2}; Agence de la Biomedecine (France); Progreffe foundation (Nantes, France); TeLand; Ministero dell'Istruzione, Università e Ricerca (MIUR).

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

*Correspondence to: Claudio Nicolini, CIRSDNNOB, University of Genova, Corso Europa 30, 16132 Genoa, Italy.

E-mail: manuscript@ibf.unige.it

**Correspondence to: Sophie Brouard, INSERM U643, 30, Bd Jean Monnet, F-44093 Nantes cedex 1, France.

E-mail: Sophie.Brouard@univ-nantes.fr

Received 19 June 2007; Accepted 16 August 2007

DOI 10.1002/jcb.21574

Published online 00 Month 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

Induction of operational tolerance [Ashton-Chess et al., 2006], clinically defined as “the absence of acute and chronic rejection and indefinite graft survival with normal function in an immunosuppressive free and fully immunocompetent host” [Ansari and Sayegh, 2004], is regarded as the optimal solution for both chronic rejection (CR) and side effects of standard immunosuppression [Dantal et al., 1998; Souillou, 2001] in patients with solid organ transplantation. Several therapeutic strategies have been shown to induce operational tolerance in experimental models [Cobbold et al., 2006; Ballet et al., 2007], but are turning out to be difficult to apply in the clinic. However, accumulating evidence indicates that a state of operational tolerance can indeed occur in human graft recipients: immunosuppression can be completely withdrawn in 25% of liver recipients [Takatsuki et al., 2001; Martinez-Llordella et al., 2007] and some kidney recipients display spontaneous operational tolerance years after immunosuppressive treatment interruption [Roussey-Kesler et al., 2006]. A better understanding of this rare but biologically and medically important phenomenon may help to guide progressive immunosuppressive drug minimization in selected patients as well as to develop monitoring of new tolerance induction protocols in humans [Fudaba et al., 2006].

Several mechanisms may contribute to the spontaneous acceptance of a kidney graft. We have previously described the clinical features of drug free operational tolerance in kidney transplantation [Ballet et al., 2006; Roussey-Kesler et al., 2006]. We have shown that most of these patients display an altered T cell receptor (TCR) repertoire usage with a unique pattern of inflammatory cytokine transcripts in T cells with skewed TCR usage [Brouard et al., 2005] as well as CD4 and CD8 lymphocyte phenotypes distinct from patients with CR but close to those of normal individuals [Baeten et al., 2006; Louis et al., 2006]. However, none of these observations have yet been convincingly validated as being functionally involved in operational tolerance in humans. Therefore, the identification of the peripheral blood molecules associated with drug-free operational tolerance in kidney graft recipients remains an important and challenging issue.

High throughput methods such as microarrays have expanded our ability to study

complex pathological situations such as cancers [Alon et al., 1999; Alizadeh et al., 2000; van de Vijver et al., 2002; Glas et al., 2005; Becker et al., 2006], cardiovascular disease [Hiltunen et al., 2002; Tuomisto et al., 2003], autoimmune disorders [Chabas et al., 2001; Lock et al., 2002; Baechler et al., 2003; Bennett et al., 2003; Peterson et al., 2004; Kasperkovitz et al.,], glomerular kidney diseases [Luckow et al., 2004], and organ transplantation [Stegall et al., 2002; Man et al., 2003; Sarwal et al., 2003; Flechner et al., 2004; Horwitz et al., 2004; Hotchkiss et al., 2006]. Recently, Martinez-Llordella et al. [2007] reported a specific gene signature in blood from liver transplant recipients who had been successfully weaned from immunosuppressive drugs. In the current study, we report a differential transcriptional pattern, consisting mainly of immune and defense genes, in peripheral blood of patients who are operationally tolerant to kidney grafts compared to patients with CR and healthy volunteers (HV). Data of nonstatistical bioinformatics gene analysis based on classification of “key genes” are presented in the twin article [Sivo et al., 2007^{Q4}].

MATERIALS AND METHODS

Patients

Thirty-four individuals were included in the study. The protocol was approved by the University Hospital Ethical Committee and the Committee for the Protection of Patients from Biological Risks of the University Hospital. All patients signed a written informed consent before inclusion.

The study included:

- (a) Eight drug-free operationally tolerant (TOL) patients, defined as kidney graft recipients with stable graft function (blood creatinemia $< 150 \mu\text{mol/L}$, proteinuria $< 1 \text{ g/24 h}$) for at least 1 year (mean 6.4 years, range 1.6–17.2 years) after complete interruption of immunosuppressive therapy. Thus, this disruption is based on clinical and stable graft function years after withdrawal of all immunosuppressive drugs. Stable graft function was defined by the absence of 30% or more variation of the baseline creatinemia. Biopsies were not recommended by the ethical committee and refused by the patients. Immunosuppressive treatment, including corticosteroids, was

Blood Gene Expression Statistical Analysis^{Q2}

3

stopped due to non-compliance (TOL01, 04, 05, 06, 07 and TOL08), post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) (TOL03), or calcineurin inhibitor toxicity (TOL02). The clinical and biological characteristics of the operationally tolerant patients have been described in detail previously [Roussey-Kesler et al., 2006]; the most relevant demographic and clinical data are summarized in Table I. Four out of the 8 TOL patients (TOL01 to TOL04) were sampled and analyzed at two different time points with an interval of at least 16 months (mean 25.8 months, range 16–31 months). These patients fulfilled all clinical and biological criteria of drug-free operational tolerance at the different studied time points. Serially harvested samples are denoted by an asterisk.

- (b) Eighteen kidney graft recipients with CR: All patients had a progressive degradation of their renal function (blood creatinemia $\geq 150 \mu\text{mol/L}$, proteinuria $\geq 1 \text{ g/24 h}$). CR was diagnosed on a graft biopsy according to the updated Banff criteria [Solez et al., 2007]. CR was defined by histological signs of chronic allograft arteriopathy (arterial intimal fibrosis with mononuclear cell infiltration) and/or transplant glomerulopathy with glomerular double contours: 15/18 patients had a transplant glomerulopathy, 10/18 had an "active humoral component" [Solez et al., 2007] as demonstrated by the presence of C4d together with circulating anti-HLA antibodies. One of the patients had C4d deposits but no circulating anti-HLA antibodies and another patient did not show C4d deposits but did have circulating anti-HLA antibodies. Three CR patients (CR001 to CR003) were also sampled and analyzed at two time points with an interval of at least 12 months (mean 25.8 months, range 12–36 months). To assess the role of maintenance immunosuppressive treatment on the gene expression pattern, this population of 18 patients consisted of 15 patients under immunosuppressive treatment (CR001 to CR006, CR010 to CR013) and three patients with CR (CR007 to CR009) in whom immunosuppression was completely stopped and dialysis was recently restarted. Detailed demographic and clinical data are shown in Table I.
- (c) Eight age-matched HV were also included after informed consent. They all had a

normal blood formula and no infectious or other concomitant pathology for at least 6 months prior to the study (Table I).

RNA Preparation

Ten milliliters of peripheral blood were collected in EDTA tubes. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were separated on a Ficoll layer (Eurobio, Les Ulis, France) and frozen in Trizol[®] reagent (Invitrogen, Life Technologies, CA). One microgram of total RNA (tRNA) of each sample was subjected to amplification using the Amino Allyl MessageAmp[™] II aRNA Amplification Kit (Ambion, Austin, TX) according to the manufacturer's protocols. This method of RNA amplification has been extensively tested and validated for our microarray platform (see: http://cardioserve.nantes.inserm.fr/ptf-puce/publis_en.php#_4). In accordance with previous studies reporting that RNA amplification may induce significantly different expression ratios in approximately 10% of the genes [Nygaard et al., 2003], preliminary validation assays with 14 samples subjected to two independent amplifications showed differential expression of 13.7% of the analyzed genes (data not shown). In order to reduce this technical variability in the present study, each tRNA sample was amplified in duplicate and both duplicates were subsequently used for microarray hybridization and analysis. Quality and quantity of tRNA and amplified RNA (aRNA) was tested by an Agilent 2100 Bioanalyser[®] (data not shown). All aRNA samples were subsequently fragmented using RNA fragmentation Reagents (Ambion) according to the manufacturer's protocols. Fragmented aRNA of each sample was labeled with Cyanine 3 (Cy3; Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). As the reference for the hybridization, aRNA were prepared as described from PBMC of 169 kidney graft recipients with stable graft function and under standard immunosuppressive treatment. This referential aRNA was pooled and labeled with Cyanine 5 (Cy5). Cyanine incorporation and aRNA quantities were confirmed using a Nano-drop ND1000 spectrometer (data not shown).

Microarray Hybridizations

Six thousand eight hundred sixty-four genes of interest in immunology, apoptosis and cell signaling were selected to be used on a dedicated "immunology microarray" spotted on glass-slides.

TABLE I. Detailed Demographic and Clinical Definition of the Patients

ID	Class	Age (years)	Gender	Previous episode of acute rejection	Lymphoma status, cause	Episodic infection (CMV)	Time between graft and infection (months)	Crystalline Proteinuria (mg/dL)	Donor (Living vs. deceased)	Number of HLA mismatches	Medical treatment	Time between withdrawal and analysis (months)	Reason of immunosuppression withdrawal	Histopathology	Cell staining	Anti-HLA antibody	Allograft glomerulopathy
TOL01*	TOL	26	M	0	0	0	55.9	119	0	0	0	37	Unresponsive	—	—	—	—
TOL02*	TOL	74	F	0	0	0	127.0	96	0.60	0	0	11.0	CAA toxicity	—	—	—	—
TOL03*	TOL	26	M	0	1	0	126.6	100	0.35	0	0	39	PTLD	—	—	—	—
TOL04*	TOL	57	M	0	0	0	155.5	82	0	0	0	26	Unresponsive	—	—	—	—
TOL05*	TOL	27	M	1	0	0	271.6	129	0.93	0	0	1.07	Unresponsive	—	—	—	—
TOL06	TOL	29	F	0	0	0	133.0	121	0	0	0	20	Unresponsive	—	—	—	—
TOL07	TOL	43	F	0	0	0	40.0	13	0.15	0	0	26	Unresponsive	—	—	—	—
TOL08	TOL	75	M	1	0	NA	420.0	134	0.23	0	0	207	Unresponsive	—	—	—	—
CE001*	CE	55	M	0	0	0	41.7	544	0.66	0	CNI + CC	—	—	0-3	0/4+	—	+
CE002*	CE	57	M	0	0	0	45.4	127	2.06	0	CNI + CC + CS	—	—	3	0/4+	—	+
CE003*	CE	73	F	0	0	1	26.7	200	0.86	0	CNI	—	—	3	0/4+	—	+
CE004*	CE	55	F	1	0	0	39.4	71	3.75	0	CNI + CC	—	—	1-2	0/4+	—	+
CE005*	CE	52	M	0	0	0	123.0	460	11.75	0	CNI + CC	—	—	NA	0/4+	—	NA
CE006*	CE	27	M	1	0	0	153.3	201	7.4	0	CNI + CC	—	—	1	0/4+	—	+
CE007*	CE	72	M	0	0	0	67.2	HD	NA	0	0	—	—	3	0/4+	—	+
CE008*	CE	20	M	0	0	0	58.7	HD	NA	0	0	—	—	3	0/4+	—	+
CE009*	CE	50	F	0	0	0	42.8	HD	NA	0	0	—	—	3	0/4+	—	+
CE010	CE	51	F	0	0	0	47.2	160	0.55	0	CNI + CC	—	—	3	0/4+	—	+
CE011	CE	55	M	0	0	0	157.9	544	9.66	0	CNI + CC	—	—	3	0/4+	—	+
CE012	CE	59	F	1	0	0	97.1	264	3.66	0	CNI + CC	—	—	3	0/4+	—	+
CE013	CE	42	F	1	0	1	126.3	186	3.66	0	CNI + CC + CS	—	—	NA	0/4+	—	+
CE014	CE	63	F	0	0	0	37.0	254	3.22	0	CNI	—	—	3	0/4+	—	+
CE015	CE	70	F	0	0	0	49.0	264	0.24	0	CNI + CC	—	—	3	0/4+	—	+
CE016	CE	50	F	0	0	NA	220.0	212	4.03	0	CNI + CC	—	—	3	0/4+	—	+
CE017	CE	58	M	0	0	0	35.0	267	4	0	CNI + CC + CS	—	—	3	0/4+	—	+
CE018	CE	27	M	0	0	0	50.0	135	1	0	CNI + CC + CS	—	—	3	0/4+	—	+
HV001	HV	42	F	0	0	0	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—
HV002	HV	44	M	0	0	0	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—
HV003	HV	41	F	0	0	0	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—
HV004	HV	29	F	0	0	0	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—
HV005	HV	54	F	0	0	0	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—
HV006	HV	51	F	0	0	0	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—
HV007	HV	54	F	0	0	0	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—
HV008	HV	50	M	0	0	0	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—

Tolerant (TO L) patients presented a highly stable kidney function for years after complete withdrawal of immunosuppression. Only one tolerant patient was a recipient of a deceased mismatched graft. Chronic rejection was confirmed by histology in all patients. The histological definition was based on the new Banff 2005 recommendations (Solez et al., 2007). HD, hemodialysis; Liv, living donor; Dec, deceased donor; CNI, calcineurin inhibitor; CS, corticosteroids; CC, CellCept; Csa, cyclosporin A; PTLD, post-transplant lymphoproliferative disorders.

*Patients used in the previous pangenomics experiments.

Blood Gene Expression Statistical Analysis^{Q2}

5

The genes were selected based on literature data, on data obtained in other immunological and cancer fields (IFR26, West Genopole, Nantes, France), and on our previous experiments with pangenomic arrays on 6 TOL and 8 CR, which had allowed us to select 520 unique genes (data not shown). These patients are denoted by superscript "a" in Table I. Detailed information on the microarray is available online (http://cardioserve.nantes.inserm.fr/ptf-puce/cancerchip-s_en.php). A set of 50-mer oligonucleotides corresponding to these 6,864 genes was spotted on the arrays, with each oligonucleotide being spotted in triplicate in order to reduce the technical variability of the assay. Subsequently, 1 µg of Cy5-labeled reference aRNA and 1 µg of Cy3-labeled sample aRNA were hybridized on the array for 16 h at 42°C in a sealed chamber (Telechem Int., Sunnyval, CA). Validation assays on 28 samples indicated a high correlation between the two hybridizations arising from the same sample, with an R^2 of 0.764 (± 0.09) (data not shown). Since each RNA sample was amplified in duplicate, one hybridization per aRNA was performed (one for each aRNA) leading to a total of six data points per sample. All replicates were used in order to reduce variability [Yang and Speed, 2002].

Microarray Analysis

Hybridized slides were scanned by fluorescence confocal microscopy (ScanArray 3000, GSI-Lumonics) using independent laser excitation of the two fluorescent dyes at 532 and 633 nm at a 10 µm/pixel resolution. Fluorescence values and ratios were extracted with the GenePix Pro 5.1 software. For each fluorescent spot representing the hybridization with a nucleotide of a single gene, the average pixel intensity of the spot and the local background were computed and subtracted to obtain the net fluorescence intensity. The data were normalized using a lowest fit approach independently applied to each log ratio distributions [Golfier et al., 2004]. Significance levels (scaled fold) were computed by comparing the fluorescence intensity of the tested sample with that of the reference RNA for each spot of the microarray, using the VARAN error models (<http://www.bionet.espci.fr/varan/>). VARAN performs a signal intensity based analysis of the log₂ expression ratio variability deduced from the DNA microarray data. Considering the duplicates for the amplification and the triplicates for

each gene spotted on the microarray, the median of the six-scaled fold values for each gene was used for statistical analysis. The technical details of the analysis of the microarrays are available on the website: <http://www.bionet.espci.fr/varan/>. Functional annotation of the genes selected as differentially expressed was performed using the Expression Analysis Systematic Explorer (EASE; <http://niaid.abcc.ncifcrf.gov/content.jsp?file=/ease/ease1.htm&type=1>). EASE provides a statistical significance of gene families using standardized Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) or Gene Ontology database terms, and a normalized gene enrichment score is reported for each functional category.

Statistics

Unsupervised clustering of gene expression data was performed by hierarchical clustering (Pearson uncentered distance and average linkage) with Cluster/TreeView software [Eisen et al., 1998] (<http://rana.lbl.gov/EisenSoftware.htm>). Cross-validation was performed using the Predictive Analysis of Microarray (PAM) software [Tibshirani et al., 2002] (<http://www-stat.stanford.edu/~tibs/PAM/>).

RESULTS

Identification of a Specific Gene Expression Pattern in Drug-Free Operational Tolerant Kidney Graft Recipients

We first analyzed the transcriptional profile in PBMC of the 8 TOL versus the 18 CR by two-class Significance Analysis of Microarray (SAM software) using a False Discovery Rate (FDR) <0.05 and running 1,000 permutations of the 6,864 oligonucleotides. As shown in Table II, 343 oligonucleotides corresponding to 331 distinct genes were found to be significantly differentially expressed between TOL and CR sets. Of these, 275 were downregulated in TOL with a fold change of 0.475–0.896. The other 68 genes were upregulated in TOL compared to CR, with a fold change of 1.143–2.529 (Supplemental Table I).

In order to ascertain that the 343 genes set was associated with operational tolerance and not due to the absence of immunosuppressive drugs in these patients, we reanalyzed the expression data of the 343 genes in comparison with healthy individuals (HV) by SAM analysis. Among the 68 upregulated genes in TOL versus

TABLE II. List of Genes That Are Differentially Expressed Between Operationally Tolerant Kidney Graft Recipients (TOL) and Patients With Chronic Rejection (CR)

Gene Category	Number of genes	EASE score (<i>P</i> -values)
Upregulated genes in TOL		
Response to wounding	10	4.10E - 05
Immune response	14	1.84E - 04
Defense response	14	3.34E - 04
Response to biotic stimulus	14	6.44E - 04
Response to pest/pathogen/parasite	10	1.14E - 03
Response to external stimulus	15	2.38E - 03
Response to stress	11	7.56E - 03
Downregulated genes in TOL		
Immune response	49	1.67E - 05
Defense response	51	1.75E - 05
Response to biotic stimulus	52	5.12E - 05
Response to pest/pathogen/parasite	34	6.68E - 05
Response to external stimulus	60	3.08E - 04
Response to stress	44	3.87E - 04
Cell motility	18	2.75E - 03
Response to wounding	21	4.18E - 03
Inflammatory response	16	6.77E - 03
Receptor activity	45	7.19E - 03
Innate immune response	16	9.30E - 03
Defense/immunity protein activity	13	1.84E - 02
Transmembrane receptor activity	31	2.20E - 02
Obsolete molecular function	15	3.86E - 02
Carbohydrate metabolism	14	4.91E - 02

SAM software identified 343 significantly differentially expressed genes between TOL and CR: 275 out of the 343 genes are downregulated and 68 genes are upregulated in TOL versus CR, as indicated by the fold change expression (FDR < 5%; 1,000 permutations).

CR, 43 were also differentially expressed between TOL and HV. Among the 275 down-regulated genes in TOL versus CR, 180 were also differentially expressed between TOL and HV. Taken together, these 223 genes (Supplemental Table II) are differentially expressed in TOL compared to CR but also different compared to HV. These 223 genes constitute a unique pattern for operational tolerance. We employed EASE in order to identify functional categories for the 343 genes list and the 223 gene list (Tables II and III, respectively). For

each analysis, we selected only those functional categories with a $P < 0.05$ and a number of genes > 10 . For the 343 genes list, EASE identified 7 and 16 functional groups among the upregulated and the downregulated genes, respectively (Table II). For the 223 genes list, EASE identified no functional family among the upregulated and 12 functional groups among the downregulated genes (Table III). In both analysis, the functional categories corresponded to genes involved in immune responses and host defense.

TABLE III. Identification of a Specific Gene Expression Pattern of Drug-Free Operationally Tolerant Kidney Graft Recipients

Gene Category	Number of genes	EASE score (<i>P</i> -values)
Downregulated genes in TOL		
Response to wounding	15	2.12E - 05
Immune response	23	1.13E - 04
Defense response	23	2.70E - 04
Response to biotic stimulus	23	6.90E - 04
Inflammatory response	10	1.33E - 03
Innate immune response	10	1.70E - 03
Response to pest/pathogen/parasite	15	2.09E - 03
Cell motility	10	2.47E - 03
Response to stress	19	4.30E - 03
Response to external stimulus	24	8.81E - 03
Calcium ion binding	12	9.05E - 03
Biological process unknown	10	3.73E - 02

Genes which were differentially expressed between TOL and CR but also between TOL and HV were compared from the 343 gene list (Table II), resulting in a unique set of 223 genes.

Hierarchical Classification Using the Gene Expression Profiles

We next analyzed the capacity of the gene expression profiles to classify the diagnostic category (TOL vs. CR) of a sample using PAM software [Tibshirani et al., 2002]. PAM analysis of the 343 differentially expressed genes was performed in the 8 TOL and the 18 CR patients. As shown in Figure 1A, 5 out of 8 TOL and 16 out of 18 CR were classified correctly. Collectively, these data indicate we are able to classify TOL and CR patients correctly in this cross-validation experiment with a positive predictive value of 80.8%.

The same analysis was performed using the 223 genes differentially expressed in TOL compared to both CR and HV that constitute the unique gene expression pattern of operational tolerance. As shown in Figure 2A, again 5 out of 8 TOL and 16 out of 18 CR were classified

correctly by PAM, yielding the same positive predictive value.

Using the list of 343 differentially expressed genes between TOL versus CR, the corresponding expression matrix was classified by an unsupervised hierarchical clustering approach where the degree of similarity between samples and genes are visualized. As shown in Figure 3, two clearly distinct clusters of patients were identified solely on the basis of the gene expression data: one cluster contained 6 out of 8 TOL, whereas the other contained 16 out of the 18 CR as well as two TOL (TOL06 and TOL08). This result is in accordance with what is observed in Figure 2.

Stability of the Gene Expression Profile Over Time

In order to confirm that the TOL and CR gene signature was reproducible and stable over time, 4 TOL (TOL01 to TOL04) and 3 CR

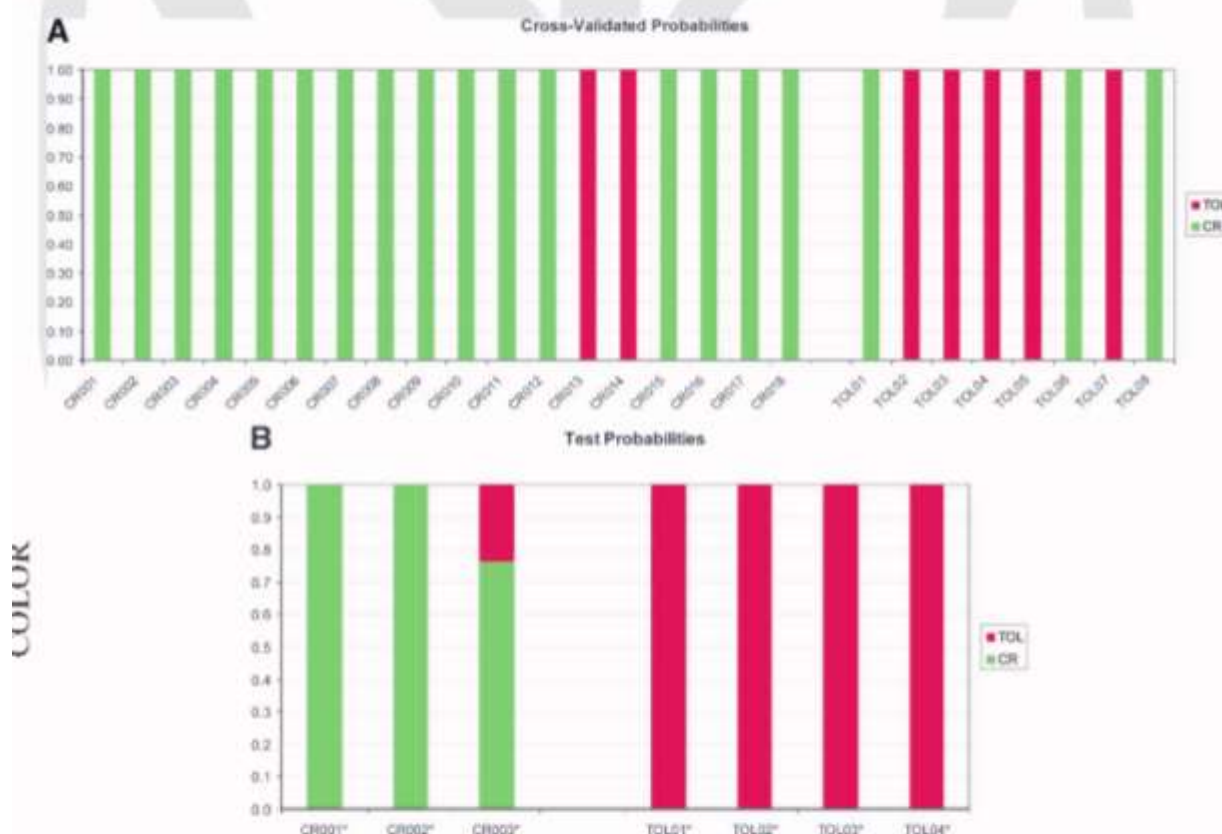


Fig. 1. Classification probabilities of individual patients by Predictive Analysis of Microarray (PAM) based on the 343 differentially expressed genes between operationally tolerant kidney graft recipients (TOL) and patients with chronic rejection (CR). Each patient sample is shown by a bar, as labeled in the X-axis. The color codes indicate the probability (0–1, as indicated in Y-axis) that the sample belongs to TOL (red) or CR (green). **A:** Cross-validated probabilities on the 8 TOL and 18 CR that

were used to set up the 2-class (TOL/CR) classification algorithm. Among the 26 patients, 5 samples (CR013, CR014, TOL01, TOL06 and TOL08) were misclassified. **B:** Using the PAM algorithm defined with 8 TOL and 18 CR patients, 7 serially harvested samples (4 TOL and 3 CR) at a time interval of more than 1 year after the first sample were classified. The algorithm correctly classified all samples, with a probability of 100% for TOL and 92.0% for CR.



Fig. 2. Classification probabilities of individual patients by Predictive Analysis of Microarray (PAM) based on the 223 specific genes differentially expressed between operationally tolerant kidney graft recipients (TOL), patients with chronic rejection (CR), and HV. Each patient sample is shown by a bar, as labeled on the X-axis. The color codes indicate the probability (0–1, as indicated in Y-axis) that the sample belongs to TOL (red) or CR (green). **A:** Cross-validated probabilities on the 8 TOL and

18 CR that were used to set up the 2-class (TOL/CR) algorithm. Among the 26 patients, 5 samples (CR013, CR014, TOL01, TOL06, and TOL08) were misclassified. **B:** Using the PAM algorithm defined with 8 TOL and 18 CR patients, 7 serially harvested samples (4 TOL and 3 CR) at a time interval of more than 1 year after the first sample were classified. The algorithm correctly classified all samples, with a probability of 98.2% for TOL and 92.9% for CR.

(CR001 to CR003) patients were sampled and analyzed at a second time point with an interval of at least 12 months (mean 25.7 months, range 16–31 months for TOL and mean 25.8 months, range 12–35 months for CR). The gene expression data were analyzed using the PAM algorithm defined in the previous paragraph by the 8 TOL and 18 CR samples. All the serial TOL and CR samples were classified correctly with a probability of 100% and 92.0% for TOL and CR, respectively (Fig. 1B). Also the PAM algorithm based on the unique 194 gene set classified all TOL and CR correctly with a probability of 98.2% and 92.9%, respectively (Fig. 2B). Accordingly, the gene expression levels of the serial samples showed a good correlation over time in 6 out of 7 patients (Table IV).

DISCUSSION

Kidney transplantation remains the major treatment for end-stage renal diseases, but is often complicated either by acute or CR or by side effects of long-term immunosuppression. The molecular basis of these processes have been analyzed by gene expression profiling in various studies focusing on acute [Sarwal et al., 2001; Gimino et al., 2003; Hippen et al., 2005; Hoffmann et al., 2005] or CR [Donauer et al., 2003; Scherer et al., 2003; Flechner et al., 2004; Cheng et al., 2006; Hotchkiss et al., 2006], response to treatment [Flechner et al., 2004; Melk et al., 2005], and lung cancer [Chen et al., 2007], demonstrating the unique potential of this approach to decipher complex pathological

Blood Gene Expression Statistical Analysis^{Q2}

9

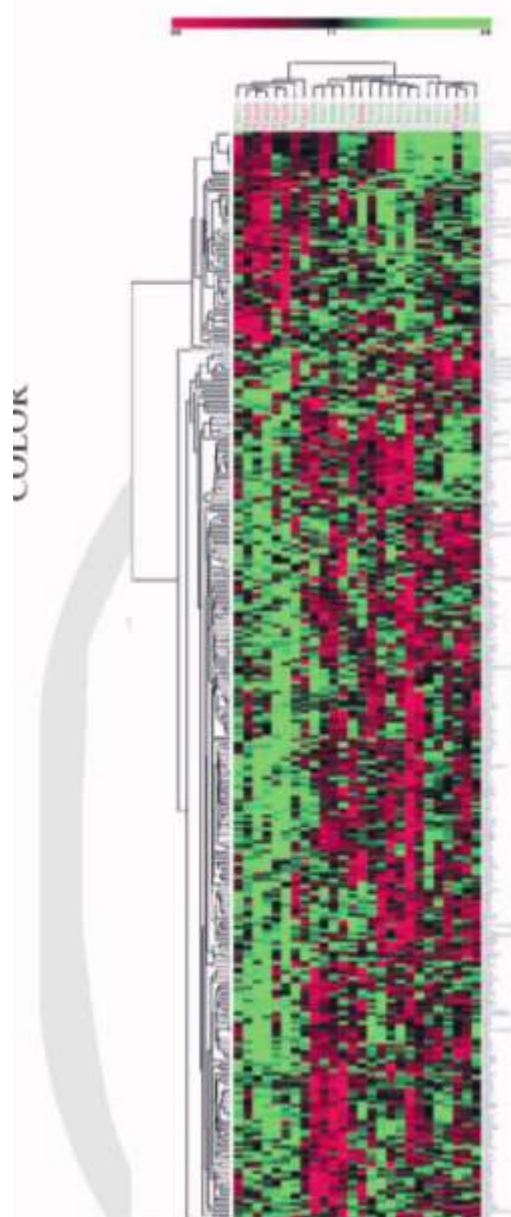


Fig. 3. Schematic representation of the clustering analysis of the 343 genes which were differentially expressed between operationally tolerant kidney graft recipients (TOL) and patients with chronic rejection (CR). The color scale ranges from green, representing downregulation of genes in TOL, to red, representing upregulation of genes in TOL. Each column of the matrix corresponds to a single patient sample and each row to a gene. Patients' samples were clustered according to the similarity in their expression profile across the genes. The dendrogram tree summarizes the results of this clustering.

processes in human disease. Recently, the feasibility and value of microarray analysis of operational tolerance has been demonstrated by Martinez-Llordella et al. [2007] in liver trans-

plantation and by our-selves in kidney transplantation [Brouard et al., 2007].

In the present study, we identified a list of 343 genes, mainly immune and defense genes, differentiating operational tolerance from CR in human kidney recipients. We demonstrated that the obtained gene expression profile correctly classified more than 80% of the samples in a cross-validation experiment and separated well on the unsupervised hierarchical clustering. More importantly, the expression algorithm still yielded a positive predictive value for all samples harvested over time of both operationally tolerant and CR patients, demonstrating the stability of the gene expression pattern. Interestingly, one patient (TOL06) was classified as CR in the cross-validation test. This patient, who fulfilled the criteria of operational tolerance at the time of the study two years after total withdrawal of immunosuppressive drugs, had a declining graft function (creatinemia: 165 $\mu\text{m/l}$, proteinuria: 1 g/day) and displayed anti-donor class II (anti-DR4) antibodies 6 months later. Although single cases should be interpreted with caution, this suggests that the blood gene profiling may contribute to identifying patients at risk of losing the status of tolerance. Two other patients (TOL01 and TOL08), however, were classified as CR by their gene expression profile but still fulfilled the criteria of operational tolerance upon follow-up. Therefore, no conclusions can be made about the potential prognostic value of the identified expression signature without large, prospective and longitudinal trials.

Of major importance in a clinical perspective is the fact that the described gene expression profile has been obtained from PBMC and can thus easily be used and validated in other settings. Several studies have reported that gene profiling of peripheral blood cells may be useful in the prediction of clinical events and the management of immunosuppressive treatment in heart [Deng et al., 2006] and kidney transplantation [Flechner et al., 2004] as well as in other pathological conditions [Steinman and Zamvil, 2003; Achiron and Gurevich, 2006]. In an experimental rodent model of infectious tolerance, regulatory lymphocytes from peripheral blood were able to transfer long-term survival [Fujino et al., 2004], indicating that peripheral regulatory mechanisms really exist. Thus, even in the presence of compartment-specific differences [Lair et al., 2007], gene

TABLE IV. Functional Classification of the 343 Differentially Expressed Genes Using EASE (<http://niaid.abcc.ncifcrf.gov/content.jsp?file=/ease/ease1.htm> & type=1)

Patients	Spearman r	P-values
CR001	0.5872	<0.0001
CR002	0.8785	<0.0001
CR003	0.5699	<0.0001
TOL01	0.06869	NS
TOL02	0.7168	<0.0001
TOL03	0.7273	<0.0001
TOL04	0.4481	<0.0001

Functional categories with a $P < 0.05$ and a number of genes > 10 were selected.

expression profiling of peripheral blood may be useful to monitor the state of the immune response to kidney transplants.

Besides the clinical implications of the presented data, a major topic of interest is the identification of the molecular pathways underlying the identified expression profile and their functional involvement in tolerance. Although stringently significant at the statistical level, all these genes showed a relatively moderate fold-change compared to CR, thereby indicating that a complex interaction between a multitude of genes and pathways rather than a massive upregulation of a few single genes is relevant for operational tolerance. This expression pattern is consistent with previous studies in autoimmune diseases [Bennett et al., 2003] and even highly specific oncology gene signatures are composed of sets of 70–100 genes with relatively small fold-changes [van 't Veer et al., 2002; Glas et al., 2006]. A detailed functional analysis of the obtained gene expression profiles using two different statistical and nonstatistical methods is therefore presented in the second part of this article.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thanks TeLand for financial help and acknowledge the following colleagues that helped recruit rare patients: Christophe Legendre, Eric Therivet, Evangeline Pillebout, Christian Noel, Jean-François Soubra, Hervé Lemoine de Sagazan. This project was also supported by a FIRB International Grant on Proteomics and Cell Cycle (RBIN04RXHS) from the MIUR (Ministero dell'Istruzione, Università e Ricerca) to CIRSDNNOB-Nanoworld Institute of the University of Genova.

REFERENCES

- Achiron A, Gurevich M. 2006. Peripheral blood gene expression signature mirrors central nervous system disease: The model of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 5:517–522.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, Boldrick JC, Sabet H, Tran T, Yu X, Powell JI, Yang L, Marti GE, Moore T, Hudson J, Jr., Lu L, Lewis DB, Tibshirani R, Sherlock G, Chan WC, Greiner TC, Weisenburger DD, Armitage JO, Warnke R, Levy R, Wilson W, Grever MR, Byrd JC, Botstein D, Brown PO, Staudt LM. 2000. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403:503–511.
- Alon U, Barkai N, Notterman DA, Gish K, Ybarra S, Mack D, Levine AJ. 1999. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6745–6750.
- Ansari MJ, Sayegh MH. 2004. Clinical transplantation tolerance: The promise and challenges. *Kidney Int* 65:1560–1563.
- Ashton-Chess J, Brouard S, Souillou JP. 2006. Is clinical tolerance realistic in the next decade? *Transpl Int* 19:539–548.
- Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, Shark KB, Grande WJ, Hughes KM, Kapur V, Gregersen PK, Behrens TW. 2003. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:2610–2615.
- Baeten D, Louis S, Braud C, Braudeau C, Ballet C, Moizant F, Pallier A, Giral M, Brouard S, Souillou JP. 2006. Phenotypically and functionally distinct CD8+ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients. *J Am Soc Nephrol* 17:294–304.
- Ballet C, Roussey-Kesler G, Aubin JT, Brouard S, Giral M, Miqueu P, Louis S, van der Werf S, Souillou JP. 2006. Humoral and cellular responses to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft. *Am J Transplant* 6:2796–2801.
- Ballet C, Brouard S, Souillou JP. 2007. Revisiting tolerance induction by donor cells [priming](#)⁹⁵. *Curr Opin Organ Transplant* 24:335–339.

- Becker D, Mihm MC, Hewitt SM, Sondak VK, Fountain JW, Thurin M. 2006. Markers and tissue resources for melanoma: Meeting report. *Cancer Res* 66:10652–10657.
- Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, Pascual V. 2003. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 197:711–723.
- Brouard S, Dupont A, Giral M, Louis S, Lair D, Braudeau C, Degauque N, Moizant F, Pallier A, Ruiz C, Guillet M, Laplaud D, Soullillou JP. 2005. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Transplant* 5:330–340.
- Brouard S, Mansfield ES, Braud C, Li L, Giral M, Hsieh SC, Baeten D, Zhang M, Ashton-Chess J, Braudeau C, Hsieh F, Sherlock G, Dupont A, Pallier A, Moreau A, Louis S, Ruiz C, Salvatierra O, Soullillou JP, Sarwal M. 2007. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* ([in press](#))^{Q6}.
- Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, Sobel RA, Lock C, Karpuz M, Pedotti R, Heller R, Oksenberg JR, Steinman L. 2001. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on auto-immune demyelinating disease. *Science* 294:1731–1735.
- Chen HY, Yu SL, Chen CH, Chang GC, Chen CY, Yuan A, Cheng CL, Wang CH, Terng HJ, Kao SF, Chan WK, Li HN, Liu CC, Singh S, Chen WJ, Chen JJ, Yang PC. 2007. A five-gene signature and clinical outcome in non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 356:11–20.
- Cheng O, Thuillier R, Sampson E, Schultz G, Ruiz P, Zhang X, Yuen PS, Mannon RB. 2006. Connective tissue growth factor is a biomarker and mediator of kidney allograft fibrosis. *Am J Transplant* 6:2292–2306.
- Cobbold SP, Adams E, Graca L, Daley S, Yates S, Paterson A, Robertson NJ, Nolan KF, Fairchild PJ, Waldmann H. 2006. Immune privilege induced by regulatory T cells in transplantation tolerance. *Immunol Rev* 213:239–255.
- Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D, Giral M, Blanche G, Dreño B, Soullillou JP. 1998. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: Randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 351:623–628.
- Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, Billingham M, Marboe CC, Berry G, Kobashigawa J, Johnson FL, Starling RC, Murali S, Pauly DF, Baron H, Wohlgenuth JG, Woodward RN, Klingler TM, Walther D, Lal PG, Rosenberg S, Hunt S. 2006. Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. *Am J Transplant* 6:150–160.
- Donauer J, Rumberger B, Klein M, Faller D, Wilpert J, Sparna T, Schieren G, Rohrbach R, Dera P, Timmer J, Pisarski P, Kirste G, Walz G. 2003. Expression profiling on chronically rejected transplant kidneys. *Transplantation* 76:539–547.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. 1998. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:14863–14868.
- Flochner SM, Kurian SM, Head SR, Sharp SM, Whisenant TC, Zhang J, Chismar JD, Horvath S, Mondala T, Gilmartin T, Cook DJ, Kay SA, Walker JR, Salomon DR. 2004. Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes. *Am J Transplant* 4:1475–1489.
- Fudaba Y, Spitzer TR, Shaffer J, Kawai T, Fehr T, Delmonico F, Preffer F, Tolkoff-Rubin N, Dey BR, Saidman SL, Kraus A, Bonnefoix T, McAfee S, Power K, Kattelman K, Colvin RB, Sachs DH, Cosimi AB, Sykes M. 2006. Myeloma responses and tolerance following combined kidney and nonmyeloablative marrow transplantation: In vivo and in vitro analyses. *Am J Transplant* 6:2121–2133.
- Fujino M, Kitazawa Y, Kawasaki M, Funeshima N, Kimura H, Nakajima T, Saito H, Li XK. 2004. Differences in lymphocyte gene expression between tolerant and syngeneic liver grafted rats. *Liver Transpl* 10:379–391.
- Gimino VJ, Lande JD, Berryman TR, King RA, Hertz MI. 2003. Gene expression profiling of bronchoalveolar lavage cells in acute lung rejection. *Am J Respir Crit Care Med* 168:1237–1242.
- Glas AM, Kersten MJ, Delahaye LJ, Witteveen AT, Kibbelaar RE, Velds A, Wessels LF, Joosten P, Kerkhoven RM, Bernards R, van Krieken JH, Kluijn PM, van't Veer LJ, de Jong D. 2005. Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. *Blood* 105:301–307.
- Glas AM, Floore A, Delahaye LJ, Witteveen AT, Pover RC, Bakx N, Lahti-Domenici JS, Bruinsma TJ, Warmoes MO, Bernards R, Wessels LF, Van't Veer LJ. 2006. Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. *BMC Genomics* 7:278.
- Golfier G, Dang MT, Dauphinot L, Graison E, Rossier J, Potier MC. 2004. VARAN: A web server for variability analysis of DNA microarray experiments. *Bioinformatics* 20:1641–1643.
- Hiltunen MO, Tuomisto TT, Niemi M, Brasen JH, Rissanen TT, Toronen P, Vajanto I, Ylä-Herttuala S. 2002. Changes in gene expression in atherosclerotic plaques analyzed using DNA array. *Atherosclerosis* 165:23–32.
- Hippen BE, DeMattos A, Cook WJ, Kew CE, Gaston RS. 2005. Association of CD20+ infiltrates with poorer clinical outcomes in acute cellular rejection of renal allografts. *Am J Transplant* 5:2248–2252.
- Hoffmann SC, Hale DA, Kleiner DE, Mannon RB, Kampen RL, Jacobson LM, Cendales LC, Swanson SJ, Becker BN, Kirk AD. 2005. Functionally significant renal allograft rejection is defined by transcriptional criteria. *Am J Transplant* 5:573–581.
- Horwitz PA, Tsai EJ, Putt ME, Gilmore JM, Lepore JJ, Parmacek MS, Kao AC, Desai SS, Goldberg LR, Brozena SC, Jessup ML, Epstein JA, Cappola TP. 2004. Detection of cardiac allograft rejection and response to immunosuppressive therapy with peripheral blood gene expression. *Circulation* 110:3815–3821.
- Hotchkiss H, Chu TT, Hancock WW, Schroppe B, Kretzler M, Schmid H, Liu Y, Dikman S, Akalin E. 2006. Differential expression of profibrotic and growth factors in chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 81:342–349.
- Kasperkovitz PV, Timmer TC, Smeets TJ, Verbeet NL, Tak PP, van Baarsen LG, Baltus B, Huizinga TW, Pieterman E, Fero M, Firestein GS, van der Pouw Kraan TC, Verweij CL. 2005. Fibroblast-like synoviocytes derived from patients with rheumatoid arthritis show the imprint of synovial tissue heterogeneity: Evidence of a link between an increased myofibroblast-like phenotype and high-inflammation synovitis. *Arthritis Rheum* 52:430–441.

- Lair D, Degauque N, Miquieu P, Jovanovic V, Guillet M, Merieau E, Moreau A, Souillou JP, Brouard S. 2007. Functional compartmentalization following induction of long-term graft survival with pregraft donor-specific transfusion. *Am J Transplant* 7:538–549.
- Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. 2002. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 8:500–508.
- Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, Moreau A, Souillou JP, Brouard S. 2006. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 81:398–407.
- Luckow B, Joergensen J, Chilla S, Li JP, Henger A, Kiss E, Wiczorek G, Roth L, Hartmann N, Hoffmann R, Kretzler M, Nelson PJ, Perez de Lema G, Maier H, Wurst W, Balling R, Pfeffer K, Grone HJ, Schlondorff D, Zerwes HG. 2004. Reduced intragraft mRNA expression of matrix metalloproteinases Mmp3, Mmp12, Mmp13 and Adam8, and diminished transplant arteriosclerosis in Cer5-deficient mice. *Eur J Immunol* 34:2568–2578.
- Man K, Lo CM, Lee TK, Li XL, Ng IO, Fan ST. 2003. Intragraft gene expression profiles by cDNA microarray in small-for-size liver grafts. *Liver Transpl* 9:425–432.
- Martinez-Llordella M, Paig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, Lerut J, Latinne D, Margarit C, Bilbao I, Brouard S, Hernandez-Fuentes M, Souillou JP, Sanchez-Fueyo A. 2007. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* 7:309–319.
- Melk A, Mansfield ES, Hsieh SC, Hernandez-Boussard T, Grimm P, Rayner DC, Halloran PF, Sarwal MM. 2005. Transcriptional analysis of the molecular basis of human kidney aging using cDNA microarray profiling. *Kidney Int* 68:2667–2679.
- Nygaard V, Loland A, Holden M, Langaas M, Rue H, Liu F, Myklebust O, Fodstad O, Hovig E, Smith-Sorensen B. 2003. Effects of mRNA amplification on gene expression ratios in cDNA experiments estimated by analysis of variance. *BMC Genomics* 4:11.
- Peterson KS, Huang JF, Zhu J, D'Agati V, Liu X, Miller N, Erlander MG, Jackson MR, Winchester RJ. 2004. Characterization of heterogeneity in the molecular pathogenesis of lupus nephritis from transcriptional profiles of laser-captured glomeruli. *J Clin Invest* 113:1722–1733.
- Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, Subra JF, Legendre C, Noel C, Pillebout E, Brouard S, Souillou JP. 2006. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 6:736–746.
- Sarwal MM, Jani A, Chang S, Huie P, Wang Z, Salvatierra O, Clayberger C, Sibley R, Krensky AM, Pavlakakis M. 2001. Granulysin expression is a marker for acute rejection and steroid resistance in human renal transplantation. *Hum Immunol* 62:21–31.
- Sarwal M, Chua MS, Kambham N, Hsieh SC, Satterwhite T, Masek M, Salvatierra O. 2003. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med* 349:125–138.
- Scherer A, Krause A, Walker JR, Korn A, Niese D, Raulf F. 2003. Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies. *Transplantation* 75:1323–1330.
- Solez K, Colvin RB, Racusen LC, Sis B, Halloran PF, Birk PE, Campbell PM, Cascalho M, Collins AB, Demetris AJ, Drachenberg CB, Gibson IW, Grimm PC, Haas M, Lerut E, Liapis H, Mannon RB, Marcus PB, Mengel M, Mihatsch MJ, Nankivell BJ, Nickleleit V, Papadimitriou JC, Platt JL, Randhawa P, Roberts I, Salinas-Madruga L, Salomon DR, Seron D, Sheaff M, Weening JJ. 2007. Banff '05 Meeting Report: Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy (CAN). *Am J Transplant* 7:518–526.
- Souillou JP. 2001. Immune monitoring for rejection of kidney transplants. *N Engl J Med* 344:1006–1007.
- Stegall M, Park W, Kim D, Kremers W. 2002. Gene expression during acute allograft rejection: Novel statistical analysis of microarray data. *Am J Transplant* 2:913–925.
- Steinman L, Zamvil S. 2003. Transcriptional analysis of targets in multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 3:483–492.
- Takatsuki M, Uemoto S, Inomata Y, Egawa H, Kiuchi T, Fujita S, Hayashi M, Kanematsu T, Tanaka K. 2001. Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. *Transplantation* 72: 449–454.
- Tibshirani R, Hastie T, Narasimhan B, Chu G. 2002. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:6567–6572.
- Tuomisto TT, Korkeala A, Rutanen J, Viita H, Brasen JH, Riekkinen MS, Rissanen TT, Karkola K, Kiraly Z, Kolbe K, Yla-Herttuala S. 2003. Gene expression in macrophage-rich inflammatory cell infiltrates in human atherosclerotic lesions as studied by laser microdissection and DNA array: Overexpression of HMG-CoA reductase, colony stimulating factor receptors, CD11A/CD18 integrins, and interleukin receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23:2235–2240.
- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, Schreiber GJ, Peterse JL, Roberts C, Marton MJ, Parrish M, Atsma D, Witteveen A, Glas A, Delahaye L, van der Velde T, Bartelink H, Rodenhuis S, Rutgers ET, Friend SH, Bernards R. 2002. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347:1999–2009.
- van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, van der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Korkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. 2002. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530–536.
- Yang YH, Speed T. 2002. Design issues for cDNA microarray experiments. *Nat Rev Genet* 3:579–588.

2.2. Résumé de l'article II

Cette deuxième étude a consisté à utiliser une liste de gènes complémentaires composée de gènes issus d'expériences préliminaires sur des puces à ADN exhaustives ainsi que des gènes de la littérature ayant un intérêt en transplantation ou de recherches menées au laboratoire. L'objectif de ce travail a consisté à déterminer des gènes susceptibles d'être à l'origine des processus de la tolérance « opérationnelle » et du rejet chronique. Nous avons effectué une analyse statistique classique d'identification de gènes différentiellement exprimés entre des patients « opérationnellement » tolérants et des patients en rejet chronique. Nous avons identifié 343 gènes différentiellement exprimés dans les PBMC entre huit patients « opérationnellement » tolérants et dix-huit patients en rejet chronique. De plus, l'expression de ces 343 gènes est stable au cours du temps dans le sang de sept patients au moins un an après le premier prélèvement. Cette liste de gènes a consisté en un point de départ d'une analyse non-statistique détaillée dans l'article III.

2.3. Discussion de l'article II

2.3.1. Confection d'une puce dédiée

La mesure de l'expression des gènes a été réalisée grâce à des puces à ADN spottées avec des oligonucléotides. Cette puce dédiée¹⁸ a été créée en collaboration avec d'autres équipes de recherche sur Nantes et comporte 6864 gènes. La détermination des gènes déposés sur la puce s'est faite suite à une étude réalisée au cours de mon DEA sur des puces à ADN exhaustives (dites pangénomiques). Compte-tenu du faible nombre de patients que nous disposions à l'époque, nous avons décidé de mettre en commun d'une part les ARNm de huit patients en rejet chronique et d'autre part les ARNm de six patients tolérants afin de minimiser les variations inter-individuelles (Churchill 2002; Churchill and Oliver 2001). Nous avons déterminé 2211 gènes différentiellement exprimés entre les patients tolérants et les patients en rejet chronique par le test SAM (1000 permutations ; $q < 0,05$). De cette liste, nous avons retenu 520 gènes qui présentaient le plus de différences d'expression entre les deux

¹⁸ http://cardioserve.nantes.inserm.fr/ptf-puce/cancerochips_fr.php

groupes (*fold change*). Les gènes sont sélectionnés sur le *fold change* plutôt que sur la valeur *p* car le *fold change* permet une meilleure concordance des résultats (Shi, Reid *et al.* 2006). Nous avons aussi sélectionné des gènes issus de la littérature ayant un intérêt en transplantation ou de recherches menées au laboratoire comme par exemple Foxp3, HO-1 (*Heme Oxygenase 1*), FSTL1, des gènes de la voie de signalisation NOTCH, certains TLR... qui ne sont pas présents sur les puces de Stanford.

2.3.2. Analyse de l'expression des gènes

Nous avons effectué deux amplifications linéaires indépendantes des ARN de chacun des patients afin de limiter les biais de l'amplification (Nygaard, Loland *et al.* 2003). En effet, l'amplification des différents transcrits est variable selon leur taille (Ma, Lyons-Weiler *et al.* 2006). Les ARN amplifiés des patients « opérationnellement » tolérants, des patients en rejet chronique et des individus sains ont été hybridés sur deux lames différentes (une par amplification). De plus, chacun des gènes est déposé en trois endroits différents sur la puce. Nous obtenons ainsi douze points de mesure par gène et par patient (Black and Doerge 2002).

Nous avons identifié une liste de 343 gènes différentiellement exprimés entre les patients tolérants et les patients en rejet chronique (Tableau 6 - Annexe 1). La classification hiérarchique non-supervisée des patients sur la base de l'expression de ces 343 gènes donne un dendrogramme avec deux branches : la première constituée des patients tolérants ainsi que des patients en rejet chronique CR013 et CR014 et la seconde branche contient majoritairement les patients en rejet chronique ainsi que des patients TOL06 et TOL08 (Figure 3 de l'Article II). En ce qui concerne le patient TOL06, il remplissait les critères de la tolérance deux ans après l'arrêt de son traitement immunosuppresseur. Cependant, six mois après le prélèvement, sa fonction rénale s'est dégradée (créatinémie : 165 μ mol/L ; protéinurie : 1g/j) et la biopsie a révélé des signes de rejet chronique avec la présence d'anticorps anti-donneur. Ce patient correspond au patient TT12 de l'article I. La mauvaise classification des patients TOL08, CR013 et CR014 ne peut pas s'expliquer sur les critères cliniques.

Nous avons vérifié la stabilité de cette signature dans le temps. Le sang de sept patients (quatre patients « opérationnellement » tolérants et trois patients en rejet chronique) a

été testé au moins un an après le premier prélèvement. Les corrélations entre les mesures d'expression des 343 gènes dans le temps montre que cette signature est stable dans le temps (Figure 16).

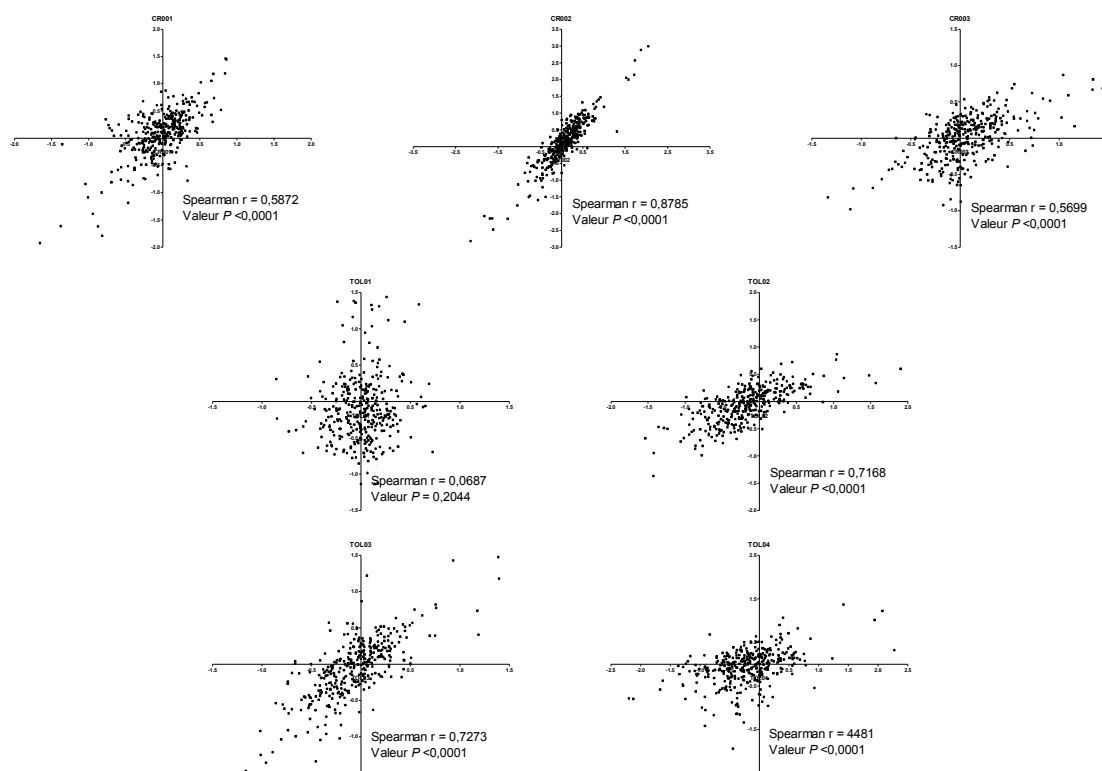


Figure 16 : Corrélation de l'expression des 343 gènes dans le temps.

Les gènes identifiés comme étant statistiquement différentiellement exprimés ne semblent pas être fortement différents entre les patients tolérants et les patients en rejet chronique ($\pm 1,116 < \textit{fold change} < \pm 2,529$) (cf. Tableau 6 - Annexe 1). Ceci suggère que l'état de tolérance « opérationnelle » s'explique par des interactions complexes entre de nombreux gènes plutôt qu'une augmentation ou une diminution massive de quelques gènes. Ce profil d'expression est cohérent avec d'autres études menées en autoimmunité (Bennett, Palucka *et al.* 2003) et en cancérologie où des signatures transcriptionnelles hautement spécifiques composées de 70 à 100 gènes avec des différences d'expression (*fold change*) relativement faible (Glas, Kersten *et al.* 2005; van 't Veer, Dai *et al.* 2002).

Yang *et al.* ont réalisé des hybridations sur dix-neuf lignées cellulaires de carcinomes humaines (colon, cerveau, ovaire, pancréas et testicule) contre un ARN de référence commercial ou contre un ARN de référence fait par leurs soins. En utilisant une

limite de deux déviations standards, ils obtiennent des différences d'expression compris entre $\pm 1,33$ et $\pm 1,62$ avec moins de 5% de gènes présentant une déviation standard supérieure à deux (Yang, Chen *et al.* 2002). Il semble que des gènes dont les différences d'expression sont inférieures à deux, peuvent donc être considérés comme potentiellement intéressants.

Les faibles différences d'expression entre les deux groupes peuvent aussi s'expliquer par le faible nombre de patients. En effet, Wei *et al.* indiquent que le nombre d'échantillons nécessaire pour obtenir une différence d'expression d'au moins deux entre les différentes conditions expérimentales avec une probabilité de 90% et une valeur $p < 0,05$ est largement supérieur au nombre d'échantillons utilisés à l'heure actuelle (Wei, Li *et al.* 2004). De plus, ils indiquent qu'il faut au moins cinq fois plus d'échantillons pour des études chez l'Homme que pour des études chez des animaux consanguin afin d'observer des différences d'expression avec la même force statistique.

Les variabilités inter-individuelles de nos patients ainsi que le nombre restreint de patients étudiés dans notre étude peuvent être à l'origine des faibles différences d'expression entre nos patients « opérationnellement » tolérants et nos patients en rejet chronique. Nous avons par la suite utilisé cette liste de gènes dans une analyse bioinformatique non statistique (cf. Article III) afin de mettre en évidence un groupe de gènes *leader* dans le but de mieux comprendre les mécanismes de la tolérance « opérationnelle » chez des patients transplantés rénaux.

3. Article III

Tolérance « opérationnelle » sans traitement immunosuppresseur chez des patients transplantés rénaux : II. Analyse non-statistique de l'expression des gènes.

Victor Sivozhelezov, Christophe Braud, Luca Giacomelli, Eugenia Pechkova, Magali Giral, Jean-Paul Soulillou, Sophie Brouard et Claudio Nicolini.

Publié dans *Journal of Cellular Biochemistry*, 2007, In Press

Titre original : *Immunosuppressive Drug-Free Operational Immune Tolerance in Human Kidney Transplant Recipients: II. Non-statistical Gene Microarray Analysis.*

Immunosuppressive Drug-Free Operational Immune Tolerance in Human Kidney Transplants Recipients. II: Non-statistical Gene Microarray Analysis

Victor Sivozhelezov,^{1,2} Christophe Braud,^{3,4} Luca Giacomelli,¹ Eugenia Pechkova,^{1,2} Magali Giral,³ Jean-Paul Soulillou,^{3,4} Sophie Brouard,^{3,4} and Claudio Nicolini^{1,2*}

¹Nanoworld Institute and Eminent Biophysics Chair, University of Genova, Corso Europa 30, Genova 16132, Italy

²Fondazione Elba, Piazza SS. Apostoli 66, Rome, Italy

³INSERM U643, Institut de Transplantation Et de la Recherche en Transplantation (ITERT), Nantes F-44093, France

⁴Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes F-44000, France

Abstract Kidney transplant is the reference treatment for patients with end-stage renal disease, but patients may develop long-term rejection of the graft. However, some patients do not reject the transplant, but instead are operationally tolerant state despite withdrawal of immunosuppressive treatment. In this second article we outline a microarray-based identification of key leader genes associated respectively to rejection and to operational tolerance of the kidney transplant in humans by utilizing a non/statistical bioinformatic approach based on the identification of "key genes," either as those mostly changing their expression, or having the strongest interconnections. A uniquely informative picture emerges on the genes controlling the human transplant from the detailed comparison of these findings with the traditional statistical SAM (Tusher et al. [2001] *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5116–5121) analysis of the microarrays and with the clinical study carried out in the accompanying part I article. *J. Cell. Biochem.* 9999: 1–14, 2007. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: gene expression; DNA microarray; bioinformatics; kidney transplant; transplant tolerance

Kidney transplant is the reference treatment for patients with end-stage renal disease. The advent of this therapeutic option has notably reduced morbidity and mortality in patients with this disease. Moreover, improvements in the clinical management of transplant recipi-

ents have contributed to increase graft survival and to limit the risks of rejection in kidney transplantation by proper pharmacological immunosuppression [Hariharan et al., 2000]. However, such lifelong immunosuppression, which poorly influences long-term chronic transplant dysfunction [Opelz, 1995], may promote tumor growth by a direct effect on tumor cells [Hojo et al., 1999] and may also decrease recipient immune responses to pathogens, including oncogenic viruses [Dantal et al., 1998; Soulillou and Giral, 2001]. In humans, immunosuppression withdrawal leads, in most cases, to transplant rejection. Nevertheless, certain rare patients ('operationally tolerant') maintain stable graft function despite the absence of treatment, suggesting that a state of nonresponsiveness can be achieved in clinical transplantation [Strober et al., 2000]. This phenomenon can occur in liver transplantation [Thomson et al., 2001;

This article contains supplementary material, which may be viewed at the *Journal of Cellular Biochemistry* website at <http://www.interscience.wiley.com/jpages/0730-2312/suppmat/index.html>.

Grant sponsor: FIRB International MIUR (Ministry for Education, University, and Research), Italy; Progreffe foundation, France.

*Correspondence to: Claudio Nicolini, Nanoworld Institute and Eminent Biophysics Chair, University of Genova, Italy. E-mail: manuscript@ibf.unige.it

Received 19 June 2007; Accepted 3 August 2007

DOI 10.1002/jcb.21556

Published online 00 Month 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

© 2007 Wiley-Liss, Inc.

Mazariegos et al., 2005] and in kidney recipients [Roussey-Kesler et al., 2006]. The understanding of the molecular mechanisms of tolerance in humans is therefore of central importance. Tolerant patients, indeed, offer a unique opportunity to study the clinical and biological characteristics potentially associated with tolerance. DNA microarrays are one of the most promising tools for molecular genomics [Butte 2002; Nicolini et al., 2002, 2006; Nicolini, 2006] capable to draw a picture of a whole genome. Recently, the employment of non-statistical bioinformatics and data-mining techniques has been proposed in order to identify *ab initio* a set of genes involved in a certain process and to make a hierarchy among them [Sivozhelezov et al., 2006]. The hierarchy is based upon the number of interactions of every single gene with all the other genes of the set, according to web-available databases such as STRING [von Mering et al., 2005] based on physical contact, involvement in the same metabolic pathway or co-citation in abstracts. The leader gene approach [Sivozhelezov et al., 2006] was applied for the first time in combination with microarray technology [Giacomelli and Nicolini, 2006; Nicolini et al., 2006] on human T lymphocytes stimulated to enter cell cycle with PHA [Abraham et al., 1980]. It was interesting to notice how genes with the highest number of interactions were invariably a very low number (only 6 for human T lymphocytes cell cycle) and that those genes, that were defined as 'leader genes,' are actually playing a central role in the process, namely at the transition or progression of cell cycle phases [Modiano et al., 2000; Kawabe et al., 2002; Oster et al., 2002; Baluchamy et al., 2003; Torgler et al., 2004] and inhibiting the whole cyclin complexes [Jerry et al., 2002; Chang et al., 2004].

In this article, we have applied this approach [Nicolini et al., 2006] to a unique situation of spontaneous tolerance of a mismatched kidney graft in human. This article suggests that even applied to a complex *in vivo* situation, this approach can allow to identify key genes, which may offer new opportunity of monitoring or modulating immune response against allograft. However several open problems and questions still remain open in the application of nanogenomics to medicine [Nicolini et al., 2006] and it is hoped that these studies of human kidney transplant will shed new light and clarifications.

METHODS

Microarray Datasets

The experimental datasets are derived from pangenomic microarrays fully described elsewhere [Braud et al., 2007]. Fifty-one individuals were included in the study: 8 patients tolerating a kidney graft (TOL) without any treatment and 18 patients with chronic rejection (CR) were evaluated against 8 healthy volunteers (HV) using a subset of the pangenomic (more than 35,000 genes) array displaying 6,865 genes (hence, "individual fullchip"). For every patient, two independent DNA amplifications were used. Data were expressed as mean values (\log_2) of the relative intensities [Cy3 (grafted patient)/Cy5 (pool of 169 kidney grafted recipients with stable graft function)]. This database emerges from our previous similar studies of original datasets called west-genopole based on different microarrays utilizing different gene nomenclature and obtained from 14 CR, 11 TOL and 6 HV patients (hence, "pool fullchip"). Note that the pool fullchip data will be further used for comparison of various methods of microarray data processing only, while functional and diagnostic conclusions will be drawn from the individual fullchip.

In every patient of both datasets, genes appear distributed in a Gaussian curve, being either upregulated or downregulated in both the CR and the TOL patients (see Fig. 1 for the "pool fullchip" and also Fig. ES1a,b). There is no discontinuity in gene expression-fluorescence intensity distribution. For the fullchip of rejection and tolerance gene subsets, distribution of their expression levels, both in natural and log scale, is analyzed in Figure ES2. In this graph, the genes are numbered according to the fluorescence intensity resulting from the difference (CR-TOL), defined, for each of the given gene, as the difference between "average \log_2 (expression) values for rejection cases - average \log_2 (expression) value for tolerance cases," the simplest imaginable discrimination criterion. Thus, negative values correspond to pro-tolerance genes, and positive to pro-rejection genes.

Gene Identification

Once the gene set has been identified, the leader gene algorithm allows to identify the genes with maximum connectivity, as fully described elsewhere [Sivozhelezov et al.,

Non-statistical Gene Microarray Analysis

3

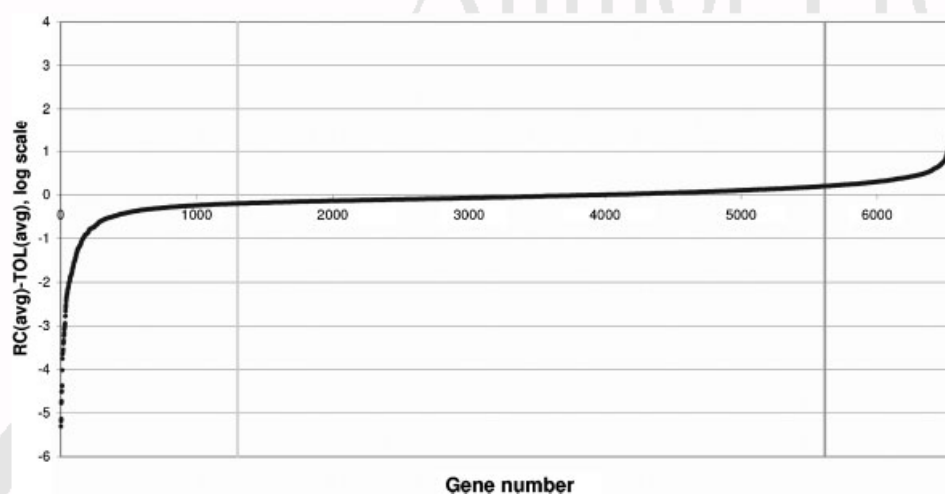


Fig. 1. Genes are numbered according to fluorescence intensity. The fullchip difference in intensity between CR and TOL is thereby giving a measure of their tolerance or rejection propensity. The lines indicate threshold used to select pro tolerance and pro rejection genes in the old full chip database. In the accompanying electronic supplement (Fig. ES1) the fre

quency distribution is given with respect to healthy volunteers HV of \log_2 fluorescence intensity $\text{intCR}/\text{intHV}$ for gene expression of patients displaying rejection (A) and $\text{intTOL}/\text{intHV}$ for genes expressing tolerance (B). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

2006]. Interactions between each pair of genes belonging to the set are calculated using STRING database [von Mering et al., 2005], giving a combined association score to each interaction. Scores are based on every kind of links between a pair of genes, for example, physical interaction or involvement in the same metabolic pathway, therefore providing a quantitative approach. Then, the sum of all combined association scores for every gene involved is calculated, and this parameter is defined as weighted number of links. The scores linking genes i and j taken from STRING were summed over j to provide a score for each gene i . Thus, the scores for each gene indicate how strongly it is connected to other genes of the same list. Summation of interaction scores is a feature not existent in the STRING algorithm. The scores are basically connectivity scores but resulting from several interaction types, one of which is co-expression according the microarray data, but others also contribute such as co-evolution, physically detected interactions between proteins encoded by the given genes, and adjacent positions in known metabolic/regulatory networks, but not “textmining”, referred to as, “co-mentioning” in the literature. Earlier, connectivity scores (however bitwise rather than weighted) were used to evaluate gene essentiality in yeast but with respect to protein interaction networks only [Estrada, 2006]. Scores obtained after summation were

clustered using the “K-means” technique [Datta and Datta, 2003; Tassi et al., 2005] to identify the most important genes (“Class A” or “leader genes”), as well as “Class B” genes. The K-means clustering was performed either with the in-house developed MATLAB-based software [Sivozhelezov et al., 2006] or the FuzME program [Minasny and McBratney, 2002], with the fuzzy option switched off. Therefore the algorithm allows predicting key genes responsible for the given cellular process, identified by their connectivity scores.

When we applied the leader gene identification algorithm to the 520 genes subset of pool dataset, and to its pro-tolerance and pro-rejection subsets, the numbers of genes in each class defined leader genes and class B (Fig. ES3). Whenever boundaries between clusters are near, where one gene may belong to several classes, “fuzzy” clustering appears definitely preferential. Such “moving” genes are shown in blue boxes, which characterizes them as doubtful (intermediate) and thereby possibly excluding them from leader genes or Class B genes (Fig. ES3). Performance of MATLAB and FuzME clustering algorithm implementations with respect to the gene expression data was done using the positive and negative subsets from the difference CR–TOL values in the normal (not logarithmic) scale (Figs. 2 and ES4). Besides, we applied the threshold value to reduce the noise. Initially, the threshold was

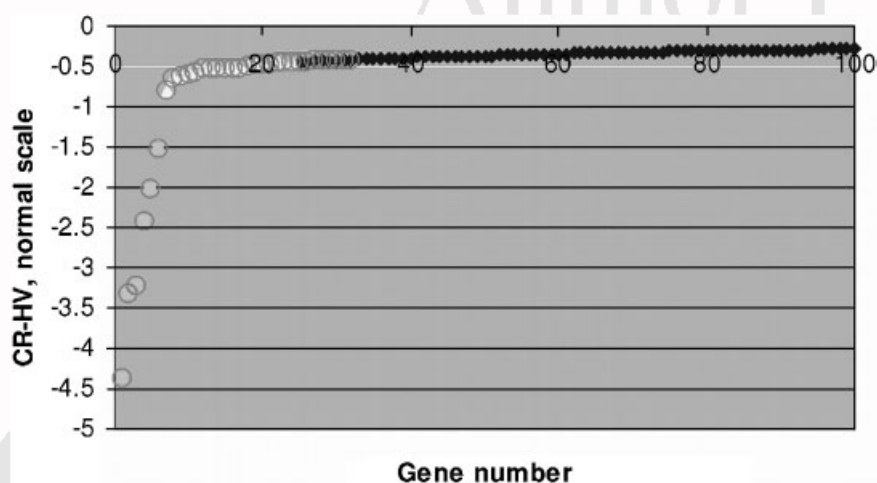


Fig. 2. Divergence of two clustering algorithm implementations on the pro tolerance subset of reliability filtered, and amplitude filtered fullchip genes. Green, Class A genes according to MATLAB; yellow, Class B according to MATLAB; dark blue, the rest of genes. Red circles indicate the 32 top scoring genes identified by the FuzME implementation. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

set at 0.5. This resulted in 114 positive (pro-rejection) and 376 negative (pro-tolerance) genes. Expression leader genes were calculated for both 114 pro-rejection and 376 pro-tolerance gene sets. For both pro-rejection and pro-tolerance Class A genes remain the same for two algorithm implementations, although convergence details vary. For tolerance, an extra Class B gene is observed in the case of MATLAB. Further, algorithms were compared for the dataset unfiltered by threshold. For pro-rejection, both the Class A and Class B lists as well as convergence was the same. For pro-tolerance, however, the results now showed two extra Class B genes, with essential difference in convergence. Different performances of the two algorithm implementations could serve as an indicator of poorer data reliability. The similarity of the two clustering algorithms is however confirmed in most cases both in terms of total number of genes in Classes A and B (Table ES1) and of the actual number of the corresponding genes (Table ES2).

The “fullchip” (both pool and individual) provides an opportunity to separate the “pro-rejection” and “pro-tolerance” genes, and we thereby initially mapped the 507 “ab initio” genes and 520 genes earlier tentatively identified from the “old fullchip” microarray as most varying from CR patients to TOL patients, onto an averaged “rejection-tolerance” graph of the “fullchip” (Fig. ES5). The 507 “ab initio” genes were obtained by the following procedure

described in detail in Sivozhelezov et al. [2006]—Step 1: identification of initial gene list by keyword searches of multiple databases; Step 2: expansion of the list using interaction networks; Step 3: crosschecking the newly found genes against PubMed/Genbank links to delete irrelevant genes; Repeat Steps 2 and 3 until convergence to obtain the final gene list. Interestingly and comfortingly the 507 “ab initio” independently computed genes [Sivozhelezov et al., 2006] are distributed over the pool fullchip plot as evenly as the 520 “microarray-experimentally identified” genes. Consequently, considering the highly flexible nature of FuzME, which is entirely in the public domain, we adopted it for further use in the in-house developed software LEADERGENE (in preparation).

In all data analyzing microarray-based data, FuzME and MATLAB in most instances gave identical results in identifying Class A and Class B genes yielding occasional divergence of the two clustering algorithm implementations only in such discrimination but not in the total A + B genes identification.

Validity of Microarray Data

The data validity is determined by counting the fraction (%) of valid data, that is, data actually present in the microarray for each gene, separately for tolerance and rejection samples. In the pool fullchip, the total numbers

Non-statistical Gene Microarray Analysis 5

of the tolerance and rejection samples were 28 and 42, respectively. For example, for gene ABCA1-1A, the fraction is $39/42 = 93\%$ among the "rejection" samples, and $18/28 = 64\%$ among the "tolerance" samples. Clustering analysis according to that parameter showed that about 74% "pro-rejection" genes and 71% "pro-tolerance" genes were classified in the top category, which we termed "reliable." Three more categories were revealed, termed "medium," "unreliable," and "very unreliable." Figure 3(top) shows the presence of the genes in the four categories. This limited validity does not appear however to introduce any bias in the "pool fullchip" data for either pro-TOL or pro-CR genes (Fig. ES6), with the linear regression giving 93% correlation coefficient with the slope of the regression line close to unity.

To further check if unreliability could be related to nomenclature problem, we calculated the fraction of genes not adhering to HGNC nomenclature in each of the four categories. If the nomenclature problems did not affect the reliability, we could expect the same fractions for the "bad" genes as for all genes. This is not the case. Even though the fractions of "bad genes" are close to those for all genes, occurrence of "bad" genes relative to all genes increases from category to category (Fig. 3, bottom). The fact that the observed differences are small is readily explained by the fact that the disagreement with HUGO nomenclature does not necessarily mean that the deposited sample is unreliable. In fact, many of the genes obviously not adhering to the HGNC nomenclature in the "fullchip" microarray analyzed can

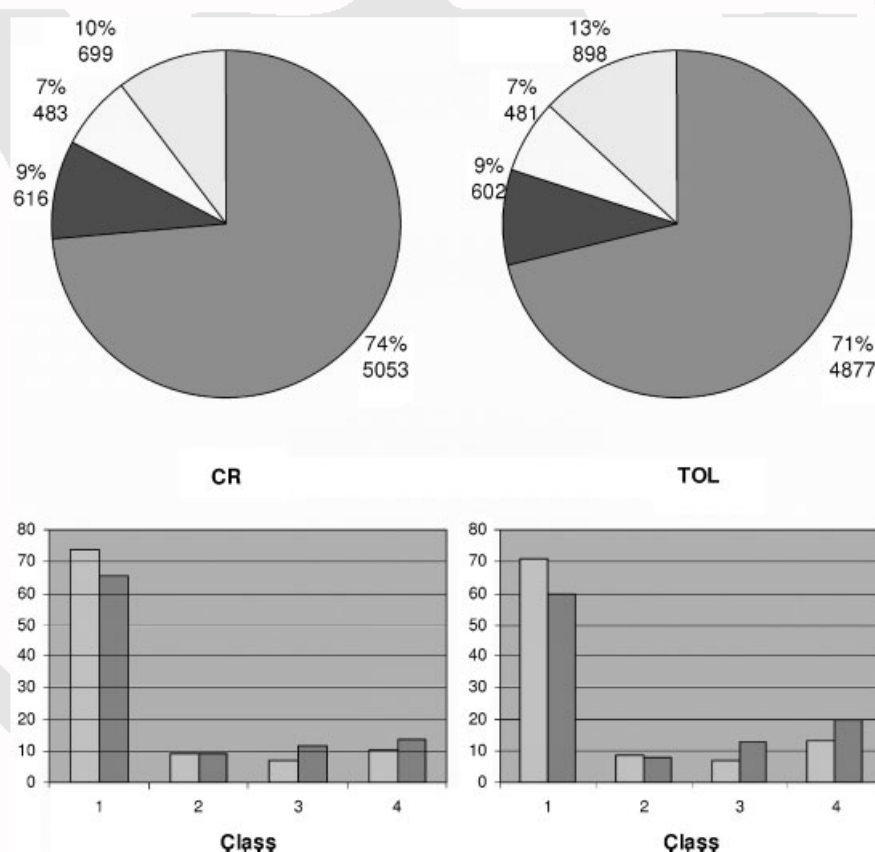


Fig. 3. Top: percentages of classes of genes belonging to the four categories with respect to reliabilities in the old "fullchip" raw dataset. Color code is: blue, high reliability; brown, medium reliability; yellow, low reliability, and cyan, very low reliability. **Bottom:** the same values compared to fractions (%) of genes not adhering to the HGNC nomenclature ("bad") in each genes with respect to total "bad" genes. **Left:** CR data. **Right:** TOL data. Color code is: green, fraction of all genes belonging to the class as in pie chart above, for example, 74% for high reliability in CR; red, fraction of "bad" genes belonging to the given class among

all "bad" genes. CR dataset consists of 42 samples in total and 6,864 genes, while TOL dataset consists 28 samples in total and 6,864 genes. Reliability is given by the percentage of proven expression data by GENEPIX in such genes for 70 microarray samples. No such distributions are observed in the new fullchip raw dataset where over 98% of the genes show instead reliable data with respect to the 70% reliability criteria. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

be assigned using parsing and database searches, for example, siUNC13Celegans is resolved as the following gene, "Official Symbol: UNC13B and Name: unc-13 homolog B (*C. elegans*) [Homo sapiens]." Similarly, "siRAB11amemberR" is resolved as "Official Symbol: RAB11A and Name: RAB11A, member RAS oncogene family [Homo sapiens]." However, some gene specifications used in the "old fullchip" microarray contain sequences that have been revoked from GenBank presumably by their own authors, in which the GenBank record contains a note that it has been discontinued, one example being siVoltLOC121358. Such nucleotides do not necessarily contain gene sequences, and thus may well be the cause of the entire absence of expression data, as well as in poor reproducibility of the data when present. Our findings are in agreement with the reported generally poor (32–33% correlation coefficient) reproducibility of the microarray data across laboratories [Members of the Toxicogenomics Research Consortium, 2005], which, however, was increased to 56–59% after nomenclature and data handling was standardized. Further increase (in some cases up to 97%) was indeed achieved by standardizing experimental procedures. This is exactly what appears in our individual FullChip, which, in contrast to the pool fullchip, has as much as 98% genes passing the 70% reliability criterium.

RESULTS AND DISCUSSION

Leader genes calculated from interactions of pro-rejection and pro-tolerance genes from both individual and pool microarrays are shown in Table I, filtered in the logscale, and in Table II filtered in the natural scale. From Table II which is normal scale filtered at ± 0.2 for CR, almost all Class A and Class B interaction-based genes are also in the SAM list, while there are only 3 out of 45 interaction-scored Class A and Class B genes in the pool dataset. The drastically increased reliability of the individual microarray dataset compared to the pool dataset is causing improved compatibility of the SAM analysis results with the results of scoring the fullchip genes by interaction (Table II), showing a potential for combined use of expression-based and interaction-based approaches. From Table I, the log scale data appear to make no sense at all with respect to interactions. Not only the occurrence in the SAM-filtered data is

nearly zero, but also the Interaction Classes A and B are completely different for individual fullchip derived data compared with the pool fullchip.

Variation of Filtering Parameters for Leader Genes Identification

The microarray genes "0.2 filtered" were ranked according to interaction scores, and the resulting Class A and Class B are shown in Table II. For TOL, 4 out of 29 Interaction Class A + B genes are in the SAM list while none was present in the pool dataset. Interestingly, molecular mechanisms of tolerance and rejections appear to be very different. For CR, many genes are changing their expression, but they interact not so strongly as the TOL ones. Instead, TOL genes do not change their expression so much but they are connected stronger. Results on the individual fullchip are simply amazing, namely our non-statistical (expression-based) approach gives almost perfect compatibility with SAM data. The individual dataset is extremely reliable according to our criteria (70% valid samples). Namely, data for 6,743 out of 6,864 genes (98%) are reliable. Moreover, the two TOL genes, namely CCL4L1 and BANK1, most frequently changing their expression, are also the most SAM-significant.

Furthermore for Classes A and B genes: (1) among pro-CR are ubiquitins and proteasomal protein, which are responsible for protein degradation and are not occurring among pro-TOL interactions; (2) instead among pro-TOL genes, there are many ribosomal proteins and translation factors (both initiation and elongation) genes responsible for protein synthesis; (3) two out of four highly interacting pro-CR genes also occurring in the 343 SAM list are proteasomal proteins. Among TOL, one out of two highly interacting pro-TOL is a ribosomal protein; (4) genes responsible for transcription, namely those encoding different subunits of RNA polymerase, are high-scoring among both pro-CR or pro-TOL genes.

This example shows the potential of combining statistical (SAM) microarray analysis with non-statistical analysis as proposed herein, aided by calculations of gene interaction networks. Obviously the statistical and non-statistical approaches to microarray data analysis should be further optimized since their basic principles are drastically different, and nomenclature issues should be resolved for

Non-statistical Gene Microarray Analysis

TABLE I. "Interaction-Based" Class A and Class B Leader Genes in Kidney Transplant Calculated from the Two Log-Scale, ± 0.2 Filtered Pro-Tolerance and Pro-Rejection Datasets, Without Any Reliability Filtering

Pool fullchip, pro-tolerance (Class A)	Pool fullchip, pro-rejection (Class A)	Individual fullchip, pro-tolerance (Class A)	Individual fullchip, pro-rejection
FYN	HDAC1	RB1	POLR2I
ATM	HSPCA	POLR2B	POLR2D
TP53	STAT3	CREBBP	PLCB3
PIK3R1	CSF3R	GTF2F1	GTF2B
PTPN11	TNFRSF1A	JAK3	HRAS
INSL3		SFRS1	GTF2E2
POLR2D		SF3B1	TAF7
LCK		HNRPH1	GTF2A1
IL6ST		EGFR	IL2RB
IL7R		MAPK14	TAF5
EPOR		PIK3CA	TAF10
AR		HNRPD	LCK
PTPRC		CPSF3	
		HNRPH2	
		CASP3	
		SFRS3	
		MADH4	
		FYN	
		HNRPR	
		SNRPA1	
		SF3A2	
		PIK3R1	
Old fullchip, pro-tolerance (Class B)	Old fullchip, pro-rejection (Class B)	New fullchip, pro-tolerance (Class B)	New fullchip, pro-rejection (Class B)
UBA52	JAK2	SHC1	IL4R
JUN	RB1	PIP5K1A	HNRPU
IL7	SYK	ATF2	NME2
BLM	MAP3K7	GTF2H2	RPL5
PTK2	MDM2	GTF2H3	DGKB
SBC	IL13RA1	STAT1	DGKI
RPA3	PRKR	PIK3CB	LIPG
CCND2	POS	YWHAZ	DGKD
TCEA1	ITGB2	IFNG	DGKQ
HNRPA1	HSPA8	IRAK2	VAV1
FRS2	LRP1	MAP3K1	CD4
IL12B	HNRPM	CSNK1G2	EP300
SOCS4	HTATIP		TRAF2
CTLA4	TUBA2		RPL22
INSR	SAP30		RPL35
CDC45L	HNRPK		POLD1
MCM6	PSMD14		SNRP70
AKR1C3	PSMD8		THOC4
SRD5A2	PSMC1		DDI1
PLCB3	PSMB8		CDKN1A
IL11	NT5C3		PRKCQ
GHR	PSME1		IL6
SFRS7	G22P1		TRAF6
	UBE2I		CD38

Genes occurring in SAM selected list are shown in bold.

more efficient scanning of gene interaction databases. In order to identify the most SAM-compatible gene set, we have changed expression threshold and expression versus interaction-based gene clustering (Table III). From Table III, it appears that the number of leader genes interaction-based at 0.2 expression threshold is identical to the SAM derived leaders identified by the same FuzME clustering algorithm. It is worth noting that K-means clustering by FuzME is unfeasible (not

converged) for the 56 gene SAM-selected list from the pool fullchip dataset, while perfectly converged for the 343 gene SAM-selected list from the individual fullchip SAM dataset (Table ES3). Furthermore (Table IV) the occurrence of top interaction-scored genes among SAM-derived gene list dramatically increases in the new with respect to the old dataset, up to 29 out of 68.

Interestingly to further corroborate the choice of this 0.2 expression filtering, Figure 4

TABLE II. "Interaction-Based" Class A (Leader) and Class B Genes in Kidney Transplant Calculated From the Two Natural Scale, ± 0.2 Filtered Pro-Tolerance and Pro-Rejection Datasets, Without Any Reliability Filtering

Gene	Score	Class	Gene	Score	Class	Gene	Score	Class	Gene	Score	Class
CSE3R	12.78	A	JUN	20.31	A	MGAM	5.39	A	IRAK2	9.00	A
JAK2	10.24	A	IL6ST	18.60	A	CD14	4.78	A	CDC2L2	5.40	A
LYN	8.91	A	PLCB4	18.01	A	ITGB2	4.48	A	PANG	5.40	A
IL13RA1	8.34	A	IL2RB	14.65	A	CTSG	4.48	A	PCTK3	5.40	A
CTSB	7.35	A	IL2RA	13.92	A	JAK2	3.76	A	RPS6	3.65	A
IFNG	6.59	A	IL7R	12.85	A	PYGL	3.60	A	RPS4Y	3.64	A
ITGB3	6.35	A	IL5RA	12.79	A	AGL	3.59	A	RPS4Y2	3.64	A
HCK	6.34	A	PIP5K1A	12.60	A	F5	3.49	A	RPL36	3.64	A
YWHAE	6.30	A	PIP5K2A	12.60	A	STAT5B	3.44	A	PMAIP1	3.60	A
ITGB2	5.98	A	PTPN11	11.59	A	CS1B	2.98	A	IL7R	3.20	A
CTSG	5.97	A	DGKI	10.81	A	TLR2	2.80	A	RAEA	2.86	A
CD9	5.97	A	CDC2L5	10.80	A	F2	2.00	B	CCL30	1.99	B
ASAH1	5.40	A	DCAMKL1	10.80	A	ANXA2	1.87	B	CCR6	1.99	B
DYRK3	5.40	A	DGKE	10.80	A	S100A10	1.87	B	PTPRC	1.90	B
PRKR	5.40	A	DGKH	10.80	A	CDA	1.87	B	PTPRCAP	1.90	B
SNF1LK	5.40	A	ENPP2	10.80	A	NP	1.87	B	E2F5	1.80	B
MGAM	5.39	A	LIPG	10.80	A	GLA	1.80	B	IL1B	1.80	B
STAT5B	5.24	A	PNLIPRP1	10.80	A	IFNG	1.80	B	PTGDS	1.80	B
GOT2	5.20	A	PRKAA2	10.80	A	ATP6V1B2	1.52	B	PTGS2	1.80	B
TRAF2	4.97	A	PLG	10.51	A	ATP6V1D	1.52	B	ATM	1.80	B
TNFRSF1A	4.97	A	HRAS	10.44	A	CD53	1.49	B	IL1A	1.80	B
CDK5R1	4.83	A or B	IFNG	9.80	A	CD9	1.49	B	IL11	1.60	B
SYK	4.79	A or B	AGPAT1	9.18	B	ILK	1.49	B	IL12B	1.60	B
CD14	4.78	A or B	MAPK10	8.70	B	MAD	1.49	B	KRAS2	1.60	B
PCTK1	4.52	A or B	IL11	8.37	B	SAP30	1.49	B	RASA2	1.60	B
SDC1	4.48	A or B	IL7	8.10	B	VNN2	1.49	B	TIF1	1.49	B
CS1B	4.47	A or B	IL20	8.00	B	PPBP	1.49	B	GZMB	1.48	B
KIT	4.43	A or B	IL24	8.00	B	CAMP	1.49	B	SERP1NB9	1.48	B
TNFSF10	3.65	B	SOCS5	8.00	B	CTSL	1.49	B	SERP1NB9	1.48	B
EROC2	3.60	B	C3	7.94	B	FCER1A	1.49	B	EXRG	1.37	B
ACADM	3.60	B	PTK2	7.86	B	IGHF	1.49	B			
PYGL	3.598165	B	IL3	7.39	B	IGHE	1.49	B			
F2	3.598	B	AKR1C3	7.20	B	CTSH	1.49	B			
AGL	3.592404	B	AKR1C4	7.20	B	LTF	1.49	B			
IL13	3.54872	B	SRD5A2	7.20	B	NMI	1.48	B			
F5	3.49146	B	GPX2	7.20	B	CARD12	1.48	B			
TLN1	3.368252	B	GUSTO2	7.20	B	CASP1	1.48	B			
ANXA2	3.365658	B	DUSP10	6.99	B	LGALS1	1.31	B			
PLAUR	3.364	B	UGT2A1	6.86	B	LGALS3	1.31	B			
S100A10	3.36382	B	MAP3K7IP1	6.82	B	LY96	1.00	B			
CASP1	3.283873	B	IL6	6.76	B						
IL15	3.199415	B									
IL21	3.196838	B									
MADH7	3.094	B									
A2M	3.0717	B									

Gene list: CR (left) and TOL (right). Genes occurring in SAM lists are shown in bold.

Non-statistical Gene Microarray Analysis

TABLE III. Average Number of Pro-Tolerance and Pro-Rejection Genes Respectively With TOL and CR Patients for the Three Different Microarray-Based Estimates, Two FuzME and One SAM With Individual Fullchip Dataset

Set	Analysis	CR			TOL			Total
		Class A	Class B	Total	Class A	Class B	Total	
I nat scale interaction-based T6-I	Unfiltered no thresh	15	65	80	63	27	90	170
I nat scale interaction-based	± 0.1 thresh	20	24	44	18	21	39	83
I nat scale interaction-based T6-I	Unfiltered no thresh	15	65	80	63	27	90	170
I nat scale interaction-based	± 0.1 thresh	20	24	44	18	21	39	83
I nat scale interaction-based T4	± 0.2 thresh no reliab	11	28	39	18	11	29	68
I log scale interaction-based T3	± 0.2 thresh	12	13	25	22	12	34	59
II error normalized SAM (similar to logscale) clustered estimates	Weighted by errors no thresh	10	28	38	16	13	29	67
III nat scale expression-based	Unfiltered no thresh	14	17	31	9	13	22	53
III nat scale expression-based	± 0.1 thresh	13	13	26	9	8	17	43
III nat scale expression-based	± 0.2 thresh	13-14	18-17	31	9	8	17	48

It is worth to notice that (a) since nearly all genes (about 98%) have reliability above 70% in the Individual FullChip, results therefore remain the same as ones for reliability unfiltered Fullchip; (b) since only 15 CR and 12 TOL genes have difference above 0.5 in the Individual FullChip, clustering fails for ± 0.5 thresh no reliab.

shows the pro-tolerance and pro-rejection genes belonging to the 56 SAM-based genes derived from the “pool fullchip” dataset mapped onto the same “old fullchip” plot. We see that a vast majority of the 56 genes fall into the leftmost and the rightmost wings of this distribution. More extreme values are not included into the SAM-based 56 gene set since there are too many missing data for them, and consequently the error is quite large, while SAM normalizes the values by their errors. For example the most “pro-tolerance” gene GPR74 (bottom left point on the diagram) is very unreliable: it is based only on two “rejection” datapoints (-0.04 to 0.28 , respectively) and one “tolerance” (6.48) out of 70 possible variants (patients, arrays, hybridization, etc.). Such data are excluded by the SAM software, since statistics used in SAM uses the difference in expression levels divided by error obtained for the particular genes, so such scaled difference will be very low in genes like

GRP74. By applying the expression level-based filters that we have introduced for our leader gene identification, we excluded from further consideration the genes that, by themselves, do not appear indeed to discriminate between tolerance and rejection (examples of such genes are shown by arrows in Fig. 4, and the quasi-random nature of their expression profiles are shown in Fig. ES7).

SAM-Compatible Gene Set

For the SAM-compatible gene set, that is, the genes ± 0.2 filtered by (CR-TOL) amplitude, interaction map was calculated (Fig. 5). It is immediately visible that the densest network is formed around the cluster of interleukins. The interleukin cascade is tightly connected with two caspase genes, CASP1 and CASP8, which are proteases essential in apoptosis [Danial and Korsmeyer, 2004]. Note that caspase CASP1 is among the pro-CR genes according to the SAM

TABLE IV. Occurrence of Top Interaction-Scored Genes Among SAM-Derived Gene List in the Pool and Individual Datasets

Threshold	Pool fullchip dataset		Individual fullchip dataset	
	Leaders in SAM list	Total leaders	Leaders in SAM list	Total leaders
None	0	59	6	170
0.1	1	73	9	83
0.2	4	86	29	68

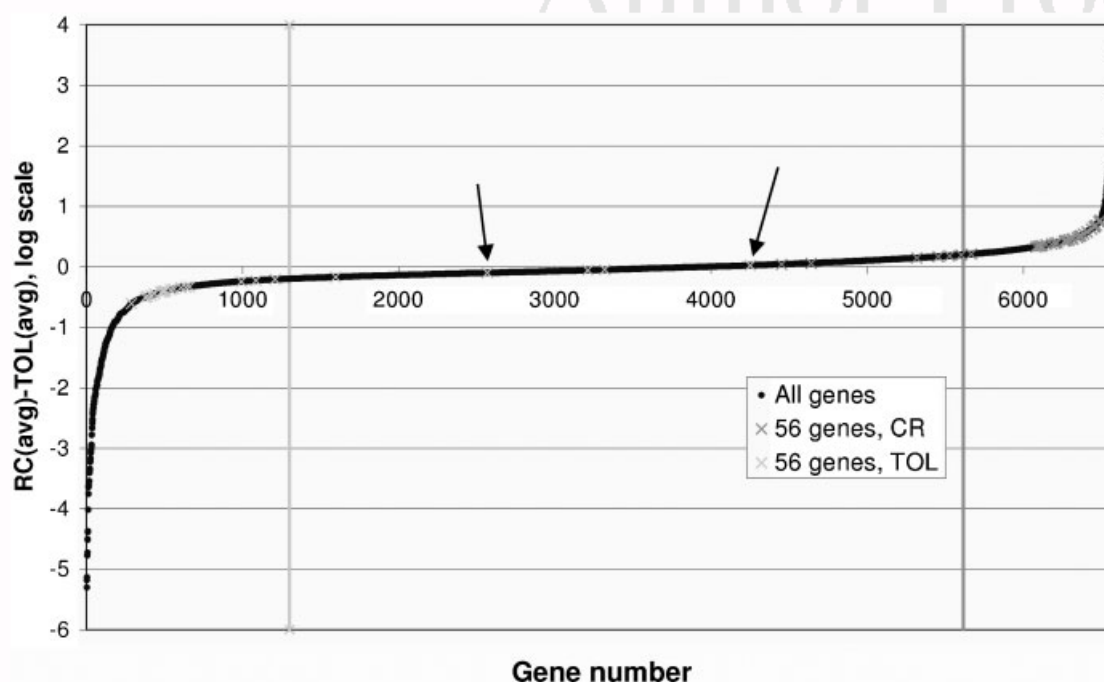


Fig. 4. Genes from the “fullchip” plotted according to their tolerance or rejection propensity, that is, difference in expression in log scale between RC and TOL genes, with the 56 SAM identified genes [Brouard et al., 2005] marked. Arrows indicate genes included in the 56 gene dataset but possibly unable to discriminate rejection/tolerance. Lines indicate thresholds used in selecting genes for “pro tolerance” and “pro rejection” leader gene calculations. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

data. A distinct network of signal transduction responsible for immune response is visible spanning the entire map (Fig. 5), which could be a starting point for further analysis of molecular mechanisms of kidney graft tolerance and rejection. This network contains kinases, receptors, and other signal transducers. One of those transducers, STAT5B, activator of transcription, is connected, via N-myc contacting protein (NMI, top left) to a network of genes encoding proteasomal proteins not shown on the diagram since their difference in expression is slightly below 0.2, but still present among SAM proCR genes. Proteasomes, as well as caspases, participate in protein degradation and both are pro-CR. Ribosomal proteins RPL36, RPS4Y1, and RPS5 are also present (bottom right of the diagram). Notably, these proteins are present in the SAM gene list as pro-tolerance. Both CR and TOL genes tend to group together apparently forming pro-CR and pro-TOL sub-networks, respectively. Such sub-networks likely indicate gene sets that are upregulated or downregulated in a concerted manner, specifically to tolerance or rejection. Thus, the sub-network centered on the RARA gene (top left of Fig. 5)

is pro-TOL with the exception of the pro-CR PIN1. Similarly, the network around the genes ITGB2 and TLR2 (bottom left) is pro-CR, again with an exception of TLR10 (pro-TOL). Similarly, the already mentioned networks involving caspases and interleukins are pro-CR with the exception of the pro-TOL IL1A (bottom center of Fig. 5).

One example of the opposite pattern is also observed, namely a pro-TOL IL7R gene at the very center of a pro-CR network, denoting its strong regulatory role in the changes in gene expression incurred during tolerance and rejection. Taken together, the data indicate that the regulation mechanism of tolerance and rejection may involve networks of genes all showing completely pro-CR or pro-TOL expression patterns. However, these sub-networks are connected to each other and pro-CR networks can be regulated by a pro-TOL gene as in the example of IL7R. Involvement of caspases in cell death is widely known, so appearance of a pro-rejection caspase network among the genes differentially expressed during tolerance/rejection is in agreement with the finding that cell death-related genes are among those changing

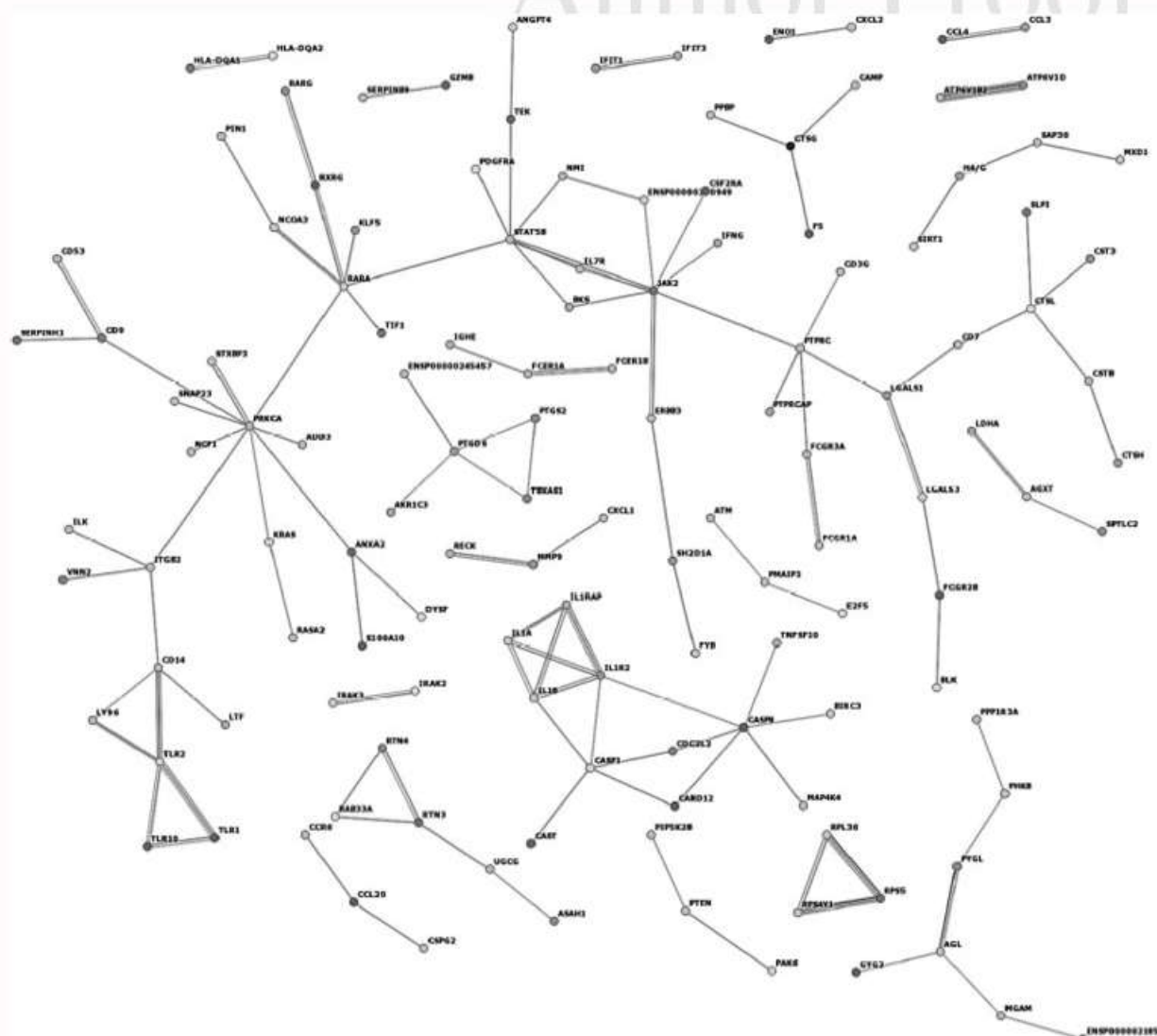


Fig. 5. Complete interaction map “no textmining” interaction map calculated for the “Class 1” reliable genes and filtered by (CR TOL) amplitude, as obtained from the new fullchip microarray datasets (see Table II for their names and ranking according to their number of interactions). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

their expression similarly in kidney and liver graft. The interleukin networks seen in Figure 5 and especially of the special role of IL7R observed herein can be a part of the molecular basis of the known role of interleukin 7 in graft survival [Wang et al., 2006].

Thus a pattern emerges whereby increased protein degradation is related to chronic rejection while increased protein synthesis is related to tolerance. Generally, the microarray data in combination with interaction analysis allow identifying functional networks of co-expressed proteins, which is not feasible using each of the methods separately.

CONCLUSIONS OF PART I AND PART II

The overall conclusion is that there are many genes in common in the highest interaction genes derived from individual fullchip and the 343 SAM-gene list. Notably, convergence between the SAM approach and our non-statistical approach becomes much better for the individual dataset, in which the CR/TOL fold changes are much lower, compared to the old dataset. The primary reasons are (1) we use expression levels in normal scale whereas SAM uses expression levels normalized by their errors (thus practically reducing the signal to

noise level) and (2) SAM uses permutation (random shuffling) of the data, and then extracts significant genes by comparing the permuted and non-permuted set. The SAM-derived genes typically have shown small differences of expression levels explained by the fact that SAM package operates with "relative difference" d which is the actual difference D divided by a sum of its standard deviation s with an arbitrary constant s_0 , $d = D/(s + s_0)$, which should make equally significant the small but highly reproducible change and the large but poorly reproducible change in gene expression. Since physical grounds of such an approach are unclear, we separated the two parameters, that is, the magnitude and the reliability, but using two independent filters, one based on percentages of valid samples, and the other on amplitude threshold. In this respect, our approach is less arbitrary because we calculate them using objective clustering and the actual experimental fluorescence distribution in the microarray. When proper microarray reliability and proper expression threshold are applied, we reach the conclusion that it was necessary to acquire and analyze a new, individual dataset, which proves quite adequate to the task. Poor compatibility between our approach and the SAM approach in the pool dataset is apparently caused by the essential difference between the two approaches in that our two filtering parameters are addressing the reliability and the amplitude of the expression levels independently. Indeed, two thresholds are present: one by amplitude, and the other by reliability. Instead, both the SAM denominator parameter and the SAM significance threshold are related to reliability and amplitude in a complicated manner. Similarly to our approach, SAM has two adjustable parameters, namely the above-described arbitrary constant in the denominator $d = D/(s + s_0)$ for relative difference, and the significance threshold. In this respect, our approach is less arbitrary because we calculate them using objective clustering and the actual experimental fluorescence distribution in the microarray. When proper microarray reliability and proper expression thresholds are applied, the compatibility between the two approaches is very good (Table IV). Furthermore, the final leader genes map shed new light in the molecular mechanisms controlling human kidney transplant. Microarray experimentation becomes indeed

much more targeted and significant, by comparing gene expression analysis with the analysis of gene networks and interactions. In this context, we successfully applied different variants of the leader gene identification algorithm, in order to identify the ones best representing real gene networks.

All the findings described here, regarding kidney transplant tolerance but also possibly being extended to other systems, confirm the existence of a small set of genes, having a higher number of interactions among all the genes involved in the cellular process and therefore playing a central role. The identification of most interacting genes can be of great importance in the systematization and analysis of data, since leader gene, considering also those largely changing expression in different patients, forms a unique network: the mere changing in the expression of a particular gene is not significant by itself, but only if it is put in a proper framework. This change can be often considered as a consequence of a more complex network of events, starting from leader genes, identified with bioinformatics predictions, which often do not vary their expression so much to be identified as significant using pangenomic arrays. However, microarray technology is a necessary confirmation of every prediction made by theoretical network analysis. On the other hand, statistically processed microarray data can serve as the starting point for network analysis.

We introduce a non-statistical approach to processing microarray data, in which we apply K-means clustering to microarray data only after independent filtering by both amplitude and reliability that we define as percentage of valid data for each gene. The need for non-statistical treatment, in addition to statistical treatment of microarray data, has been recognized time ago [Affymetrix Inc., 2004] because "microarrays are the unusual statistical case where the number of tests greatly exceeds the number of samples, so standard statistical methods for multiple comparisons are pushed to their limit." To our knowledge this is the first step in that direction. Results of the non-statistical approach of microarray data interpretation are widely different from the statistical (SAM) approach for the pool dataset, but are similar for the individual dataset. At the moment, none of the three approaches (Tables IV and ES3), namely the "ab initio"

approach, the microarray-based statistical approach, and the microarray-based non-statistical approach, has proved superior in identifying the key genes responsible for kidney graft rejection and/or tolerance, and showing that those approaches must be used in a complementary manner, considering also that reasons for the divergence of those approaches have been identified. Moreover, Table IV of this article showing average number of pro-tolerance and pro-rejection genes, respectively, with TOL and CR patients for the three different microarray-based estimates provides a basis for combined sets of genes to be used in such forthcoming studies. Besides, identification of a pathway possibly important in controlling mechanisms of tolerance and rejection has demonstrated a high potential for the combination of approaches used herein. Genomics do however suffer many pitfalls [Nicolini et al., 2006] and only proteomics [Ramachandran et al., 2006] represents the long range answer to the basic molecular understanding and to the clinical control of the human kidney transplants.

ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by an FIRB International Grant on Proteomics and Cell Cycle (RBN04RXHS) from MIUR (Ministero dell'Istruzione, Università e Ricerca) to CIRSDNOB-Nanoworld Institute of the University of Genova and by MIUR grant for "2007 Funzionamento" to Fondazione Elba. This project was also supported by Progreffe foundation from Nantes (France).

REFERENCES

- Abraham S, Vonderheid E, Zietz S, Kendall FM, Nicolini C. 1980. Reversible (G0) and nonreadily reversible (Q) noncycling cells in human peripheral blood. Immunological, structural, and biological characterization. *Cell Biophys* 2:353-371.
- Affymetrix Inc. 2004. GeneChip® expression analysis: Experimental design, statistical analysis, and biological interpretation. Santa Clara, CA: Affymetrix Inc.
- Baluchamy S, Rajabi HN, Thimmapaya R, Navaraj A, Thimmapaya B. 2003. Repression of c-Myc and inhibition of G1 exit in cells conditionally overexpressing p300 that is not dependent on its histone acetyltransferase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9524-9529.
- Braud C, Baeten D, Giral M, Pallier A, Ashton-Chess J, Braudeau C, Chevalier C, Lebars A, Leger J, Moreau A, Pechkova E, Nicolini C, Soullillou JP, Brouard S. 2007. Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplants recipients. I. Blood gene expression statistical analysis. *J Cell Biochem* (accepted).
- Brouard S, Dupont A, Giral M, Louis S, Lair D, Braudeau C, Degauque N, Moizant F, Pallier A, Ruiz C, Guillet M, Laplaud D, Soullillou JP. 2005. Operationally tolerant and minimal immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. *Am J Trans* 5:330-340.
- Butte A. 2002. The use and analysis of microarray data. *Nat Rev Drug Discov* 1:951-960.
- Chang BL, Zheng SL, Isaacs SD, Wiley KE, Turner A, Li G, Walsh PC, Meyers DA, Isaacs WB, Xu J. 2004. A polymorphism in the CDKN1B gene is associated with increased risk of hereditary prostate cancer. *Cancer Res* 64:1997-1999.
- Daniel NN, Korsmeyer SJ. 2004. Cell death: Critical control points. *Cell* 116:205-219.
- Dantal J, Hourmant M, Cantarovich D, Giral M, Blancho G, Dreno B, Soullillou P. 1998. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: Randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet* 351:623-628.
- Datta S, Datta S. 2003. Comparisons and validation of statistical clustering techniques for microarray gene expression data. *Bioinformatics* 19:459-466.
- Estrada E. 2006. Virtual identification of essential proteins within the protein interaction network of yeast. *Proteomics* 6:35-40.
- Giacomelli L, Nicolini C. 2006. Gene expression of human T lymphocytes cell cycle: Experimental and bioinformatic analysis. *J Cell Biochem* 99:1326-1333.
- Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, Taranto SE, McIntosh MJ, Stablein D. 2000. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. *N Engl J Med* 342:605-612.
- Hojo M, Morimoto T, Maluccio M, Asano T, Morimoto K, Shimbo T, Suthanthiran M. 1999. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. *Nature* 397:530-534.
- Jerry DJ, Dickinson ES, Roberts AL, Said TK. 2002. Regulation of apoptosis during mammary involution by the p53 tumor suppressor gene. *J Dairy Sci* 85:1103-1110.
- Kawabe T, Suganuma M, Ando T, Rimura M, Hori H, Okamoto T. 2002. Cdc25C interacts with PCNA at G2/M transition. *Oncogene* 21:1717-1726.
- Mazariegos GV, Zahorchak AF, Reyes J, Chapman H, Zeevi A, Thomson AW. 2005. Dendritic cell subset ratio in tolerant, weaning and non-tolerant liver recipients is not affected by extent of immunosuppression. *Am J Transplant* 5:314-322.
- Minasny B, McBratney AB. 2002. FuzME version 3.0, Online. Available at <http://www.usyd.edu.au/su/agric/acepa/pag.htm> (verified 24 August 2007). Australian Centre for Precision Agriculture, University of Sydney, Sydney, Australia.
- Modiano JF, Mayor J, Ball C, Fuentes MK, Linthicum DS. 2000. CDK4 expression and activity are required for cytokine responsiveness in T cells. *J Immunol* 165:6693-6702.
- Nicolini C. 2006. Nanogenomics for medicine. *Nanomedicine* 1:147-151.

- Nicolini C, Malvezzi M, Tomaselli A, Sposito D, Tropiano G, Borgogno E. 2002. DNASER I: Layout and data analysis. *IEEE Trans Nanobiosci* 1:67–72.
- Nicolini C, Spera R, Stura E, Fiordoro S, Giacomelli L. 2006. Gene expression of human T lymphocytes: Experimental determination by DNASER technology. *J Cell Biochem* 37:1151–1158.
- Opelz G. 1995. Influence of treatment with cyclosporine, azathioprine and steroids on chronic allograft failure. The Collaborative Transplant Study. *Kidney Int Suppl* 52:S89.
- Oster SK, Ho CS, Soucie EL, Penn LZ. 2002. The myc oncogene: Marvelous Y complex. *Adv Cancer Res* 84:81–154.
- Ramachandran N, Hainsworth E, Demirkan G, LaBaer J. 2006. On-chip protein synthesis for making microarrays. *Methods Mol Biol* 328:1–14.
- Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, Subra JF, Legendre C, Noel C, Pillebout E, Brouard S, Souillou JP. 2006. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 6:736–746.
- Shannon W, Culverhouse R, Duncan J. 2003. Analyzing microarray data using cluster analysis. *Pharmacogenomics* 4:42–52.
- Sivozhelezov V, Giacomelli L, Tripathi S, Nicolini C. 2006. Gene expression of human T lymphocytes: Predicted gene and protein networks. *J Cell Biochem* 37:1138–1150.
- Souillou JP, Giral M. 2001. Controlling the incidence of infection and malignancy by modifying immunosuppression. *Transplantation* 72:SS89–SS93.
- Strober S, Benike C, Krishnaswamy S, Engleman EG, Grumet FC. 2000. Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: Studies of chimerism and anti-donor reactivity. *Transplantation* 69:1549–1554.
- Tassi CA, Lee TC, Ho IC, Yang UC, Chen CH, Chen JJ. 2005. Multi-class clustering and prediction in the analysis of microarray data. *Math Biosci* 193:79–100.
- Thomson AW, Mazariegos GV, Reyes J, Donnenberg VS, Bentlejewski C, Zahorchak AF, O'Connell PJ, Fung JJ, Jankowska-Gan E, Burlingham WJ, Heeger PS, Zeevi A. 2001. Monitoring the patient off immunosuppression. Conceptual framework for a proposed tolerance assay study in liver transplant recipients. *Transplantation* 72:S13–S22.
- Torgler R, Jakob S, Ontsouka E, Nachbur U, Mueller C, Green DR, Brunner T. 2004. Regulation of activation-induced Fas (CD95/Apo-1) ligand expression in T cells by the cyclin B1/Cdk1 complex. *J Biol Chem* 279:37334–37342.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5116–5121.
- von Mering C, Jensen LJ, Snel B, Hooper SD, Krupp M, Foglierini M, Jouffre N, Huynen MA, Bork P. 2005. STRING: Known and predicted protein–protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res* 33:D433–D437.
- Wang Y, Dai H, Liu Z, Cheng X, Tellides G, Dai Z. 2006. Neutralizing IL-7 promotes long-term allograft survival induced by CD40/CD40L costimulatory blockade. *Am J Transplant* 6:2851–2860.

3.2. Résumé de l'article III

Comme nous l'avons vu précédemment, l'état de tolérance « opérationnelle » semble être régi par des interactions complexes entre les gènes plutôt que par une augmentation ou une diminution massive de l'expression de certains de ces gènes. Dans ce second article, nous avons identifié des gènes *leader* associés au rejet chronique et à la tolérance « opérationnelle » chez des patients transplantés rénaux par l'utilisation d'une approche bioinformatique non-statistique basée sur l'identification des gènes ayant les plus fortes interconnexions entre-eux. L'analyse de ces gènes *leader* a été confrontée avec l'analyse classique SAM de l'article I et aux données cliniques des patients transplantés. Cette analyse a mis en évidence que les réseaux de gènes liés à la tolérance « opérationnelle » ou au rejet chronique semble être étroitement liés et nous a permis d'identifier de nouvelles cibles moléculaires qui pourraient être impliquées dans la tolérance « opérationnelle » et dans le rejet chronique.

3.3. Discussion de l'article III

3.3.1. Méthode d'identification des gènes *leader*

La méthode d'analyse des gènes *leader* développée par Sivozhelezov *et al.* se décompose en trois étapes majeures : 1) l'identification des gènes impliqués dans une pathologie ; 2) la prédiction des interactions possibles entre les gènes identifiés ; 3) l'identification des gènes *leader*, c'est-à-dire des gènes qui ont un maximum d'interactions entre eux (Sivozhelezov, Giacomelli *et al.* 2006).

La première étape (*i.e.* l'identification des gènes) a été réalisée à partir des résultats d'expériences de puces à ADN : les gènes identifiés par les puces pangénomiques (520 gènes), les gènes identifiés par SAM sur les puces dédiées (343 gènes) et les gènes identifiés *ab initio* selon leur niveau d'interaction. L'identification *ab initio* des gènes a été réalisée en trois étapes : 1) l'établissement d'une liste de gènes par des recherches dans les multiples bases de données (*e.g.* HomoloGene¹⁹, MeSH²⁰, EMBL-Bank²¹, RefSeq²², Swiss-Prot²³,

¹⁹ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=homologene>

PIR²⁴, PRF²⁵...), 2) l'extension de cette liste par l'utilisation de réseaux d'interaction protéiques et 3) le croisement de cette liste étendue de gènes avec les données issues de PubMed/Genbank.

La deuxième étape (*i.e.* la prédiction des interactions possibles) consiste à calculer le poids de chaque interaction à l'aide du logiciel STRING²⁶ (von Mering, Jensen *et al.* 2007; von Mering, Jensen *et al.* 2005). Cette valeur correspond à la somme des poids de trois types d'interactions : 1) la co-occurrence du nom du gène ou de la protéine correspondante dans les articles publiés disponibles sur internet ; 2) le score dérivé des bases de données de réseaux de gènes comme KEGG ; et 3) le score assigné aux interactions physiques entre les protéines.

La dernière étape (*e.i.* l'identification des gènes *leader*) consiste à combiner les scores de chaque gène à ceux de leurs voisins et à appliquer des méthodes de classification de ces scores pondérés. Deux méthodes de classifications ont été employées : la classification hiérarchique et la classification des k-moyennes (cf. § 4.5.4.1.).

3.3.2. Détermination des gènes *leader* de la tolérance « opérationnelle » et du rejet chronique

Trois listes de gènes *leader* ont été identifiées dans cet article. À partir des expériences des puces pangénomiques, 86 gènes *leader* ont été mis en évidence. À partir des expériences des puces dédiées, 67 gènes *leader* ont été mis en évidence et 68 gènes *leader* ont été identifiés *ab initio* (Table II de l'article III).

La comparaison entre les gènes *leader* identifiés à partir des 520 gènes et les gènes identifiés par SAM montre très peu de gènes en communs (6/86 : 7%). *A contrario*, la comparaison entre les gènes *leader* identifiés *ab initio* et les gènes identifiés par SAM montre une grande convergence (33/68 : 49%). De plus, la fiabilité des données des expériences des puces pangénomiques est faible par rapport aux résultats issus des expériences des puces dédiées (Figure 3 de l'article III). Ceci montre que la mise en commun des ARNm de patients est moins pertinente que l'étude individuelle de chacun des patients. En effet, des études statistiques ont montrées que le regroupement des ARN induit une perte d'informations

²⁰ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=mesh>

²¹ <http://www.ebi.ac.uk/embl/>

²² <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>

²³ <http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>

²⁴ <http://pir.georgetown.edu/>

²⁵ http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bfind?prf

²⁶ <http://string.embl.de/>

(Mary-Huard, Daudin *et al.* 2007; Zhang, Carriquiry *et al.* 2007). Lors du regroupement des ARN, la distribution des ARN des différents patients peut augmenter la variance du groupe (Kendziorski, Zhang *et al.* 2003). Ainsi, étant donné que nous disposons d'un groupe restreint de patients (huit patients en rejet chronique et six patients « opérationnellement » tolérants), l'ARN de l'un des patients a dû augmenter la variance du groupe expliquant ainsi le manque de fiabilité de ces résultats. Du fait de la faible fiabilité des résultats issus des expériences des puces pangénomiques, l'identification des gènes *leader* s'est faite sur les données de puces à ADN issues de chaque individu.

3.3.3. Identification des réseaux d'interactions

Les soixante-huit gènes *leader* identifiés *ab initio* concordent avec les 343 gènes identifiés par SAM. Ces gènes *leader* ont permis de construire une carte d'interactions protéiques à l'aide du logiciel STRING (Tableau 4) (Figure 5 de l'article III).

Tableau 4 : Listes des protéines correspondantes à la carte des interactions classées selon leur score.

●	CD9	CD9 antigen (p24) (Leukocyte antigen MIC3) (Motility-related protein) (MRP-1) (Tetraspanin-29) (Tspan-29)
●	IL1RAP	Interleukin-1 receptor accessory protein precursor (IL-1 receptor accessory protein) (IL-1RAcP)
●	PTGS2	Prostaglandin G/H synthase 2 precursor (EC 1.14.99.1) (Cyclooxygenase- 2) (COX-2) (Prostaglandin-endoperoxide synthase 2) (Prostaglandin H2 synthase 2) (PGH synthase 2) (PGHS-2) (PHS II)
●	HLA-DQA2	HLA class II histocompatibility antigen, DQ(6) alpha chain precursor (DX alpha chain) (HLA-DQA1)
●	RPS5	40S ribosomal protein S5
●	SIRT1	NAD-dependent deacetylase sirtuin-1 (EC 3.5.1.-) (hSIRT1) (hSIR2) (SIR2-like protein 1)
●	JAK2	Tyrosine-protein kinase JAK2 (EC 2.7.1.112) (Janus kinase 2) (JAK-2)
●	Galectin-1	(Beta-galactoside-binding lectin L-14-I) (Lactose-binding lectin 1) (S-Lac lectin 1) (Galaptin) (14 kDa lectin) (HPL) (HBL) (Putative MAPK-activating protein MP12)
●	CTSG	Cathepsin G precursor (EC 3.4.21.20) (CG)
●	GZMB	Granzyme B precursor (EC 3.4.21.79) (T-cell serine protease 1-3E) (Cytotoxic T-lymphocyte proteinase 2) (Lymphocyte protease) (SECT) (Granzyme-2) (Cathepsin G-like 1) (CTSGL1) (CTLA-1) (Fragmentin-2) (Human lymphocyte protein) (HLP) (C11)
●	PYGL	Glycogen phosphorylase, liver form (EC 2.4.1.1)
●	ATP6V1D	Vacuolar ATP synthase subunit D (EC 3.6.3.14) (V-ATPase D subunit) (Vacuolar proton pump D subunit) (V-ATPase 28 kDa accessory protein)
●	SPTLC2	Serine palmitoyltransferase 2 (EC 2.3.1.50) (Long chain base biosynthesis protein 2) (LCB 2) (Serine-palmitoyl-CoA transferase 2) (SPT 2)
●	MMP9	Matrix metalloproteinase-9 precursor (MMP-9) (EC 3.4.24.35) (92 kDa type IV collagenase) (92 kDa gelatinase) (Gelatinase B) (GELB) [Contains- 67 kDa matrix metalloproteinase-9; 82 kDa matrix metalloproteinase-9]
●	CST3	Cystatin C precursor (Neuroendocrine basic polypeptide) (Gamma-trace) (Post-gamma-globulin)
●	ENSP00000218516	Alpha-galactosidase A precursor (EC 3.2.1.22) (Melibiase) (Alpha-D- galactoside galactohydrolase)
●	KLF5	Kruessel-like factor 5 (Intestinal-enriched kruessel-like factor) (Colon kruessel-like factor) (Transcription factor BTEB2) (Basic transcription element binding protein 2) (BTE-binding protein 2) (GC box binding protein 2)
●	CTSH	Cathepsin H precursor (EC 3.4.22.16) [Contains- Cathepsin H mini chain; Cathepsin H heavy chain; Cathepsin H light chain]
●	PTGDS	Prostaglandin-H2 D-isomerase precursor (EC 5.3.99.2) (Lipocalin-type prostaglandin-D synthase) (Glutathione-independent PGD synthetase) (Prostaglandin D2 synthase) (PGD2 synthase) (PGDS2) (PGDS) (Beta-trace protein) (Cerebrin 28)
●	CCL3	Small inducible cytokine A3 precursor (CCL3) (Macrophage inflammatory protein 1-alpha) (MIP-1-alpha) (Tonsillar lymphocyte LD78 alpha protein) (G0/G1 switch regulatory protein 19-1) (GOS19-1 protein) (SIS-beta) (PAT 464.1) [Contains- MIP-1-alpha(4-69)]
●	LDHA	L-lactate dehydrogenase A chain (EC 1.1.1.27) (LDH-A) (LDH muscle subunit) (LDH-M) (Proliferation-inducing gene 19 protein)
●	IFNG	Interferon gamma precursor (IFN-gamma) (Immune interferon)
●	LTF	Lactotransferrin precursor (Lactoferrin) [Contains- Kaliocin-1; Lactoferrin A; Lactoferrin B; Lactoferrin C]
●	IFIT3	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3 (IFIT-3) (IFIT-4) (Interferon-induced 60 kDa protein) (IFI-60K) (ISG-60) (CIG49) (Retinoic acid-induced gene G protein) (RIG-G)
●	TNFSF10	Tumor necrosis factor ligand superfamily member 10 (TNF-related apoptosis-inducing ligand) (TRAIL protein) (Apo-2 ligand) (Apo-2L)
●	RECK	Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs precursor (hRECK) (Suppressor of tumorigenicity 15) (ST15)

●	NMI	N-myc-interactor (Nmi) (N-myc and STAT interactor)
●	ENSP00000245457	Prostaglandin E2 receptor, EP2 subtype (Prostanoid EP2 receptor) (PGE receptor, EP2 subtype)
●	PIN1	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 (EC 5.2.1.8) (Rotamase Pin1) (PPIase Pin1)
●	SNAP23	Synaptosomal-associated protein 23 (SNAP-23) (Vesicle-membrane fusion protein SNAP-23)
●	RPS4Y1	40S ribosomal protein S4, Y isoform 1
●	RPL36	60S ribosomal protein L36
●	RARA	Retinoic acid receptor alpha (RAR-alpha)
●	LGALS3	Galectin-3 (Galactose-specific lectin 3) (Mac-2 antigen) (IgE-binding protein) (35 kDa lectin) (Carbohydrate binding protein 35) (CBP 35) (Laminin-binding protein) (Lectin L-29) (L-31) (Galactoside-binding protein) (GALBP)
●	KRAS	GTPase KRas (K-Ras 2) (Ki-Ras) (c-K-ras)
●	E2F5	Transcription factor E2F5 (E2F-5)
●	IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase-like 2 (IRAK-2)
●	RAB33A	Ras-related protein Rab-33A (Small GTP-binding protein S10)
●	PDGFRA	Alpha platelet-derived growth factor receptor precursor (EC 2.7.1.112) (PDGF-R-alpha) (CD140a antigen)
●	CTSL	Cathepsin L precursor (EC 3.4.22.15) (Major excreted protein) (MEP) [Contains- Cathepsin L heavy chain; Cathepsin L light chain]
●	DYSF	Dysferlin (Dystrophy associated fer-1-like protein) (Fer-1-like protein 1)
●	BLK	Tyrosine-protein kinase BLK (EC 2.7.1.112) (B lymphocyte kinase) (p55- BLK)
●	TLR2	Toll-like receptor 2 precursor (Toll/interleukin 1 receptor-like protein 4) (CD282 antigen)
●	CASP1	Caspase-1 precursor (EC 3.4.22.36) (CASP-1) (Interleukin-1 beta convertase) (IL-1BC) (IL-1 beta-converting enzyme) (ICE) (Interleukin-1 beta-converting enzyme) (p45) [Contains- Caspase-1 p20 subunit; Caspase-1 p10 subunit]
●	PAK6	Serine/threonine-protein kinase PAK 6 (EC 2.7.1.37) (p21-activated kinase 6) (PAK-6) (PAK-5)
●	ENSP00000260949	Signal transducer and activator of transcription 4
●	IRAK3	Interleukin-1 receptor-associated kinase 3 (EC 2.7.1.-) (IRAK-3) (IL-1 receptor-associated kinase M) (IRAK-M)
●	ANGPT4	Angiotensinogen-4 precursor (ANG-4) (ANG-3)
●	NCOA3	Nuclear receptor coactivator 3 (EC 2.3.1.48) (NCoA-3) (Thyroid hormone receptor activator molecule 1) (TRAM-1) (ACTR) (Receptor-associated coactivator 3) (RAC-3) (Amplified in breast cancer-1 protein) (AIB-1) (Steroid receptor coactivator protein 3) (SRC-
●	IL1A	Interleukin-1 alpha precursor (IL-1 alpha) (Hematopoietin-1)
●	IL1B	Interleukin-1 beta precursor (IL-1 beta) (Catabolin)
●	BIRC3	Baculoviral IAP repeat-containing protein 3 (Inhibitor of apoptosis protein 1) (HIAP1) (HIAP-1) (C-IAP2) (TNFR2-TRAF signaling complex protein 1) (IAP homolog C) (Apoptosis inhibitor 2) (API2)
●	STXBP3	Syntaxin-binding protein 3 (UNC-18 homolog 3) (UNC-18C) (UNC-18-3) (Platelet Sec1 protein) (PSP)
●	MXD1	MAD protein (MAX dimerizer) (MAX dimerization protein 1)
●	CXCL2	Macrophage inflammatory protein 2-alpha precursor (MIP2-alpha) (CXCL2) (Growth regulated protein beta) (Gro-beta) [Contains- GRO-beta(5-73) (GRO-beta-T) (SB-251353) (Hematopoietic synergistic factor) (HSF)]
●	CSPG2	Versican core protein precursor (Large fibroblast proteoglycan) (Chondroitin sulfate proteoglycan core protein 2) (PG-M) (Glial hyaluronate-binding protein) (GHAP)
●	PMAIP1	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (PMA-induced protein 1) (Immediate-early-response protein APR)
●	PIP5K2B	Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase type II beta (EC 2.7.1.68) (PIP5KIIbeta)
●	CD53	Leukocyte surface antigen CD53 (Cell surface glycoprotein CD53) (Tetraspanin-25) (Tspan-25)
●	PTPRC	Leukocyte common antigen precursor (EC 3.1.3.48) (L-CA) (CD45 antigen) (T200)
●	ATP6V1B2	Vacuolar ATP synthase subunit B, brain isoform (EC 3.6.3.14) (V-ATPase B2 subunit) (Vacuolar proton pump B isoform 2) (Endomembrane proton pump 58 kDa subunit) (HO57)
●	UGCG	Ceramide glucosyltransferase (EC 2.4.1.80) (Glucosylceramide synthase) (GCS) (UDP-glucose-N-acylsphingosine D-glucosyltransferase) (UDP-glucose ceramide glucosyltransferase) (GLCT-1)
●	ADD3	Gamma adducin (Adducin-like protein 70)
●	ATM	Serine-protein kinase ATM (EC 2.7.1.37) (Ataxia telangiectasia mutated) (A-T, mutated)
●	FCER1B	High affinity immunoglobulin epsilon receptor beta-subunit (FcERI) (IgE Fc receptor, beta-subunit) (Fc epsilon receptor I beta-chain)
●	PRKCA	Protein kinase C, alpha type (EC 2.7.1.37) (PKC-alpha) (PKC-A)
●	PPP1R3A	Protein phosphatase 1, regulatory subunit 3A (Protein phosphatase 1 glycogen-associated regulatory subunit) (Protein phosphatase type-1 glycogen targeting subunit)
●	LY96	Lymphocyte antigen 96 precursor (MD-2 protein) (ESOP-1)
●	RASA2	Ras GTPase-activating protein 2 (GAP1m) NCF1
●	NCF1	Neutrophil cytosol factor 1 (NCF-1) (Neutrophil NADPH oxidase factor 1) (47 kDa neutrophil oxidase factor) (p47-phox) (NCF-47K) (47 kDa autosomal chronic granulomatous disease protein) (NOXO2)
●	CSTB	Cystatin B (Liver thiol proteinase inhibitor) (CPI-B) (Stefin B)
●	CD3G	T-cell surface glycoprotein CD3 gamma chain precursor (T-cell receptor T3 gamma chain)
●	STAT5B	Signal transducer and activator of transcription 5B
●	FCGR3A	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor III-A precursor (IgG Fc receptor III-2) (Fc-gamma RIII-alpha) (Fc-gamma RIIIa) (FcRIIIa) (Fc-gamma RIII) (FcRIII) (Antigen CD16-A) (FcR-10)
●	PPBP	Platelet basic protein precursor (PBP) (Small inducible cytokine B7) (CXCL7) (Leukocyte-derived growth factor) (LDGF) (Macrophage-derived growth factor) (MDGF) [Contains- Connective-tissue activating peptide III (CTAP-III) (Low-affinity platelet factor IV
●	CXCL1	Growth regulated protein alpha precursor (CXCL1) (Melanoma growth stimulatory activity) (MGSA) (Neutrophil-activating protein 3) (NAP-3) (GRO-alpha(1-73)) [Contains- GRO-alpha(4-73); GRO-alpha(5-73); GRO- alpha(6-73)]
●	CAMP	Antibacterial protein FALL-39 precursor (FALL-39 peptide antibiotic) (Cationic antimicrobial protein CAP-18) (hCAP-18) (HSD26) [Contains- Antibacterial protein LL-37]
●	SAP30	Histone deacetylase complex subunit SAP30 (Sin3-associated polypeptide, 30 kDa) (Sin3 corepressor complex subunit SAP30)
●	CCR6	C-C chemokine receptor type 6 (C-C CKR-6) (CC-CKR-6) (CCR-6) (LARC receptor) (GPR-CY4) (GPRCY4) (Chemokine receptor-like 3) (CKR-L3) (DRY6)
●	ILK	Integrin-linked protein kinase 1 (EC 2.7.1.37) (ILK-1) (59 kDa serine/threonine-protein kinase) (p59ILK)

●	AGXT	Serine--pyruvate aminotransferase (EC 2.6.1.51) (SPT) (Alanine-- glyoxylate aminotransferase) (EC 2.6.1.44) (AGT)
●	ITGB2	Integrin beta-2 precursor (Cell surface adhesion glycoproteins LFA- 1/CR3/p150,95 beta-subunit) (CD18) (Complement receptor C3 beta- subunit)
●	SERPINB9	Cytoplasmic antiproteinase 3 (CAP3) (CAP-3) (Protease inhibitor 9) (Serpine B9)
●	CD14	Monocyte differentiation antigen CD14 precursor (Myeloid cell-specific leucine-rich glycoprotein) [Contains- Monocyte differentiation antigen CD14, urinary form; Monocyte differentiation antigen CD14, membrane- bound form]
●	PTEN	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase PTEN (EC 3.1.3.67) (Mutated in multiple advanced cancers 1)
●	IL7R	Interleukin-7 receptor alpha chain precursor (IL-7R-alpha) (CDw127) (CD127 antigen)
●	FCGR1A	High affinity immunoglobulin gamma Fc receptor I precursor (Fc-gamma RI) (FcRI) (IgG Fc receptor I) (CD64 antigen)
●	AGL	Glycogen debranching enzyme (Glycogen debrancher) [Includes- 4-alpha- glucanotransferase (EC 2.4.1.25) (Oligo-1,4-1,4-glycantransferase); Amylo-alpha-1,6-glucosidase (EC 3.2.1.33) (Amylo-1,6-glucosidase) (Dextrin 6-alpha-D-glucosidase)]
●	CD7	T-cell antigen CD7 precursor (GP40) (T-cell leukemia antigen) (TP41) (Leu-9)
●	PHKB	Phosphorylase b kinase beta regulatory chain (Phosphorylase kinase beta subunit)
●	MAP4K4	Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 4 (EC 2.7.1.37) (MAPK/ERK kinase kinase kinase 4) (MEK kinase kinase 4) (MEKKK 4) (HPK/GCK-like kinase HGK) (Nck interacting kinase)
●	FCER1A	High affinity immunoglobulin epsilon receptor alpha-subunit precursor (FcERI) (IgE Fc receptor, alpha-subunit) (Fc-epsilon RI-alpha)
●	MGAM	Maltase-glucoamylase, intestinal [Includes- Maltase (EC 3.2.1.20) (Alpha-glucosidase); Glucoamylase (EC 3.2.1.3) (Glucan 1,4-alpha- glucosidase)]
●	IGHE	Ig epsilon chain C region
●	BKS	Signal-transducing adaptor protein 2 (STAP-2) (Breast tumor kinase substrate) (BRK substrate)
●	AKR1C3	Aldo-keto reductase family 1 member C3 (EC 1.-.-.) (Trans-1,2- dihydrobenzene-1,2-diol dehydrogenase) (EC 1.3.1.20) (3-alpha- hydroxysteroid dehydrogenase type 2) (EC 1.1.1.213) (3-alpha-HSD type 2) (3-alpha-HSD type II, brain) (Prostaglandin F synthase)
●	PTPRCAP	Protein tyrosine phosphatase receptor type C-associated protein (PTPRC-associated protein) (CD45-associated protein) (CD45-AP) (Lymphocyte phosphatase-associated phosphoprotein)
●	H4/G	Histone H4
●	IFIT1	Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1 (IFIT-1) (Interferon-induced 56 kDa protein) (IFI-56K)
●	IL1R2	Interleukin-1 receptor type II precursor (IL-1R-2) (IL-1R-beta) (Antigen CD121b) (Antigen CDw121b)
●	RARG	Retinoic acid receptor gamma-2 (RAR-gamma-2)
●	ASAHI	Acid ceramidase precursor (EC 3.5.1.23) (Acylsphingosine deacylase) (N-acylsphingosine amidohydrolase) (AC) (Putative 32 kDa heart protein) (PHP32) [Contains- Acid ceramidase alpha subunit; Acid ceramidase beta subunit]
●	RTN4	Reticulon-4 (Neurite outgrowth inhibitor) (Nogo protein) (Foocen) (Neuroendocrine-specific protein) (NSP) (Neuroendocrine specific protein C homolog) (RTN-x) (Reticulon 5)
●	TBXAS1	Thromboxane-A synthase (EC 5.3.99.5) (TXA synthase) (TXS)
●	VNN2	Vascular non-inflammatory molecule 2 precursor (Vanin-2) (Glycosylphosphatidyl inositol-anchored protein GPI-80) (FOAP-4 protein)
●	CDC2L2	PITSLRE serine/threonine-protein kinase CDC2L2 (EC 2.7.1.37) (Galactosyltransferase-associated protein kinase p58/GTA) (Cell division cycle 2-like protein kinase 2) (CDK11)
●	HLA-DQA1	HLA class II histocompatibility antigen, DQ(5) alpha chain precursor (DC-1 alpha chain)
●	TIF1	Transcription intermediary factor 1-alpha (TIF1-alpha) (Tripartite motif protein 24) (RING finger protein 82)
●	SLPI	Antileukoproteinase 1 precursor (ALP) (HUSI-1) (Seminal proteinase inhibitor) (Secretory leukocyte protease inhibitor) (BLPI) (Mucus proteinase inhibitor) (MPI) (WAP four-disulfide core domain protein 4) (Protease inhibitor WAP4)
●	SERPINH1	Collagen-binding protein 2 precursor (Colligin 2) (Rheumatoid arthritis related antigen RA-A47) (Serpine H2)
●	RTN3	Reticulon-3 (Neuroendocrine-specific protein-like 2) (NSP-like protein II) (NSPLII)
●	ANXA2	Annexin A2 (Annexin II) (Lipocortin II) (Calpactin I heavy chain) (Chromobindin-8) (p36) (Protein I) (Placental anticoagulant protein IV) (PAP-IV)
●	TEK	Angiopoietin 1 receptor precursor (EC 2.7.1.112) (Tyrosine-protein kinase receptor TIE-2) (Tyrosine-protein kinase receptor TEK) (P140 TEK) (Tunica interna endothelial cell kinase) (CD202b antigen)
●	CAST	Calpastatin (Calpain inhibitor) (Sperm BS-17 component)
●	CSF2RA	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor alpha chain precursor (GM-CSF-R-alpha) (GMR) (CDw116) (CD116 antigen)
●	S100A10	Calpactin I light chain (S100 calcium-binding protein A10) (p10 protein) (p11) (Cellular ligand of annexin II)
●	CASP8	Caspase-8 precursor (EC 3.4.22.-) (CASP-8) (ICE-like apoptotic protease 5) (MORT1-associated CED-3 homolog) (MACH) (FADD-homologous ICE/CED-3-like protease) (FADD-like ICE) (FLICE) (Apoptotic cysteine protease) (Apoptotic protease Mch-5) (CAP4)
●	FCGR2B	Low affinity immunoglobulin gamma Fc region receptor II-b precursor (Fc-gamma RII-b) (FcRII-b) (IgG Fc receptor II-b) (Fc-gamma-RIIb) (CD32 antigen) (CDw32)
●	CCL20	Small inducible cytokine A20 precursor (CCL20) (Macrophage inflammatory protein 3 alpha) (MIP-3-alpha) (Liver and activation- regulated chemokine) (CC chemokine LARC) (Beta chemokine exodus-1) [Contains- CCL20(1-67); CCL20(1-64); CCL20(2-70)]
●	ENO1	Alpha enolase (EC 4.2.1.11) (2-phospho-D-glycerate hydro-lyase) (Non- neural enolase) (NNE) (Enolase 1) (Phosphopyruvate hydratase) (C-myc promoter-binding protein) (MBP-1) (MPB-1) (Plasminogen-binding protein)
●	RXRG	Retinoic acid receptor RXR-gamma (Retinoid X receptor gamma)
●	CCL4	Small inducible cytokine A4 precursor (CCL4) (Macrophage inflammatory protein 1-beta) (MIP-1-beta) (MIP-1-beta(1-69)) (T-cell activation protein 2) (ACT-2) (PAT 744) (H400) (SIS-gamma) (Lymphocyte activation gene 1 protein) (LAG-1) (HC21)
●	CARD12	Caspase recruitment domain protein 12 (Ice-protease activating factor) (IpaF) (CARD, LRR, and NACHT-containing protein) (Clan protein)
●	TLR10	Toll-like receptor 10 precursor
●	GYG2	Glycogenin-2 (EC 2.4.1.186) (GN-2) (GN2)
●	F5	Coagulation factor V precursor (Activated protein C cofactor) [Contains- Coagulation factor V heavy chain; Coagulation factor V light chain]
●	TLR1	Toll-like receptor 1 precursor (Toll/interleukin-1 receptor-like protein) (TIL) (CD281 antigen)

Sur cette carte d'interaction, il existe deux principaux réseaux : l'un est composé de protéines liées à l'interleukine 1 (Figure 17) et l'autre correspond à un réseau de transduction du signal (Figure 18). Il a été rapporté dans la littérature que le transfert du gène codant pour

la forme soluble du récepteur de type 2 de l'interleukine 1 (IL1R2) en complément du traitement sous ciclosporine chez des rats LEW ayant reçu une allogreffe cardiaque d'un rat F344 prolonge la survie du greffon. De plus, le transfert du gène de l'IL1R2 diminue significativement l'infiltrat de lymphocytes T CD4⁺ et des monocytes/macrophages et induit aussi une diminution de l'expression du TNF- α et du TGF- β (Simeoni, Dudler *et al.* 2007). Chez l'Homme, l'étude du polymorphisme des gènes du récepteur α de l'interleukine 1 (IL1RA) et de l'IL-1 β (IL1B), chez 136 patients ayant une allogreffe rénale par rapport à 150 individus sains, révèle que la faible production d'IL1RA est un facteur de risque d'épisodes de rejet aigu et de rejet chronique ainsi que la reprise tardive de la fonction rénale. De plus, la forte production d'IL1B combinée à la faible production d'IL1RA semble être un facteur de risque du rejet du greffon (Manchanda, Bid *et al.* 2006). Les données issues de la littérature indiquent que ce réseau de protéines liées à l'IL-1 semble jouer un rôle important dans la survie du greffon à long terme.

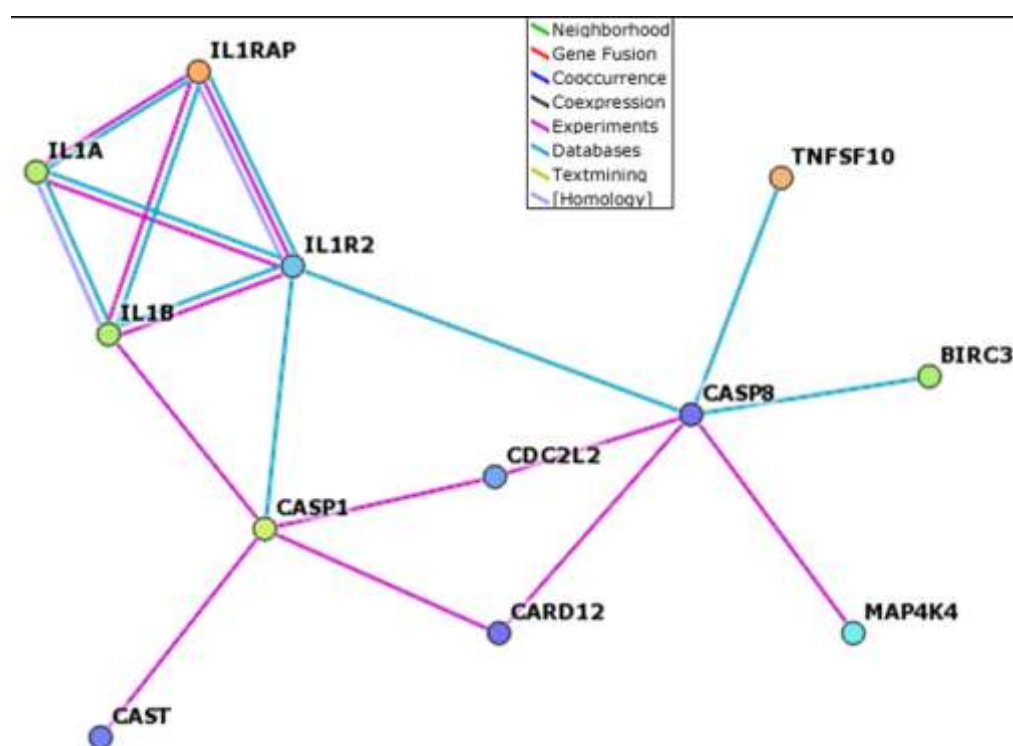


Figure 17 : Réseau d'interleukines identifié par les interactions entre les gènes *leader*.

Un deuxième réseau important a été identifié à partir de la carte d'interaction (Figure 5 de l'article III). Ce réseau est principalement composé de kinases (BLK, ILK, JAK2, PDGFRA, PRKCA, TEK), de récepteurs (CSF2RA, FCGR1A, FCGR2B, FCGR3A, IL7R, NCOA3, PTPRC, RARA, RARG, RXRG, TLR1, TLR10, TLR2) et de protéines impliquées

dans la transduction du signal (ANGPT4, CD14, CD3G, CD7, CST3, CTSH, CTSL, IFNG, ITGB2, LTF, LY96, PTPRC, SERPINH1, SLPI, VNN2) (Figure 18). Ce réseau constitue le point de départ de nouvelles analyses afin de caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans le rejet chronique et dans la tolérance « opérationnelle ».

La comparaison de ces résultats avec l'enrichissement des familles de gènes de l'analyse non supervisée de l'article I (Tableau 2) montre que les gènes impliqués dans les processus de tolérance « opérationnelle » et de rejet chronique codent pour les kinases et des protéines impliquées dans la transduction du signal.

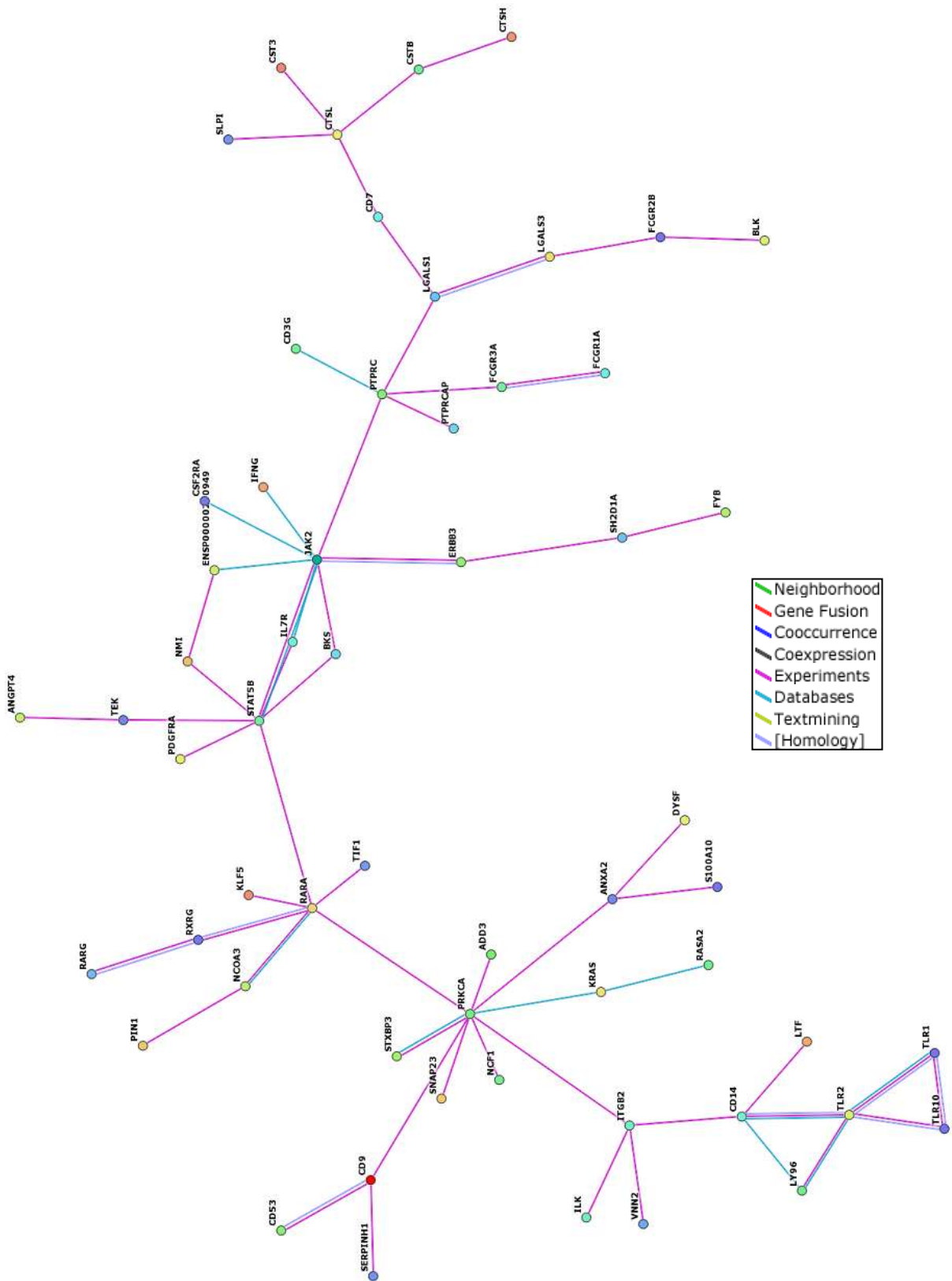


Figure 18 : Réseau de transduction du signal identifié par les interactions entre les gènes leader.

Les gènes *leader* de la tolérance ou du rejet chronique tendent à former des sous-groupes distincts parmi le réseau (Figure 19). Ces sous-groupes indiquent que les gènes sont augmentés ou diminués de façon simultanée dans le rejet chronique ou dans la tolérance « opérationnelle ». Cependant, certains gènes présentent des profils contraires. C'est le cas du gène IL7R (récepteur de l'interleukine 7) identifié comme gène *leader* de la tolérance « opérationnelle » qui se trouve au centre d'un nœud de gènes *leader* du rejet chronique. Plusieurs études rapportent que l'absence d'expression du marqueur CD127 (chaîne α du récepteur de l'IL-7) est caractéristique des cellules T régulatrices CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ chez la souris et le primate (Hartigan-O'Connor, Poon *et al.* 2007) ainsi que chez l'Homme (Seddiki, Santner-Nanan *et al.* 2006). Il semble donc que l'IL7R soit une molécule d'intérêt majeur de la tolérance en transplantation.

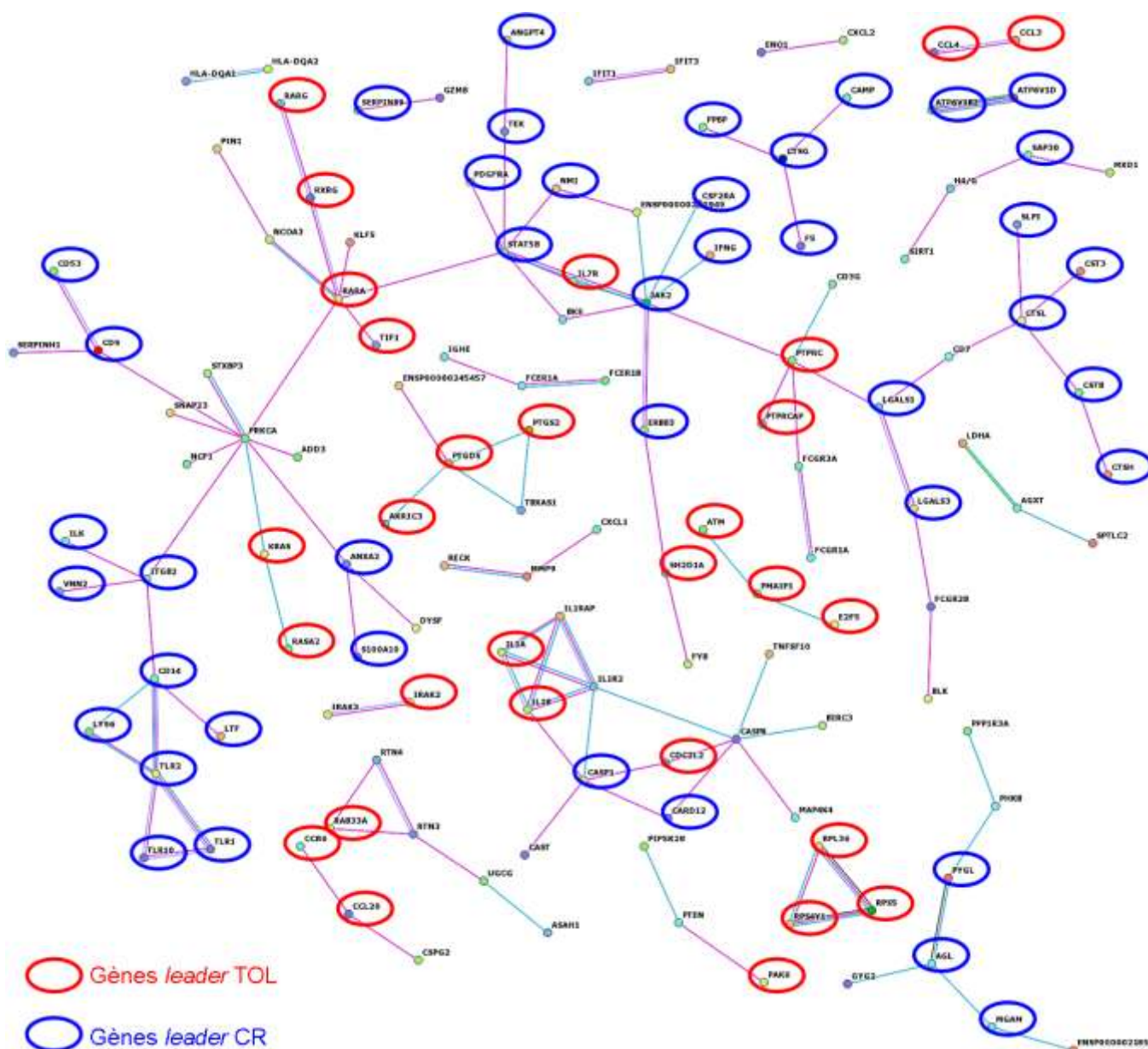


Figure 19 : Carte d'interaction

Sur la carte d'interactions, l'IL7R est lié directement à STAT5 (*Signal transducers and activators of transcription 5*). STAT5 a été identifié comme gène leader du rejet chronique. L'IL7R via la présence de motifs tyrosines phosphorylées permet l'activation de STAT5 dans les PBMC humains (Lin, Migone *et al.* 1995). Les protéines STAT sont impliquées dans l'immunorégulation et le développement des cellules immunitaires (O'Shea, Gadina *et al.* 2002; Shuai and Liu 2003). Yao *et al.* ont montré que des souris déficientes pour les gènes STAT5A/B présentent une forte réduction des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁻ et CD4⁺ Foxp3⁺. De plus, les protéines STAT5A/B sont nécessaires à l'induction de l'expression de Foxp3 *in vitro* et se fixent directement sur le gène codant pour la protéine Foxp3 (Yao, Kanno

et al. 2007). Le développement des cellules régulatrices Foxp3⁺ *via* l'activation de STAT5 est dépendante de la transduction du signal du récepteur de l'interleukine-2 chez la souris (Burchill, Yang *et al.* 2007). Snow *et al.* ont montré l'importance des signaux de transduction du signal liées à STAT5 dans le développement des cellules régulatrices CD4⁺ CD25⁺ impliquées dans les mécanismes de tolérance en transplantation chez la souris (Snow, Abraham *et al.* 2003). Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus au laboratoire. En effet, Louis *et al.* ont montré un défaut du nombre de cellules régulatrices CD4⁺ CD25⁺ chez les patients en rejet chronique par rapport aux patients « opérationnellement » tolérants et par rapport aux individus sains (Louis, Braudeau *et al.* 2006). La réduction du nombre de ces cellules chez les patients en rejet chronique pourrait être due à une diminution de l'expression du gène STAT5.

Le gène codant pour la protéine RARA (*Retinoic acid receptor alpha*) a été identifié comme gène *leader* de la tolérance « opérationnelle » et semble être un gène important du réseau de la Figure 18. Seino *et al.* ont étudié l'effet d'un agoniste du récepteur de l'acide rétinoïque α (RARA) dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez le rat. Leur agoniste (ER-38925) inhibe de façon significative l'alloréactivité spécifique des lymphocytes T cytotoxiques dans un modèle murin de réaction du greffon contre l'hôte et permet une prolongation de la survie des greffons cardiaques sans aucun signe histologique de rejet chronique à cent jours. De plus, cet agoniste ne semble pas présenter d'effet toxique : aucune perte de poids ni d'altération dans les formules sanguines des animaux traités à fortes doses (Seino, Yamauchi *et al.* 2004). Les auteurs concluent que les agonistes de RARA pourraient être utilisés comme immunosuppresseurs en transplantation chez l'Homme.

3.4. Conclusion des Articles II et III

Ces études montrent une bonne convergence entre l'analyse statistique classique (SAM) et l'analyse bioinformatique non-statistique. La carte d'interactions des gènes *leader* a permis d'identifier de nouvelles cibles moléculaires impliquées dans la tolérance « opérationnelle » (*e.g.* le réseau de l'IL-1, l'IL7R, STAT5, RARA...). Les analyses transcriptionnelles sont de bons outils pour découvrir de nouveaux biomarqueurs mais l'utilisation des analyses protéomiques permet de mieux comprendre les mécanismes

moléculaires d'un état biologique (LaBaer 2005). Ainsi, la combinaison des analyses statistiques et des analyses par interactions protéiques nous ont permis d'identifier des molécules potentiellement impliquées dans la tolérance « opérationnelle » et dans le rejet chronique.

Conclusion et perspectives

1. Conclusions

Plusieurs études ont prouvé l'efficacité de l'utilisation des puces à ADN comme outils diagnostique en transplantation dans le sang périphérique (Deng, Eisen *et al.* 2006; Flechner, Kurian *et al.* 2004; Horwitz, Tsai *et al.* 2004; Martinez-Llordella, Puig-Pey *et al.* 2007). Nous avons donc employé les puces à ADN afin de déterminer une signature transcriptionnelle de la tolérance « opérationnelle » dans le sang périphérique de ces patients.

Nous avons ainsi identifié une liste de quarante-neuf gènes permettant de discriminer les patients « opérationnellement » tolérants des patients en rejet chronique et des individus sains (cf. article I). Cette liste de gènes a été testée par PCR en temps réel sur des patients tolérants et des patients en rejet chronique indépendants permettant de prédire correctement ces nouveaux patients. L'intérêt d'une telle signature est de tester si des patients sous traitement immunosuppresseur avec une fonction rénale stable partageraient la signature de la tolérance « opérationnelle ». En effet, il n'existe pas actuellement de protocole de diminution et/ou de sevrage des immunosuppresseurs chez les patients adultes ayant reçu une allogreffe rénale. Ainsi, cinq patients sur dix sous stéroïdes en monothérapie et un patient sous trithérapie sur douze testés présentent un profil similaire à celui des patients « opérationnellement » tolérant avec une sensibilité supérieure à 90%. Ce même patient sous trithérapie a été testé par PCR en temps réel et présente aussi la signature de la tolérance « opérationnelle ». L'un des patients tolérants présente un profil d'expression plus proche des patients en rejet chronique en utilisant les puces à ADN et la PCR en temps réel. Au moment du prélèvement sanguin, ce patient présentait les critères cliniques de la tolérance. Néanmoins, six mois plus tard, il présentait des signes de dysfonction du greffon (créatinémie : 165 μ mol/l ; protéinurie : 1g/j). La biopsie a révélé des signes de rejet chronique avec la présence d'anticorps anti-donneur. Ceci montre que cette signature de quarante-neuf gènes possède une valeur diagnostique et pronostique de la tolérance « opérationnelle » chez l'Homme.

Parmi les gènes exprimés sur la puce à ADN, un groupe de gène suggère une diminution de l'activation immunitaire chez les patients tolérants. Ceci est cohérent avec nos résultats antérieurs montrant une diminution de la réponse en cytokines Th1 et Th2 (Brouard, Dupont *et al.* 2005) et une diminution des molécules associées à la cytotoxicité exprimées par

les lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ des patients « opérationnellement » tolérants (Baeten, Louis *et al.* 2006).

Le rôle du TGF- β a été rapporté dans la tolérance chez l'Homme et chez l'animal (Gagne, Brouard *et al.* 2001; Josien, Douillard *et al.* 1998). De plus, Les cellules régulatrices de thype T_H3 secrètent de fortes quantités de TGF- β (Belkaid, Piccirillo *et al.* 2002). Cependant, l'augmentation de l'expression du TGF- β 1 semble être un prédicteur de la dysfonction chronique du transplant chez l'Homme (Harris, Coupes *et al.* 2007; Pribylova-Hribova, Kotsch *et al.* 2006). Dans l'article I, nous n'avons pas retrouvé de différence significative de l'expression du TGF- β entre les patients « opérationnellement » tolérants et les patients en rejet chronique. Cependant, parmi les quarante-neuf gènes composants la signature transcriptionnelle de la tolérance, neuf gènes sont régulés par le TGF- β (\approx 20%). Ceci montre donc que le TGF- β jouerait un rôle de régulation sur d'autres gènes impliqués dans la tolérance « opérationnelle ».

Nous avons par la suite effectué de nouvelles expérimentations complémentaires sur une autre technologie de puces à ADN. Le but de cette nouvelle étude est d'identifier de nouvelles cibles moléculaires impliquées dans la tolérance « opérationnelle ». Pour ce faire, nous avons combiné les analyses statistiques classiques (SAM) à des analyses non-statistiques (réseaux d'interactions). A partir de la liste de 343 gènes identifiée par le logiciel SAM, un test de classification hiérarchique non-supervisée a été réalisé. Les données issues de ce test montrent une assez bonne discrimination des patients. Cependant, deux patients en rejet chronique ainsi que deux patients tolérants sont mal classés. Le patient TOL06 a développé un rejet chronique prouvé par une biopsie six mois après le prélèvement (patient TT12 de l'article I). Ainsi, cette liste de gènes a identifié ce patient comme rejet chronique six mois avant l'apparition des signes cliniques de rejet chronique. Cependant, aucune conclusion n'est possible concernant les autres patients mal classés.

À partir de cette liste de 343 gènes discriminants, nous avons recherché les gènes clefs associés à la tolérance « opérationnelle » et au rejet chronique. Pour ce faire, une approche bioinformatique non-statistique basée sur l'identification de gènes possédant de fortes interactions entre eux plutôt que sur l'expression différentielle des gènes a été menée (Sivozhelezov, Giacomelli *et al.* 2006). Nous avons identifié une liste de soixante-huit gènes *leader* concordante avec la liste de gènes identifiés par SAM. En effet, 49% des gènes *leader* appartiennent à la liste de gènes identifiés par SAM. Une carte d'interaction des protéines

correspondantes de ces gènes *leader* a été construite montrant que les gènes liés à la tolérance « opérationnelle » ou au rejet chronique tendent à former des sous-groupes distincts. Notre objectif est maintenant d'en étudier plus précisément ces nouvelles cibles identifiées.

2. Perspectives

2.1. Etudes de nouvelles cibles moléculaires impliquées dans la tolérance « opérationnelle »

Certains gènes font l'objet d'études plus précises au laboratoire. C'est le cas du gène BANK1 (*B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1*) et du gène codant pour la protéine SMILE.

Le gène codant pour la protéine BANK1 est retrouvé différemment exprimé entre les patients « opérationnellement » tolérants et les patients en rejet chronique par les puces à ADN (Article II) (Tableau 6 – Annexe I). Ainsi, nous avons mesuré l'expression du gène BANK1 dans les PBMC de onze patients en rejet chronique, huit patients « opérationnellement » tolérants, sept patients avec une fonction rénale stable et quinze individus sains par PCR en temps réel. L'expression de ce gène est significativement augmentée chez les patients « opérationnellement » tolérants par rapport aux patients en rejet chronique ($p < 0,01$). Les patients avec une fonction rénale stable et les individus sains ont un niveau d'expression de BANK1 équivalent à celui des patients en rejet chronique. Cette observation concorde avec les données des puces à ADN. De plus, nous avons initié au laboratoire une étude phénotypique des sous-populations lymphocytaires B chez les patients « opérationnellement » tolérants et chez les patients en rejet chronique. Nous avons observé une diminution du nombre de lymphocytes B mémoire (CD27) ainsi qu'une diminution du ratio CD32 α /CD32 β dans les PBMC des patients « opérationnellement » tolérants par rapport aux patients en rejet chronique (CD32 α codant pour un récepteur inhibiteur et CD32 β un récepteur activateur Fc- γ (van Mirre, Breunis *et al.* 2006)). Veri *et al.* ont montré qu'un anticorps monoclonal spécifique du CD32 β induit une diminution de la production de médiateurs inflammatoires dans un modèle d'allergie *in vitro* ainsi qu'une diminution de la prolifération des lymphocytes B humains (Veri, Gorlatov *et al.* 2007).

Le gène codant pour la protéine SMILE est l'un des quarante-neuf gènes de la signature de la tolérance « opérationnelle » (Article I). Ainsi, nous avons mesuré l'expression du gène SMILE dans les PBMC de seize patients en rejet chronique, neuf patients « opérationnellement » tolérants, dix-huit patients avec une fonction rénale stable et quinze individus sains par PCR en temps réel. L'expression de ce gène est significativement augmentée chez les patients « opérationnellement » tolérants par rapport aux patients en rejet chronique et par rapport aux patients avec une fonction rénale stable ($p < 0,01$). Des résultats similaires ont été observés au laboratoire dans des modèles animaux de transplantation rénale. Les rats Lewis 1A ayant reçu un rein d'un rat Lewis 1W expriment plus SMILE que les rats Lewis 1A ayant reçu un rein d'un rat Lewis 1A. De plus, nous avons mesuré au laboratoire l'expression du gène SMILE dans différents compartiments. Il se trouve que SMILE est fortement exprimé dans le placenta. D'autres molécules fortement exprimées dans le placenta semblent être impliquées dans la tolérance immunitaire comme par exemple HLA-G (LeMaout, Rouas-Freiss *et al.* 2005) ou LIF (*leukaemia inhibitory factor*) (Muthukumarana, Lyons *et al.* 2006).

2.2. Recherche de la signature de la tolérance « opérationnelle » chez des patients greffés rénaux avec une fonction stable

Afin de tester la signature des quarante-neuf gènes spécifiques de la tolérance « opérationnelle » (Article I), 239 patients présentant une fonction rénale stable de leur greffon depuis plus de cinq ans ont été inclus dans le cadre d'un Programme Hospitalier de Recherche Clinique (PHRC) au CHU de Nantes en collaboration avec l'hôpital Necker à Paris. L'expression des gènes de la signature de la tolérance « opérationnelle » va être mesurée sur les PBMC de ces patients par PCR en temps réel. Ce travail est en cours de réalisation en collaboration avec la société TcLand S.A.²⁷. Cette étude fait partie des projets labellisés GenHomme²⁸.

²⁷ <http://www.tcland-biotech.com/>

²⁸ <http://genhomme.tektonika2.com/genhomme.php>

2.3. Recherche d'une signature du rejet chronique

Au cours de mon travail de thèse, je me suis aussi intéressé à rechercher une liste de gènes permettant de discriminer les patients en rejet chronique des patients avec une fonction rénale stable. Le but est d'identifier les patients avec une fonction rénale parfaitement stable avant les premiers signes fonctionnels (créatinémie, protéinurie) du développement d'un rejet chronique. L'objectif de cette étude est de pouvoir fournir un outil permettant d'orienter le médecin sur le traitement immunosuppresseur d'un patient et de déterminer la nécessité ou non d'effectuer une biopsie.

Parmi les 239 patients inclus dans l'étude, cinquante-deux patients ont été exclus (manque du deuxième prélèvement, non-compliance, dégradation entre les deux prélèvements, cancers...). Parmi les 187 patients présentant une fonction rénale stable, vingt-trois présentent une dégradation de leur fonction rénale depuis l'inclusion (Tableau 5).

Tableau 5 : Données cliniques des patients présentant une fonction rénale stable à l'inclusion.

	Créatinémie ($\mu\text{mol/l}$)	Protéinurie (g/j)	Urée (mmol/L)	Clairance Nankivell (ml/min)	Age receveur (années)	Age du donneur (années)	Ac anti- classe 1	Ac anti- classe 2
Fonction rénale stable (n=164)	112.89 \pm 136.36	0.15 \pm 0.32	9.06 \pm 11.47	64.66 \pm 57.04	52.13 \pm 55.27	33.9 \pm 42	7	9
Dégradation de la fonction rénale depuis l'inclusion (n=23)	29.12 \pm 33.21	0.11 \pm 0.22	3.27 \pm 2.65	18.92 \pm 8.57	14.9 \pm 12.56	14.42 \pm 13.22	1	4

Nous avons effectué deux amplifications linéaires indépendantes des ARN de chacun des 239 patients. Les ARN amplifiés ont été hybridés sur deux lames différentes (une par amplification). De plus, chacun des gènes est déposé en trois endroits différents sur la puce. Nous obtenons ainsi six points de mesure par gène et par patient.

Afin de sélectionner les gènes qui discriminent les patients avec une fonction rénale stable des patients en rejet chronique, nous avons sélectionné uniquement les 69 patients avec une fonction rénale stable en l'absence d'anticorps anti-classe I et/ou classe II. En effet, il a été montré que la présence d'anticorps anti-HLA participerait à l'établissement du rejet chronique (Davenport, Younie *et al.* 1994; Piazza, Poggi *et al.* 2001; Worthington, Martin *et al.* 2003, Hourmant, 2005 #41). Nous avons ainsi constitué un groupe de patients

d'entraînement et un groupe de patients tests dans le but de valider la prédictivité de la liste de gènes discriminants.

Deux analyses parallèles sont actuellement menées sur ces résultats : une analyse s'appuyant sur les logiciels classiques utilisés dans les études de puces à ADN (SAM, SAMROC, PAM, PLS²⁹ (*Partial Least Square*)...) et une analyse fonctionnelle par groupement de gènes (*clustering*). Nous souhaitons déterminer à la fois les gènes les plus discriminants entre les deux groupes de patients ainsi que d'en étudier la fonction biologique et de pouvoir mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le devenir à long terme du greffon. Grâce à cette étude, nous espérons être en mesure de donner une indication de la nécessité de pratiquer ou non une biopsie chez des patients présentant un profil transcriptionnel du rejet chronique et de pouvoir orienter le traitement immunosuppresseur d'un patient ayant reçu une greffe avec une fonction rénale stable en fonction de son profil d'expressions géniques.

²⁹ <http://cran.r-project.org/src/contrib/Descriptions/pls.html>

Bibliographie

- Afzali B., Taylor A.L. & Goldsmith D.J. What we CAN do about chronic allograft nephropathy: role of immunosuppressive modulations. (2005) *Kidney Int* **68**(6): 2429-43.
- Al-Shahrour F., Diaz-Uriarte R. & Dopazo J. FatiGO: a web tool for finding significant associations of Gene Ontology terms with groups of genes. (2004) *Bioinformatics* **20**(4): 578-80.
- Alon U., Barkai N., Notterman D.A., Gish K., Ybarra S., Mack D. & Levine A.J. Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6745-50.
- Alvarez C.M., Opelz G., Giraldo M.C., Pelzl S., Renner F., Weimer R., Schmidt J., Arbelaez M., Garcia L.F. & Susal C. Evaluation of T-cell receptor repertoires in patients with long-term renal allograft survival. (2005) *Am J Transplant* **5**(4 Pt 1): 746-56.
- Ansari M.J. & Sayegh M.H. Clinical transplantation tolerance: the promise and challenges. (2004) *Kidney Int* **65**(5): 1560-3.
- Ashton-Chess J., Brouard S. & Soulillou J.P. Is clinical tolerance realistic in the next decade? (2006) *Transpl Int* **19**(7): 539-48.
- Ashton-Chess J., Soulillou J.P. & Brouard S. The use of biomarkers in clinical transplant tolerance. (2007) *Trends in Transplantation* **1**(2): 46-55.
- Auchincloss H., Jr., Lee R., Shea S., Markowitz J.S., Grusby M.J. & Glimcher L.H. The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(8): 3373-7.
- Baeten D., Louis S., Braud C., Braudeau C., Ballet C., Moizant F., Pallier A., Giral M., Brouard S. & Soulillou J.P. Phenotypically and functionally distinct CD8+ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients. (2006) *J Am Soc Nephrol* **17**(1): 294-304.
- Baldwin W.M., 3rd, Larsen C.P. & Fairchild R.L. Innate immune responses to transplants: a significant variable with cadaver donors. (2001) *Immunity* **14**(4): 369-76.
- Baldwin W.M., 3rd, Pruitt S.K., Brauer R.B., Daha M.R. & Sanfilippo F. Complement in organ transplantation. Contributions to inflammation, injury, and rejection. (1995) *Transplantation* **59**(6): 797-808.
- Ballet C., Giral M., Ashton-Chess J., Renaudin C., Brouard S. & Soulillou J.P. Chronic rejection of human kidney allografts. (2006) *Expert Review of Clinical Immunology* **2**(3): 393-402.
- Ballet C., Roussey-Kesler G., Aubin J.T., Brouard S., Giral M., Miqueu P., Louis S., van der Werf S. & Soulillou J.P. Humoral and cellular responses to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft. (2006) *Am J Transplant* **6**(11): 2796-801.
- Banasik M. & Klinger M. Chronic allograft nephropathy--immunologic and nonimmunologic factors. (2006) *Ann Transplant* **11**(1): 7-10.
- Belkaid Y., Piccirillo C.A., Mendez S., Shevach E.M. & Sacks D.L. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania* major persistence and immunity. (2002) *Nature* **420**(6915): 502-7.
- Bellis M. & Casellas P. La puce à ADN: un multi-réacteur de paillasse. (1997) *Médecine/Sciences* **13**:1317-1324.
- Benjamini Y. & Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. (1995) *J R Statist Soc B* **57**(1): 289-300.

- Bennett L., Palucka A.K., Arce E., Cantrell V., Borvak J., Banchereau J. & Pascual V. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. (2003) *J Exp Med* **197**(6): 711-23.
- Billingham R.E., Brent L. & Medawar P.B. Actively acquired tolerance of foreign cells. (1953) *Nature* **172**(4379): 603-6.
- BiomarkersDefinitionsWorkingGroup. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. (2001) *Clin Pharmacol Ther* **69**(3): 89-95.
- Black M.A. & Doerge R.W. Calculation of the minimum number of replicate spots required for detection of significant gene expression fold change in microarray experiments. (2002) *Bioinformatics* **18**(12): 1609-16.
- Bland J.M. & Altman D.G. Multiple significance tests: the Bonferroni method. (1995) *Bmj* **310**(6973): 170.
- Brazma A., Hingamp P., Quackenbush J., Sherlock G., Spellman P., Stoeckert C., Aach J., Ansorge W., Ball C.A., Causton H.C., Gaasterland T., Glenisson P., Holstege F.C., Kim I.F., Markowitz V., Matese J.C., Parkinson H., Robinson A., Sarkans U., Schulze-Kremer S., Stewart J., Taylor R., Vilo J. & Vingron M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. (2001) *Nat Genet* **29**(4): 365-71.
- Brouard S., Dupont A., Giral M., Louis S., Lair D., Braudeau C., Degauque N., Moizant F., Pallier A., Ruiz C., Guillet M., Laplaud D. & Soullillou J.P. Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation. (2005) *Am J Transplant* **5**(2): 330-40.
- Bruder D., Probst-Kepper M., Westendorf A.M., Geffers R., Beissert S., Loser K., von Boehmer H., Buer J. & Hansen W. Neuropilin-1: a surface marker of regulatory T cells. (2004) *Eur J Immunol* **34**(3): 623-30.
- Burchill M.A., Yang J., Vogtenhuber C., Blazar B.R. & Farrar M.A. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. (2007) *J Immunol* **178**(1): 280-90.
- Burlingham W.J., Grailer A.P., Fechner J.H., Jr., Kusaka S., Trucco M., Kocova M., Belzer F.O. & Sollinger H.W. Microchimerism linked to cytotoxic T lymphocyte functional unresponsiveness (clonal anergy) in a tolerant renal transplant recipient. (1995) *Transplantation* **59**(8): 1147-55.
- Burlingham W.J., Jankowska-Gan E., VanBuskirk A., Orosz C.G., Lee J.H. & Kusaka S. Loss of tolerance to a maternal kidney transplant is selective for HLA class II: evidence from trans-vivo DTH and alloantibody analysis. (2000) *Hum Immunol* **61**(12): 1395-402.
- Cai J., Lee J., Jankowska-Gan E., Derks R., Pool J., Mutis T., Goulmy E. & Burlingham W.J. Minor H antigen HA-1-specific regulator and effector CD8⁺ T cells, and HA-1 microchimerism, in allograft tolerance. (2004) *J Exp Med* **199**(7): 1017-23.
- Cai J. & Terasaki P.I. Humoral theory of transplantation: mechanism, prevention, and treatment. (2005) *Hum Immunol* **66**(4): 334-42.
- Calne R., Friend P., Moffatt S., Bradley A., Hale G., Firth J., Bradley J., Smith K. & Waldmann H. Prope tolerance, perioperative campath 1H, and low-dose cyclosporin monotherapy in renal allograft recipients. (1998) *Lancet* **351**(9117): 1701-2.
- Christensen L.L., Grunnet N., Rudiger N., Moller B. & Birkeland S.A. Indications of immunological tolerance in kidney transplantation. (1998) *Tissue Antigens* **51**(6): 637-44.
- Churchill G.A. Fundamentals of experimental design for cDNA microarrays. (2002) *Nat Genet* **32** Suppl490-5.
- Churchill G.A. & Oliver B. Sex, flies and microarrays. (2001) *Nat Genet* **29**(4): 355-6.

- Clarke W., Silverman B.C., Zhang Z., Chan D.W., Klein A.S. & Molmenti E.P. Characterization of renal allograft rejection by urinary proteomic analysis. (2003) *Ann Surg* **237**(5): 660-4; discussion 664-5.
- Cleveland W. Robust Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplots. (1979) *J Am Stat Assoc* **74**(368): 829-836.
- Cobbold S.P., Castejon R., Adams E., Zelenika D., Graca L., Humm S. & Waldmann H. Induction of foxP3+ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. (2004) *J Immunol* **172**(10): 6003-10.
- Cordoba S.P., Wang C., Williams R., Li J., Smit L., Sharland A., Allen R., McCaughan G. & Bishop A. Gene array analysis of a rat model of liver transplant tolerance identifies increased complement C3 and the STAT-1/IRF-1 pathway during tolerance induction. (2006) *Liver Transpl* **12**(4): 636-43.
- Cortesini R., Renna-Molajoni E., Cinti P., Pretagostini R., Ho E., Rossi P. & Suci-Foca N. Tailoring of immunosuppression in renal and liver allograft recipients displaying donor specific T-suppressor cells. (2002) *Hum Immunol* **63**(11): 1010-8.
- Cortesini R. & Suci-Foca N. The concept of "partial" clinical tolerance. (2004) *Transpl Immunol* **13**(2): 101-4.
- Cuturi M.C., Blancho G., Josien R. & Soulillou J.P. The biology of allograft rejection. (1994) *Curr Opin Nephrol Hypertens* **3**(6): 578-84.
- Dai Z. & Lakkis F.G. The role of cytokines, CTLA-4 and costimulation in transplant tolerance and rejection. (1999) *Curr Opin Immunol* **11**(5): 504-8.
- Dantal J., Hourmant M., Cantarovich D., Giral M., Blancho G., Dreno B. & Soulillou J.P. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. (1998) *Lancet* **351**(9103): 623-8.
- Dausset J. The HLA adventure. (1999) *Transplant Proc* **31**(1-2): 22-4.
- Davenport A., Younie M.E., Parsons J.E. & Klouda P.T. Development of cytotoxic antibodies following renal allograft transplantation is associated with reduced graft survival due to chronic vascular rejection. (1994) *Nephrol Dial Transplant* **9**(9): 1315-9.
- Deng M.C., Eisen H.J., Mehra M.R., Billingham M., Marboe C.C., Berry G., Kobashigawa J., Johnson F.L., Starling R.C., Murali S., Pauly D.F., Baron H., Wohlgemuth J.G., Woodward R.N., Klingler T.M., Walther D., Lal P.G., Rosenberg S. & Hunt S. Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. (2006) *Am J Transplant* **6**(1): 150-60.
- Donauer J., Rumberger B., Klein M., Faller D., Wilpert J., Sparna T., Schieren G., Rohrbach R., Dern P., Timmer J., Pisarski P., Kirste G. & Walz G. Expression profiling on chronically rejected transplant kidneys. (2003) *Transplantation* **76**(3): 539-47.
- Dudoit S., Yang Y.H., Callow M.J. & Speed T.P. Statistical methods for identifying differentially expressed genes in replicated cDNA microarray experiments. (2002) *Statistica Sinica* **12**(1): 111-139.
- Edgar R., Domrachev M. & Lash A.E. Gene Expression Omnibus: NCBI gene expression and hybridization array data repository. (2002) *Nucleic Acids Res* **30**(1): 207-10.
- Eisen M.B., Spellman P.T., Brown P.O. & Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. (1998) *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(25): 14863-8.
- Elashoff M., Higgs B.W., Yolken R.H., Knable M.B., Weis S., Webster M.J., Barci B.M. & Torrey E.F. Meta-analysis of 12 genomic studies in bipolar disorder. (2007) *J Mol Neurosci* **31**(3): 221-43.
- Emiroglu R., Yagmurdu M.C., Karakayali F., Haberal C., Ozcelik U., Colak T. & Haberal M. Role of donor age and acute rejection episodes on long-term graft survival in cadaveric kidney transplantations. (2005) *Transplant Proc* **37**(7): 2954-6.

- Fazilleau N., McHeyzer-Williams L.J. & McHeyzer-Williams M.G. Local development of effector and memory T helper cells. (2007) *Curr Opin Immunol* **19**(3): 259-67.
- Fehr T. & Sykes M. Tolerance induction in clinical transplantation. (2004) *Transpl Immunol* **13**(2): 117-30.
- Fischer T., Schobel H. & Barenbrock M. Specific immune tolerance during pregnancy after renal transplantation. (1996) *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* **70**(2): 217-9.
- Fishel I., Kaufman A. & Ruppin E. Meta-analysis of gene expression data: a predictor-based approach. (2007) *Bioinformatics* **23**(13): 1599-606.
- Flechner S.M., Kurian S.M., Head S.R., Sharp S.M., Whisenant T.C., Zhang J., Chismar J.D., Horvath S., Mondala T., Gilmartin T., Cook D.J., Kay S.A., Walker J.R. & Salomon D.R. Kidney transplant rejection and tissue injury by gene profiling of biopsies and peripheral blood lymphocytes. (2004) *Am J Transplant* **4**(9): 1475-89.
- Fontenot J.D., Gavin M.A. & Rudensky A.Y. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. (2003) *Nat Immunol* **4**(4): 330-6.
- Fuchs A., Cella M., Giurisato E., Shaw A.S. & Colonna M. Cutting edge: CD96 (tactile) promotes NK cell-target cell adhesion by interacting with the poliovirus receptor (CD155). (2004) *J Immunol* **172**(7): 3994-8.
- Fudaba Y., Spitzer T.R., Shaffer J., Kawai T., Fehr T., Delmonico F., Preffer F., Tolkoff-Rubin N., Dey B.R., Saidman S.L., Kraus A., Bonnefoix T., McAfee S., Power K., Kattelman K., Colvin R.B., Sachs D.H., Cosimi A.B. & Sykes M. Myeloma responses and tolerance following combined kidney and nonmyeloablative marrow transplantation: in vivo and in vitro analyses. (2006) *Am J Transplant* **6**(9): 2121-33.
- Furness P.N., Philpott C.M., Chorbajian M.T., Nicholson M.L., Bosmans J.L., Corthouts B.L., Bogers J.J., Schwarz A., Gwinner W., Haller H., Mengel M., Seron D., Moreso F. & Canas C. Protocol biopsy of the stable renal transplant: a multicenter study of methods and complication rates. (2003) *Transplantation* **76**(6): 969-73.
- Gagne K., Brouard S., Guillet M., Cuturi M.C. & Soulillou J.P. TGF-beta1 and donor dendritic cells are common key components in donor-specific blood transfusion and anti-class II heart graft enhancement, whereas tolerance induction also required inflammatory cytokines down-regulation. (2001) *Eur J Immunol* **31**(10): 3111-20.
- Giral-Classe M., Hourmant M., Cantarovich D., Dantal J., Blancho G., Daguin P., Ancelet D. & Soulillou J.P. Delayed graft function of more than six days strongly decreases long-term survival of transplanted kidneys. (1998) *Kidney Int* **54**(3): 972-8.
- Giral M., Nguyen J.M., Karam G., Kessler M., Hurault de Ligny B., Buchler M., Bayle F., Meyer C., Foucher Y., Martin M.L., Daguin P. & Soulillou J.P. Impact of graft mass on the clinical outcome of kidney transplants. (2005) *J Am Soc Nephrol* **16**(1): 261-8.
- Glas A.M., Kersten M.J., Delahaye L.J., Witteveen A.T., Kibbelaar R.E., Velds A., Wessels L.F., Joosten P., Kerkhoven R.M., Bernards R., van Krieken J.H., Kluin P.M., van't Veer L.J. & de Jong D. Gene expression profiling in follicular lymphoma to assess clinical aggressiveness and to guide the choice of treatment. (2005) *Blood* **105**(1): 301-7.
- Goldsby R., Kindt T.J. & Osborne B.A. (2000) *Immunologie: le cours de Janis Kuby*.
- Graziotto R., Del Prete D., Rigotti P., Anglani F., Baldan N., Furian L., Valente M., Antonello A., Marchini F., D'Angelo A. & Gambaro G. Perforin, Granzyme B, and fas ligand for molecular diagnosis of acute renal-allograft rejection: analyses on serial biopsies suggest methodological issues. (2006) *Transplantation* **81**(8): 1125-32.
- Gress T.M., Hoheisel J.D., Lennon G.G., Zehetner G. & Lehrach H. Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. (1992) *Mamm Genome* **3**(11): 609-19.

- Grosso J.F., Kelleher C.C., Harris T.J., Maris C.H., Hipkiss E.L., De Marzo A., Anders R., Netto G., Getnet D., Bruno T.C., Goldberg M.V., Pardoll D.M. & Drake C.G. LAG-3 regulates CD8 T cell accumulation and effector function in murine self- and tumor-tolerance systems. (2007) *J Clin Invest*.
- Guo L., Lobenhofer E.K., Wang C., Shippy R., Harris S.C., Zhang L., Mei N., Chen T., Herman D., Goodsaid F.M., Hurban P., Phillips K.L., Xu J., Deng X., Sun Y.A., Tong W., Dragan Y.P. & Shi L. Rat toxicogenomic study reveals analytical consistency across microarray platforms. (2006) *Nat Biotechnol* **24**(9): 1162-9.
- Hariharan S., Johnson C.P., Bresnahan B.A., Taranto S.E., McIntosh M.J. & Stablein D. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. (2000) *N Engl J Med* **342**(9): 605-12.
- Harris S., Coupes B.M., Roberts S.A., Roberts I.S., Short C.D. & Brenchley P.E. TGF-beta1 in chronic allograft nephropathy following renal transplantation. (2007) *J Nephrol* **20**(2): 177-85.
- Hartigan-O'Connor D.J., Poon C., Sinclair E. & McCune J.M. Human CD4+ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. (2007) *J Immunol Methods* **319**(1-2): 41-52.
- Hojo M., Morimoto T., Maluccio M., Asano T., Morimoto K., Lagman M., Shimbo T. & Suthanthiran M. Cyclosporine induces cancer progression by a cell-autonomous mechanism. (1999) *Nature* **397**(6719): 530-4.
- Holweg C.T., Peeters A.M., Balk A.H., Uitterlinden A.G., Niesters H.G., Maat A.P., Weimar W. & Baan C.C. Recipient gene polymorphisms in the Th-1 cytokines IL-2 and IFN-gamma in relation to acute rejection and graft vascular disease after clinical heart transplantation. (2003) *Transpl Immunol* **11**(1): 121-7.
- Hori S., Nomura T. & Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. (2003) *Science* **299**(5609): 1057-61.
- Horwitz P.A., Tsai E.J., Putt M.E., Gilmore J.M., Lepore J.J., Parmacek M.S., Kao A.C., Desai S.S., Goldberg L.R., Brozena S.C., Jessup M.L., Epstein J.A. & Cappola T.P. Detection of cardiac allograft rejection and response to immunosuppressive therapy with peripheral blood gene expression. (2004) *Circulation* **110**(25): 3815-21.
- Hosack D.A., Dennis G., Jr., Sherman B.T., Lane H.C. & Lempicki R.A. Identifying biological themes within lists of genes with EASE. (2003) *Genome Biol* **4**(10): R70.
- Hourmant M., Cesbron-Gautier A., Terasaki P.I., Mizutani K., Moreau A., Meurette A., Dantal J., Giral M., Blancho G., Cantarovich D., Karam G., Follea G., Souillou J.P. & Bignon J.D. Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation. (2005) *J Am Soc Nephrol* **16**(9): 2804-12.
- Ikeo K., Ishi-i J., Tamura T., Gojobori T. & Tateno Y. CIBEX: center for information biology gene expression database. (2003) *C R Biol* **326**(10-11): 1079-82.
- Iscove N.N., Barbara M., Gu M., Gibson M., Modi C. & Winegarden N. Representation is faithfully preserved in global cDNA amplified exponentially from sub-picogram quantities of mRNA. (2002) *Nat Biotechnol* **20**(9): 940-943.
- Janeway C.A., Jr. & Medzhitov R. Innate immune recognition. (2002) *Annu Rev Immunol* **20**: 197-216.
- Ji H. & Davis R.W. Data quality in genomics and microarrays. (2006) *Nat Biotechnol* **24**(9): 1112-3.
- Joosten S.A., Sijpkens Y.W., van Kooten C. & Paul L.C. Chronic renal allograft rejection: pathophysiologic considerations. (2005) *Kidney Int* **68**(1): 1-13.

- Josien R., Douillard P., Guillot C., Muschen M., Anegon I., Chetritt J., Menoret S., Vignes C., Souillou J.P. & Cuturi M.C. A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance. (1998) *J Clin Invest* **102**(11): 1920-6.
- Kanehisa M., Goto S., Kawashima S., Okuno Y. & Hattori M. The KEGG resource for deciphering the genome. (2004) *Nucleic Acids Res* **32**(Database issue): D277-80.
- Kasiske B.L., Gaston R.S., Gourishankar S., Halloran P.F., Matas A.J., Jeffery J. & Rush D. Long-term deterioration of kidney allograft function. (2005) *Am J Transplant* **5**(6): 1405-14.
- Kendzioriski C.M., Zhang Y., Lan H. & Attie A.D. The efficiency of pooling mRNA in microarray experiments. (2003) *Biostatistics* **4**(3): 465-77.
- Knechtle S.J. & Burlingham W.J. Metastable tolerance in nonhuman primates and humans. (2004) *Transplantation* **77**(6): 936-9.
- LaBaer J. So, you want to look for biomarkers (introduction to the special biomarkers issue). (2005) *J Proteome Res* **4**(4): 1053-9.
- Lagoda P. & Regad F. Les puces à ADN: outils pour une nouvelle vision de la diversité et des ressources génétiques. (2000) *Cahiers Agriculture* **9**329-340.
- Le Meur N., Lamirault G., Bihouée A., Steenman M., Bedrine-Ferran H., Teusan R., Ramstein G. & Leger J.J. A dynamic, web-accessible resource to process raw microarray scan data into consolidated gene expression values: importance of replication. (2004) *Nucleic Acids Res* **32**(18): 5349-5358.
- Le Moine A., Goldman M. & Abramowicz D. Multiple pathways to allograft rejection. (2002) *Transplantation* **73**(9): 1373-81.
- Lechler R.I. & Batchelor J.R. Immunogenicity of retransplanted rat kidney allografts. Effect of inducing chimerism in the first recipient and quantitative studies on immunosuppression of the second recipient. (1982) *J Exp Med* **156**(6): 1835-41.
- Lechler R.I., Lombardi G., Batchelor J.R., Reinsmoen N. & Bach F.H. The molecular basis of alloreactivity. (1990) *Immunol Today* **11**(3): 83-8.
- LeMaoult J., Rouas-Freiss N. & Carosella E.D. Immuno-tolerogenic functions of HLA-G: relevance in transplantation and oncology. (2005) *Autoimmun Rev* **4**(8): 503-9.
- Leung Y.F. & Cavalieri D. Fundamentals of cDNA microarray data analysis. (2003) *Trends Genet* **19**(11): 649-659.
- Li B., Hartono C., Ding R., Sharma V.K., Ramaswamy R., Qian B., Serur D., Mouradian J., Schwartz J.E. & Suthanthiran M. Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. (2001) *N Engl J Med* **344**(13): 947-54.
- Lin J.X., Migone T.S., Tsang M., Friedmann M., Weatherbee J.A., Zhou L., Yamauchi A., Bloom E.T., Mietz J., John S. & et al. The role of shared receptor motifs and common Stat proteins in the generation of cytokine pleiotropy and redundancy by IL-2, IL-4, IL-7, IL-13, and IL-15. (1995) *Immunity* **2**(4): 331-9.
- Lockhart D.J., Dong H., Byrne M.C., Follettie M.T., Gallo M.V., Chee M.S., Mittmann M., Wang C., Kobayashi M., Horton H. & Brown E.L. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. (1996) *Nat Biotechnol* **14**(13): 1675-80.
- Louis S., Braudeau C., Giral M., Dupont A., Moizant F., Robillard N., Moreau A., Souillou J.P. & Brouard S. Contrasting CD25^{hi}CD4⁺T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. (2006) *Transplantation* **81**(3): 398-407.
- Ma C., Lyons-Weiler M., Liang W., LaFramboise W., Gilbertson J.R., Becich M.J. & Monzon F.A. In vitro transcription amplification and labeling methods contribute to the variability of gene expression profiling with DNA microarrays. (2006) *J Mol Diagn* **8**(2): 183-92.

- Mah N., Thelin A., Lu T., Nikolaus S., Kuhbacher T., Gurbuz Y., Eickhoff H., Kloppel G., Lehrach H., Mellgard B., Costello C.M. & Schreiber S. A comparison of oligonucleotide and cDNA-based microarray systems. (2004) *Physiol Genomics* **16**(3): 361-70.
- Manchanda P.K., Bid H.K., Kumar A. & Mittal R.D. Genetic association of interleukin-1beta and receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism with allograft function in renal transplant patients. (2006) *Transpl Immunol* **15**(4): 289-96.
- Mansfield E.S. & Sarwal M.M. Arraying the orchestration of allograft pathology. (2004) *Am J Transplant* **4**(6): 853-62.
- Marks R. & Finke J. Biologics in the prevention and treatment of graft rejection. (2006) *Springer Semin Immunopathol* **27**(4): 457-76.
- Martinez-Llordella M., Puig-Pey I., Orlando G., Ramoni M., Tisone G., Rimola A., Lerut J., Latinne D., Margarit C., Bilbao I., Brouard S., Hernandez-Fuentes M., Soullillou J.P. & Sanchez-Fueyo A. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. (2007) *Am J Transplant* **7**(2): 309-19.
- Mary-Huard T., Daudin J.J., Baccini M., Biggeri A. & Bar-Hen A. Biases induced by pooling samples in microarray experiments. (2007) *Bioinformatics* **23**(13): i313-8.
- Mas V., Maluf D., Archer K., Yanek K., Mas L., King A., Gibney E., Massey D., Cotterell A., Fisher R. & Posner M. Establishing the molecular pathways involved in chronic allograft nephropathy for testing new noninvasive diagnostic markers. (2007) *Transplantation* **83**(4): 448-57.
- Matas A.J., Humar A., Payne W.D., Gillingham K.J., Dunn D.L., Sutherland D.E. & Najarian J.S. Decreased acute rejection in kidney transplant recipients is associated with decreased chronic rejection. (1999) *Ann Surg* **230**(4): 493-8; discussion 498-500.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. (2002) *Science* **296**(5566): 301-5.
- McCarroll S.A., Murphy C.T., Zou S., Pletcher S.D., Chin C.S., Jan Y.N., Kenyon C., Bargmann C.I. & Li H. Comparing genomic expression patterns across species identifies shared transcriptional profile in aging. (2004) *Nat Genet* **36**(2): 197-204.
- McQueen J. Some Methods for classification and analysis fo multivariate observations (1967) in Berkeley, University of California; 281-297.
- Murray J.E. The first successful organ transplants in man. (2005) *J Am Coll Surg* **200**(1): 5-9.
- Muthukumar T., Dadhania D., Ding R., Snopkowski C., Naqvi R., Lee J.B., Hartono C., Li B., Sharma V.K., Seshan S.V., Kapur S., Hancock W.W., Schwartz J.E. & Suthanthiran M. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. (2005) *N Engl J Med* **353**(22): 2342-51.
- Muthukumarana P.A., Lyons G.E., Miura Y., Thompson L.H., Watson T., Green C.J., Shurey S., Hess A.D., Rosengard B.R. & Metcalfe S.M. Evidence for functional inter-relationships between FOXP3, leukaemia inhibitory factor, and axotrophin/MARCH-7 in transplantation tolerance. (2006) *Int Immunopharmacol* **6**(13-14): 1993-2001.
- Nadon R. & Shoemaker J. Statistical issues with microarrays: processing and analysis. (2002) *Trends Genet* **18**(5): 265-271.
- Nankivell B.J., Borrows R.J., Fung C.L., O'Connell P.J., Allen R.D. & Chapman J.R. Natural history, risk factors, and impact of subclinical rejection in kidney transplantation. (2004) *Transplantation* **78**(2): 242-9.
- Nankivell B.J., Borrows R.J., Fung C.L., O'Connell P.J., Chapman J.R. & Allen R.D. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. (2004) *Transplantation* **78**(4): 557-65.
- Nankivell B.J. & Chapman J.R. The significance of subclinical rejection and the value of protocol biopsies. (2006) *Am J Transplant* **6**(9): 2006-12.

- Nguyen C., Rocha D., Granjeaud S., Baldit M., Bernard K., Naquet P. & Jordan B.R. Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. (1995) *Genomics* **29**(1): 207-16.
- Nygaard V., Loland A., Holden M., Langaas M., Rue H., Liu F., Myklebost O., Fodstad O., Hovig E. & Smith-Sorensen B. Effects of mRNA amplification on gene expression ratios in cDNA experiments estimated by analysis of variance. (2003) *BMC Genomics* **4**(1): 11.
- O'Riordan E., Orlova T.N., Mei J.J., Butt K., Chander P.M., Rahman S., Mya M., Hu R., Momin J., Eng E.W., Hampel D.J., Hartman B., Kretzler M., Delaney V. & Goligorsky M.S. Bioinformatic analysis of the urine proteome of acute allograft rejection. (2004) *J Am Soc Nephrol* **15**(12): 3240-8.
- O'Riordan E., Orlova T.N., Podust V.N., Chander P.N., Yanagi S., Nakazato M., Hu R., Butt K., Delaney V. & Goligorsky M.S. Characterization of urinary peptide biomarkers of acute rejection in renal allografts. (2007) *Am J Transplant* **7**(4): 930-40.
- O'Shea J.J., Gadina M. & Schreiber R.D. Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway. (2002) *Cell* **109** SupplS121-31.
- Oppenheimer F., Aljama P., Asensio Peinado C., Bustamante Bustamante J., Crespo Albiach J.F. & Guirado Perich L. The impact of donor age on the results of renal transplantation. (2004) *Nephrol Dial Transplant* **19** Suppl 3iii11-5.
- Orosz C.G. Graft rejection: mechanisms. (2002) *Encyclopedia of life sciences* 1-7.
- Ostrakhovitch E.A. & Li S.S. The role of SLAM family receptors in immune cell signaling. (2006) *Biochem Cell Biol* **84**(6): 832-43.
- Owens M.L., Maxwell J.G., Goodnight J. & Wolcott M.W. Discontinuance of immunosuppression in renal transplant patients. (1975) *Arch Surg* **110**(12): 1450-1.
- Park W.D. & Stegall M.D. A meta-analysis of kidney microarray datasets: investigation of cytokine gene detection and correlation with rt-PCR and detection thresholds. (2007) *BMC Genomics* **888**.
- Pastural M., Lang P., Chopin D., Buisson C., Baron C., Salomon L., Fruchaud G., Hemery F., Dahmane D., Bentabet R., Grimbert P., Remy P., Abbou C.C. & Weil B. [Results of 25 years of kidney transplantation]. (2000) *Ann Urol (Paris)* **34**(5): 352-8.
- Paul L.C. Chronic allograft nephropathy: An update. (1999) *Kidney Int* **56**(3): 783-93.
- Pena S.V. & Krensky A.M. Granulysin, a new human cytolytic granule-associated protein with possible involvement in cell-mediated cytotoxicity. (1997) *Semin Immunol* **9**(2): 117-25.
- Perico N., Cattaneo D., Sayegh M.H. & Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. (2004) *Lancet* **364**(9447): 1814-27.
- Phimister B. Going Global. (1999) *Nat Genet* **21**(s1): 1.
- Piazza A., Poggi E., Borrelli L., Servetti S., Monaco P.I., Buonomo O., Valeri M., Torlone N., Adorno D. & Casciani C.U. Impact of donor-specific antibodies on chronic rejection occurrence and graft loss in renal transplantation: posttransplant analysis using flow cytometric techniques. (2001) *Transplantation* **71**(8): 1106-12.
- Port F.K., Dykstra D.M., Merion R.M. & Wolfe R.A. Trends and results for organ donation and transplantation in the United States, 2004. (2005) *Am J Transplant* **5**(4 Pt 2): 843-9.
- Pribylova-Hribova P., Kotsch K., Lodererova A., Viklicky O., Vitko S., Volk H.D. & Lacha J. TGF-beta1 mRNA upregulation influences chronic renal allograft dysfunction. (2006) *Kidney Int* **69**(10): 1872-9.
- Quackenbush J. Genomics. Microarrays--guilt by association. (2003) *Science* **302**(5643): 240-1.

- Racusen L.C. & Haas M. Antibody-mediated rejection in renal allografts: lessons from pathology. (2006) *Clin J Am Soc Nephrol* **1**(3): 415-20.
- Randolph J.B. & Waggoner A.S. Stability, specificity and fluorescence brightness of multiply-labeled fluorescent DNA probes. (1997) *Nucleic Acids Res* **25**(14): 2923-2929.
- Reichelt O., Muller J., von Eggeling F., Driesch D., Wunderlich H., Schubert J., Grone H.J., Stein G., Ott U. & Junker K. Prediction of renal allograft rejection by urinary protein analysis using ProteinChip Arrays (surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry). (2006) *Urology* **67**(3): 472-5.
- Reiner A., Yekutieli D. & Benjamini Y. Identifying differentially expressed genes using false discovery rate controlling procedures. (2003) *Bioinformatics* **19**(3): 368-75.
- Rocca-Serra P., Brazma A., Parkinson H., Sarkans U., Shojatalab M., Contrino S., Vilo J., Abeygunawardena N., Mukherjee G., Holloway E., Kapushesky M., Kemmeren P., Lara G.G., Oezcimen A. & Sansone S.A. ArrayExpress: a public database of gene expression data at EBI. (2003) *C R Biol* **326**(10-11): 1075-8.
- Romero P., Zippelius A., Kurth I., Pittet M.J., Touvrey C., Iancu E.M., Corthesy P., Devevre E., Speiser D.E. & Rufer N. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8+ T lymphocytes. (2007) *J Immunol* **178**(7): 4112-9.
- Roussey-Kesler G., Giral M., Moreau A., Subra J.F., Legendre C., Noel C., Pillebout E., Brouard S. & Soulillou J.P. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. (2006) *Am J Transplant* **6**(4): 736-46.
- Rufer N., Zippelius A., Batard P., Pittet M.J., Kurth I., Corthesy P., Cerottini J.C., Leyvraz S., Roosnek E., Nabholz M. & Romero P. Ex vivo characterization of human CD8+ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. (2003) *Blood* **102**(5): 1779-87.
- Rush D.N., Henry S.F., Jeffery J.R., Schroeder T.J. & Gough J. Histological findings in early routine biopsies of stable renal allograft recipients. (1994) *Transplantation* **57**(2): 208-11.
- Rush D.N., Jeffery J.R. & Gough J. Sequential protocol biopsies in renal transplant patients. Clinico-pathological correlations using the Banff schema. (1995) *Transplantation* **59**(4): 511-4.
- Russell J.H. & Ley T.J. Lymphocyte-mediated cytotoxicity. (2002) *Annu Rev Immunol* **20**: 323-70.
- Sakaguchi S., Ono M., Setoguchi R., Yagi H., Hori S., Fehervari Z., Shimizu J., Takahashi T. & Nomura T. Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. (2006) *Immunol Rev* **212**: 8-27.
- Sancho D., Gomez M. & Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. (2005) *Trends Immunol* **26**(3): 136-40.
- Sarwal M., Chua M.S., Kambham N., Hsieh S.C., Satterwhite T., Masek M. & Salvatierra O., Jr. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. (2003) *N Engl J Med* **349**(2): 125-38.
- Satagopan J.M. & Panageas K.S. A statistical perspective on gene expression data analysis. (2003) *Stat Med* **22**(3): 481-99.
- Schaub S., Rush D., Wilkins J., Gibson I.W., Weiler T., Sangster K., Nicolle L., Karpinski M., Jeffery J. & Nickerson P. Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. (2004) *J Am Soc Nephrol* **15**(1): 219-27.
- Schaub S., Wilkins J.A., Antonovici M., Krokhin O., Weiler T., Rush D. & Nickerson P. Proteomic-based identification of cleaved urinary beta2-microglobulin as a potential marker for acute tubular injury in renal allografts. (2005) *Am J Transplant* **5**(4 Pt 1): 729-38.

- Schena M., Shalon D., Davis R.W. & Brown P.O. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. (1995) *Science* **270**(5235): 467-70.
- Scherer A., Krause A., Walker J.R., Korn A., Niese D. & Raulf F. Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies. (2003) *Transplantation* **75**(8): 1323-30.
- Schwartz R. & Dameshek W. Drug-induced immunological tolerance. (1959) *Nature* **183**(4676): 1682-3.
- Seddiki N., Santner-Nanan B., Martinson J., Zaunders J., Sasson S., Landay A., Solomon M., Selby W., Alexander S.I., Nanan R., Kelleher A. & Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. (2006) *J Exp Med* **203**(7): 1693-700.
- Seino K., Yamauchi T., Shikata K., Kobayashi S., Nagai M., Taniguchi M. & Fukao K. Prevention of acute and chronic allograft rejection by a novel retinoic acid receptor- α -selective agonist. (2004) *Int Immunol* **16**(5): 665-73.
- Shi L., Reid L.H., Jones W.D., Shippy R., Warrington J.A., Baker S.C., Collins P.J., de Longueville F., Kawasaki E.S., Lee K.Y., *et al.* The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. (2006) *Nat Biotechnol* **24**(9): 1151-61.
- Shimizu J., Yamazaki S. & Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25⁺CD4⁺ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. (1999) *J Immunol* **163**(10): 5211-8.
- Shuai K. & Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. (2003) *Nat Rev Immunol* **3**(11): 900-11.
- Simeoni E., Dudler J., Fleury S., Li J., Pagnotta M., Pascual M., von Segesser L.K. & Vassalli G. Gene transfer of a soluble IL-1 type 2 receptor-Ig fusion protein improves cardiac allograft survival in rats. (2007) *Eur J Cardiothorac Surg* **31**(2): 222-8.
- Sivozhlezov V., Giacomelli L., Tripathi S. & Nicolini C. Gene expression in the cell cycle of human T lymphocytes: I. Predicted gene and protein networks. (2006) *J Cell Biochem* **97**(5): 1137-50.
- Snow J.W., Abraham N., Ma M.C., Herndier B.G., Pastuszak A.W. & Goldsmith M.A. Loss of tolerance and autoimmunity affecting multiple organs in STAT5A/5B-deficient mice. (2003) *J Immunol* **171**(10): 5042-50.
- Solez K., Colvin R.B., Racusen L.C., Sis B., Halloran P.F., Birk P.E., Campbell P.M., Cascalho M., Collins A.B., Demetris A.J., Drachenberg C.B., Gibson I.W., Grimm P.C., Haas M., Lerut E., Liapis H., Mannon R.B., Marcus P.B., Mengel M., Mihatsch M.J., Nankivell B.J., Nickleleit V., Papadimitriou J.C., Platt J.L., Randhawa P., Roberts I., Salinas-Madruga L., Salomon D.R., Seron D., Sheaff M. & Weening J.J. Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). (2007) *Am J Transplant* **7**(3): 518-26.
- Soulillou J.P. & Giral M. Controlling the incidence of infection and malignancy by modifying immunosuppression. (2001) *Transplantation* **72**(12 Suppl): S89-93.
- Southern E.M. An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. (1974) *Anal Biochem* **62**(1): 317-318.
- Starzl T.E., Murase N., Demetris A.J., Trucco M., Abu-Elmagd K., Gray E.A., Eghtesad B., Shapiro R., Marcos A. & Fung J.J. Lessons of organ-induced tolerance learned from historical clinical experience. (2004) *Transplantation* **77**(6): 926-9.
- Strober S., Benike C., Krishnaswamy S., Engleman E.G. & Grumet F.C. Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of

- immunosuppressive drugs: studies of chimerism and anti-donor reactivity. (2000) *Transplantation* **69**(8): 1549-54.
- Stuart J.M., Segal E., Koller D. & Kim S.K. A gene-coexpression network for global discovery of conserved genetic modules. (2003) *Science* **302**(5643): 249-55.
- Sturn A. Cluster analysis for large scale gene expression studies (2001) in *The Institute for Genomic Research*, Rockville, MD, 82.
- Szabo A. & Heemann U. Ischemia reperfusion injury and chronic allograft rejection. (1998) *Transplant Proc* **30**(8): 4281-4.
- Takatsuki M., Uemoto S., Inomata Y., Egawa H., Kiuchi T., Fujita S., Hayashi M., Kanematsu T. & Tanaka K. Weaning of immunosuppression in living donor liver transplant recipients. (2001) *Transplantation* **72**(3): 449-54.
- Terasaki P.I. & Cai J. Humoral theory of transplantation: further evidence. (2005) *Curr Opin Immunol* **17**(5): 541-5.
- Terasaki P.I. & Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. (2004) *Am J Transplant* **4**(3): 438-43.
- Thaunat O., Legendre C., Morelon E., Kreis H. & Mamzer-Bruneel M.F. To biopsy or not to biopsy? Should we screen the histology of stable renal grafts? (2007) *Transplantation* **84**(6): 671-6.
- Tibshirani R., Hastie T., Narasimhan B. & Chu G. Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10): 6567-72.
- Torrealba J.R., Katayama M., Fechner J.H., Jr., Jankowska-Gan E., Kusaka S., Xu Q., Schultz J.M., Oberley T.D., Hu H., Hamawy M.M., Jonker M., Wubben J., Doxiadis G., Bontrop R., Burlingham W.J. & Knechtle S.J. Metastable tolerance to rhesus monkey renal transplants is correlated with allograft TGF-beta 1+CD4+ T regulatory cell infiltrates. (2004) *J Immunol* **172**(9): 5753-64.
- Trivedi H.L. Immunobiology of rejection and adaptation. (2007) *Transplant Proc* **39**(3): 647-52.
- Tseng G.C., Oh M.K., Rohlin L., Liao J.C. & Wong W.H. Issues in cDNA microarray analysis: quality filtering, channel normalization, models of variations and assessment of gene effects. (2001) *Nucleic Acids Res* **29**(12): 2549-2557.
- Tusher V.G., Tibshirani R. & Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(9): 5116-21.
- Uehling D.T., Hussey J.L., Weinstein A.B., Wank R. & Bach F.H. Cessation of immunosuppression after renal transplantation. (1976) *Surgery* **79**(3): 278-82.
- van 't Veer L.J., Dai H., van de Vijver M.J., He Y.D., Hart A.A., Mao M., Peterse H.L., van der Kooy K., Marton M.J., Witteveen A.T., Schreiber G.J., Kerkhoven R.M., Roberts C., Linsley P.S., Bernards R. & Friend S.H. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. (2002) *Nature* **415**(6871): 530-6.
- van Mirre E., Breunis W.B., Geissler J., Hack C.E., de Boer M., Roos D. & Kuijpers T.W. Neutrophil responsiveness to IgG, as determined by fixed ratios of mRNA levels for activating and inhibitory FcγRII (CD32), is stable over time and unaffected by cytokines. (2006) *Blood* **108**(2): 584-90.
- VanBuskirk A.M., Burlingham W.J., Jankowska-Gan E., Chin T., Kusaka S., Geissler F., Pelletier R.P. & Orosz C.G. Human allograft acceptance is associated with immune regulation. (2000) *J Clin Invest* **106**(1): 145-55.
- Veale J.L., Liang L.W., Zhang Q., Gjertson D.W., Du Z., Bloomquist E.W., Jia J., Qian L., Wilkinson A.H., Danovitch G.M., Pham P.T., Rosenthal J.T., Lassman C.R., Braun J., Reed E.F. & Gritsch H.A. Noninvasive diagnosis of cellular and antibody-mediated

- rejection by perforin and granzyme B in renal allografts. (2006) *Hum Immunol* **67**(10): 777-86.
- Veri M.C., Gorlatov S., Li H., Burke S., Johnson S., Stavenhagen J., Stein K.E., Bonvini E. & Koenig S. Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fcγ-receptor IIB (CD32B) from the activating Fcγ-receptor IIA (CD32A): biochemical, biological and functional characterization. (2007) *Immunology* **121**(3): 392-404.
- von Mering C., Jensen L.J., Kuhn M., Chaffron S., Doerks T., Kruger B., Snel B. & Bork P. STRING 7--recent developments in the integration and prediction of protein interactions. (2007) *Nucleic Acids Res* **35**(Database issue): D358-62.
- von Mering C., Jensen L.J., Snel B., Hooper S.D., Krupp M., Foglierini M., Jouffre N., Huynen M.A. & Bork P. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. (2005) *Nucleic Acids Res* **33**(Database issue): D433-7.
- Wang E., Miller L.D., Ohnmacht G.A., Liu E.T. & Marincola F.M. High-fidelity mRNA amplification for gene profiling. (2000) *Nat Biotechnol* **18**(4): 457-459.
- Wang H., Hosiawa K.A., Min W., Yang J., Zhang X., Garcia B., Ichim T.E., Zhou D., Lian D., Kelvin D.J. & Zhong R. Cytokines regulate the pattern of rejection and susceptibility to cyclosporine therapy in different mouse recipient strains after cardiac allografting. (2003) *J Immunol* **171**(7): 3823-36.
- Weekes M.P., Carmichael A.J., Wills M.R., Mynard K. & Sissons J.G. Human CD28-CD8+ T cells contain greatly expanded functional virus-specific memory CTL clones. (1999) *J Immunol* **162**(12): 7569-77.
- Wei C., Li J. & Bumgarner R.E. Sample size for detecting differentially expressed genes in microarray experiments. (2004) *BMC Genomics* **5**(1): 87.
- Wilson D.L., Buckley M.J., Helliwell C.A. & Wilson I.W. New normalization methods for cDNA microarray data. (2003) *Bioinformatics* **19**(11): 1325-32.
- Wimmer C.D., Rentsch M., Crispin A., Illner W.D., Arbogast H., Graeb C., Jauch K.W. & Guba M. The janus face of immunosuppression - de novo malignancy after renal transplantation: the experience of the Transplantation Center Munich. (2007) *Kidney Int* **71**(12): 1271-8.
- Wolint P., Betts M.R., Koup R.A. & Oxenius A. Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8+ T cells. (2004) *J Exp Med* **199**(7): 925-36.
- Worthington J.E., Martin S., Al-Husseini D.M., Dyer P.A. & Johnson R.W. Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome. (2003) *Transplantation* **75**(7): 1034-40.
- Yang I.V., Chen E., Hasseman J.P., Liang W., Frank B.C., Wang S., Sharov V., Saeed A.I., White J., Li J., Lee N.H., Yeatman T.J. & Quackenbush J. Within the fold: assessing differential expression measures and reproducibility in microarray assays. (2002) *Genome Biol* **3**(11): research0062.
- Yang Y.H., Buckley M.J. & Speed T.P. Analysis of cDNA microarray images. (2001) *Brief Bioinform* **2**(4): 341-349.
- Yang Y.H., Dudoit S., Luu P., Lin D.M., Peng V., Ngai J. & Speed T.P. Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. (2002) *Nucleic Acids Res* **30**(4): e15.
- Yao Z., Kanno Y., Kerenyi M., Stephens G., Durant L., Watford W.T., Laurence A., Robinson G.W., Shevach E.M., Moriggl R., Hennighausen L., Wu C. & O'Shea J.J. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. (2007) *Blood* **109**(10): 4368-75.

- Yi H., Zhen Y., Jiang L., Zheng J. & Zhao Y. The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells. (2006) *Cell Mol Immunol* **3**(3): 189-95.
- Zhang W., Carriquiry A., Nettleton D. & Dekkers J.C. Pooling mRNA in microarray experiments and its effect on power. (2007) *Bioinformatics* **23**(10): 1217-24.
- Zoller K.M., Cho S.I., Cohen J.J. & Harrington J.T. Cessation of immunosuppressive therapy after successful transplantation: a national survey. (1980) *Kidney Int* **18**(1): 110-4.

Annexes

Annexe 1

Tableau 6 : Liste des 343 gènes (Article II)

Symbole	Nom	Fold change
CCL4L1	chemokine (C-C motif) ligand 4-like 1	2.529
BLK	B lymphoid tyrosine kinase	1.413
CCR6	chemokine (C-C motif) receptor 6	1.389
BANK1	B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1	1.866
CCL4	chemokine (C-C motif) ligand 4	1.695
PTGDS	prostaglandin D2 synthase 21kDa (brain)	1.640
KIR2DL4	killer cell immunoglobulin-like receptor, two domains, long cytoplasmic tail, 4	1.287
recombinantIgG4	recombinant IgG4 heavy chain gene, partial cds.	1.746
IMAGE4690793wit	cDNA clone IMAGE:4690793, with apparent retained intron.	1.343
MS4A1	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1	1.959
COL9A2	collagen, type IX, alpha 2	1.216
TERA	TERA protein	1.414
RAB33A	RAB33A, member RAS oncogene family	1.227
POMT1	protein-O-mannosyltransferase 1	1.206
TRAF5	TNF receptor associated factor 5	1.202
similar to annexin	similar to annexin II receptor	1.236
STAP2	signal-transducing adaptor protein-2	1.441
IGH@	immunoglobulin heavy locus	1.411
CCL3	chemokine (C-C motif) ligand 3	2.094
PACAP	proapoptotic caspase adaptor protein	1.388
IGLV gene clone 63	partial IGLV gene for immunoglobulin lambda chain variable region, clone 63.	1.526
similar to Immuno	similar to Immunoglobulin-binding protein 1 (CD79a-binding protein 1) (B cell signal transduction molecule alpha 4) (Alpha 4 protein) (LOC166496), mRNA.	1.170
mRNA for immunogl	mRNA for immunoglobulin light chain variable region, clone Z5scFvV8.	1.865
chromosomal prot	chromosomal protein mRNA, complete cds.	1.330
SH2D1A	SH2 domain protein 1A, Duncan's disease (lymphoproliferative syndrome)	1.236
TULP1	tubby like protein 1	1.264
mRNA for anti TNF	mRNA for anti TNF-alpha antibody light-chain Fab fragment, partial cds, clone:1F8-mk26L.	1.615
RECK	reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs	1.283
FXD3	FXD domain containing ion transport regulator 3	1.210
IGL@	immunoglobulin lambda locus	1.675
AGPAT1	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1 (lysophosphatidic acid acyltransferase, alpha)	1.202
clone BF3N1-L1-B	clone BF3N1-L1-B12/2E-23-P immunoglobulin lambda light chain variable region gene, partial cds.	1.437
RARG	retinoic acid receptor, gamma	1.264
ISG20	interferon stimulated gene 20kDa	1.247
C22orf18	chromosome 22 open reading frame 18	1.316
HPS3	Hermansky-Pudlak syndrome 3	1.190
SIRT1	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 1 (S. cerevisiae)	1.354
PPP1R15A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	1.191
sim to LOC132299	similar to evidence:NAS~hypothetical protein~putative(LOC132299), mRNA.	1.276
HFL1	H factor (complement)-like 1	1.172

GYG2	glycogenin 2	1.294
IGLC2	immunoglobulin lambda constant 2 (Kern-Oz- marker)	1.727
MYST4	MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 4	1.221
CD7	CD7 antigen (p41)	1.277
MAGEB6	melanoma antigen, family B, 6	1.376
POU4F1	POU domain, class 4, transcription factor 1	1.309
RPL36	ribosomal protein L36	1.223
ADAM28	a disintegrin and metalloproteinase domain 28	1.447
USP11	ubiquitin specific protease 11	1.162
IGL@	immunoglobulin lambda locus	1.598
GDF11	growth differentiation factor 11	1.211
IGKVgenVKPB33NP	partial IGKV gene for immunoglobulin kappa light chainvariable region, isolate VKPB33NP.	1.513
BIRC7	baculoviral IAP repeat-containing 7 (livin)	1.242
partialIGVKO12/	partial IGVKO12/2 gene for immunoglobulin kappa chainvariable region, donor BJ, cell76.	1.482
GCKR	glucokinase (hexokinase 4) regulatory protein	1.207
MGC10334	hypothetical protein MGC10334	1.191
siPhosLOC256854	similar to Phosphatidylinositol 3-kinase C2domain-containing gamma polypeptide (Phosphoinositide3-Kinase-C2-gamma) (PtdIns-3-kinase C2 gamma) (PI3K-C2gamma)(LOC256854), mRNA.	1.309
UBL3	ubiquitin-like 3	1.852
ANXA11	annexin A11	1.143
KRTHA1	keratin, hair, acidic, 1	1.265
MGC40426IMAGE51	cDNA clone MGC:40426 IMAGE:5178085, complete cds.	1.463
AKR1C3	aldo-keto reductase family 1, member C3 (3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type II)	1.469
IGKV3D-7	immunoglobulin kappa variable 3D-7	1.453
NID	nidogen (enactin)	1.271
MLL	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila)	1.145
CCL18	chemokine (C-C motif) ligand 18 (pulmonary and activation-regulated)	1.357
SPAP1	SH2 domain containing phosphatase anchor protein 1	1.273
IL1A	interleukin 1, alpha	1.493
PRCP	prolylcarboxypeptidase (angiotensinase C)	0.703
PPT1	palmitoyl-protein thioesterase 1 (ceroid-lipofuscinosis, neuronal 1, infantile)	0.666
MAP4K4	mitogenactivated protein kinase kinase kinase kinase 4	0.757
TALDO1	transaldolase 1	0.697
NPC2	Niemann-Pick disease, type C2	0.697
MARCO	macrophage receptor with collagenous structure	0.738
MS4A6A	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A	0.609
INPP5E	inositol polyphosphate5phosphatase, 72 kDa	0.739
CD163geneexon1a	CD163 gene, exon 1 and joined CDS.	0.681
PYGL	phosphorylase, glycogen; liver (Hers disease, glycogen storage disease type VI)	0.731
IRF1	interferon regulatory factor 1	0.720
HBB	hemoglobin, beta	0.506
MICL	myeloid inhibitory C-type lectin-like receptor	0.621
DCL-1	type I transmembrane C-type lectin receptor DCL-1	0.744
RTN3	reticulon 3	0.732
ANPEP	alanyl (membrane) aminopeptidase (aminopeptidase N, aminopeptidase M, microsomal aminopeptidase, CD13, p150)	0.707
Nmycgene3exon	N-myc gene 3' exon.	0.812
ANXA2	annexin A2	0.702

DUSP6	dual specificity phosphatase 6	0.542
FLJ39616	apoptosis-related protein PNAS-1	0.716
LGALS3	lectin, galactoside-binding, soluble, 3 (galectin 3)	0.698
DKFZp434B227	hypothetical protein DKFZp434B227	0.779
SPTLC2	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2	0.780
simtoARP23compl	similar to ARP2/3 complex 21 kDa subunit (P21-ARC)(Actin-related protein 2/3 complex subunit 3) (LOC222755), mRNA.	0.699
DES	desmin	0.770
LY96	lymphocyte antigen 96	0.688
FLJ22662	hypothetical protein FLJ22662	0.645
DUSP6	dual specificity phosphatase 6	0.631
ANXA5	annexin A5	0.747
CLECSF9	C-type (calcium dependent, carbohydrate-recognition domain) lectin, superfamily member 9	0.647
LST1	leukocyte specific transcript 1	0.761
F2	coagulation factor II (thrombin)	0.771
ITM2B	integral membrane protein 2B	0.695
ARPC3B	actin related protein 2/3 complex, subunit 3B, 21kDa	0.806
CDA	cytidine deaminase	0.702
ATP6V1B2	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 56/58kDa, V1 subunit B, isoform 2	0.706
SCARB2	scavenger receptor class B, member 2	0.779
IFI30	interferon, gamma-inducible protein 30	0.756
CASP1	caspase 1, apoptosisrelated cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	0.713
HLA-DRB1	major histocompatibility complex, class II, DR beta 1	0.651
CLC	cardiotrophin-like cytokine	0.802
CD53	CD53 antigen	0.707
NCF1	neutrophil cytosolic factor 1 (47kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 1)	0.725
CORO1C	coronin, actin binding protein, 1C	0.778
simtoCathepsinL	similar to Cathepsin L precursor (Major excretedprotein) (MEP) (LOC219343), mRNA.	0.746
S100A10	S100 calcium binding protein A10 (annexin II ligand, calpactin I, light polypeptide (p11))	0.789
CLECSF6	C-type (calcium dependent, carbohydrate-recognition domain) lectin, superfamily member 6	0.768
CTSL	cathepsin L	0.679
CD33	CD33 antigen (gp67)	0.821
RNASE2	ribonuclease, RNase A family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin)	0.600
SDHB	succinate dehydrogenase complex, subunit B, iron sulfur (lp)	0.801
HBB	hemoglobin, beta	0.598
LAMP2	lysosomal-associated membrane protein 2	0.738
hemoglobinalpha	hemoglobin alpha 1 globin chain (HBA1) gene, exons 1and 2 and partial cds.	0.545
TXN	thioredoxin	0.805
HBD	hemoglobin, delta	0.647
MAP2K1	mitogenactivated protein kinase kinase 1	0.770
CTSH	cathepsin H	0.724
FCN1	ficolin (collagen/fibrinogen domain containing) 1	0.709
PTEN	phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)	0.766
EIF4EL3	eukaryotic translation initiation factor 4E-like 3	0.840
MNDA	myeloid cell nuclear differentiation antigen	0.647
SNFT	Jun dimerization protein p21SNFT	0.798
PIP5K2B	phosphatidylinositol4phosphate 5kinase, type II, beta	0.609

ITGB2	integrin, beta 2 (antigen CD18 (p95), lymphocyte function-associated antigen 1; macrophage antigen 1 (mac-1) beta subunit)	0.737
PISD	phosphatidylserine decarboxylase	0.808
SMS	spermine synthase	0.811
C6orf166	chromosome 6 open reading frame 166	0.800
MAD	MAX dimerization protein 1	0.674
RNASE2	ribonuclease, RNase A family, 2 (liver, eosinophil-derived neurotoxin)	0.660
NDUFC1	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 1, 6kDa	0.780
MGC10485	hypothetical protein MGC10485	0.808
FBLN1	fibulin 1	0.814
CSF2RA	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, lowaffinity (granulocytemacrophage)	0.705
ILK	integrin-linked kinase	0.800
GPR32	G protein-coupled receptor 32	0.805
YWHAH	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, eta polypeptide	0.825
IRS1	insulin receptor substrate 1	0.846
SLC2A14	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 14	0.797
MAG	myelin associated glycoprotein	0.725
CLIC1	chloride intracellular channel 1	0.788
PTAFR	platelet-activating factor receptor	0.822
ACVR1	activin A receptor, type I	0.850
RAD18	RAD18 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	0.796
SYNGR3	synaptogyrin 3	0.831
PGD	phosphogluconate dehydrogenase	0.649
SDCBP	syndecan binding protein (syntenin)	0.731
TIEG	TGFB inducible early growth response	0.785
CKLF	chemokine-like factor	0.785
RAB24	RAB24, member RAS oncogene family	0.768
AGL	amylo1, 6glucosidase, 4alphaglucanotransferase (glycogen debranching enzyme, glycogen storage disease type III)	0.650
TBXAS1	thromboxane A synthase 1 (platelet, cytochrome P450, family 5, subfamily A)	0.750
IFIT4	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 4	0.706
PTGER2	prostaglandin E receptor 2 (subtype EP2), 53kDa	0.756
FCGR1A	Fc fragment of IgG, high affinity Ia, receptor for (CD64)	0.873
CEACAM4	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 4	0.742
DKFZp434E1119	hypothetical protein DKFZp434E1119	0.835
MGAM	maltase-glucoamylase (alpha-glucosidase)	0.659
TLR1	toll-like receptor 1	0.793
SLC31A1	solute carrier family 31 (copper transporters), member 1	0.854
PITPN	phosphatidylinositol transfer protein	0.820
MGC14697	upregulated during skeletal muscle growth 5	0.765
TP53I3	tumor protein p53 inducible protein 3	0.806
LAMC2	laminin, gamma 2	0.868
SF3A1	splicing factor 3a, subunit 1, 120kDa	0.842
CPNE3	copine III	0.750
GLRX	glutaredoxin (thioltransferase)	0.764
PILRB	paired immunoglobulin-like type 2 receptor beta	0.758
IFNG	interferon, gamma	0.672
IGSF2	immunoglobulin superfamily, member 2	0.812

COX7B	cytochrome c oxidase subunit VIIb	0.828
AGR2	anterior gradient 2 homolog (<i>Xenopus laevis</i>)	0.841
ORM1	orosomuroid 1	0.779
PIN1	protein (peptidyl-prolyl cis/trans isomerase) NIMA-interacting 1	0.764
USP15	ubiquitin specific protease 15	0.786
EPHB4	EphB4	0.845
CCT5	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	0.802
HMGCR	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	0.835
C14orf94	chromosome 14 open reading frame 94	0.795
STXBP3	syntaxin binding protein 3	0.644
FPR1	formyl peptide receptor 1	0.697
LOC222344	TNF receptor-associated factor 6 (LOC222344), mRNA.	0.839
BRD8	bromodomain containing 8	0.838
TRO	trophinin	0.861
CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine protease (interleukin 1, beta, convertase)	0.732
ADAMTS8	a disintegrin-like and metalloprotease (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 8	0.860
C3AR1	complement component 3a receptor 1	0.825
MKSTYX	map kinase phosphatase-like protein MKSTYX	0.841
DKFZP586O0120	DKFZP586O0120 protein	0.812
NQO2	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	0.833
PGK1	phosphoglycerate kinase 1	0.802
CLEC2	C-type lectin-like receptor-2	0.759
TXN	thioredoxin	0.844
CAT	catalase	0.787
TEK	TEK tyrosine kinase, endothelial (venous malformations, multiple cutaneous and mucosal)	0.811
TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein	0.808
ARPC1B	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa	0.850
FAM14A	family with sequence similarity 14, member A	0.765
GLA	galactosidase, alpha	0.802
VPS35	vacuolar protein sorting 35 (yeast)	0.829
SAP30	sin3-associated polypeptide, 30kDa	0.648
GOLPH2	golgi phosphoprotein 2	0.824
simtotubulina1p	Similar to tubulin alpha 1, clone MGC:8360IMAGE:2819847, mRNA, complete cds.	0.723
UBE1	ubiquitin-activating enzyme E1 (A1S9T and BN75 temperature sensitivity complementing)	0.873
TLR2	toll-like receptor 2	0.786
VNN2	vanin 2	0.653
GRB14	growth factor receptor-bound protein 14	0.814
FKBP1A	FK506 binding protein 1A, 12kDa	0.797
CLU	clusterin (complement lysis inhibitor, SP-40,40, sulfated glycoprotein 2, testosterone-repressed prostate message 2, apolipoprotein J)	0.706
PGK2	phosphoglycerate kinase 2	0.767
MYL6	myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	0.851
PSME3	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 3 (PA28 gamma; Ki)	0.874
ITIH4	inter-alpha (globulin) inhibitor H4 (plasma Kallikrein-sensitive glycoprotein)	0.798
PGAM1	phosphoglycerate mutase 1 (brain)	0.772
TAGLN2	transgelin 2	0.764
SAMHD1	SAM domain and HD domain 1	0.837

CSF2RA	colony stimulating factor 2 receptor, alpha, lowaffinity (granulocytemacrophage)	0.785
CAMP	cathelicidin antimicrobial peptide	0.475
FPR1	formyl peptide receptor 1	0.725
CCR2	chemokine (C-C motif) receptor 2	0.789
CCT5	chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon)	0.822
APOBEC3B	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3B	0.541
IL13RA1	interleukin 13 receptor, alpha 1	0.798
APG3	autophagy Apg3p/Aut1p-like	0.786
DYSF	dysferlin, limb girdle muscular dystrophy 2B (autosomal recessive)	0.804
ERCC2	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2 (xeroderma pigmentosum D)	0.824
F5	coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)	0.795
DAO	D-amino-acid oxidase	0.852
MGC32601IMAGE47	cDNA clone MGC:32601 IMAGE:4767223, complete cds.	0.817
PDGFRA	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	0.803
siodorantmetabo	similar to odorant-metabolizing protein RY2D1(LOC257202), mRNA.	0.856
RCN1	reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain	0.825
cellrecognition	cell recognition molecule CASPR3 (CASPR3), transcriptvariant 2, mRNA.	0.724
C8A	complement component 8, alpha polypeptide	0.855
STIP1	stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)	0.860
MYL9	myosin, light polypeptide 9, regulatory	0.807
siUbiqLOC220989	similar to Ubiquinol-cytochrome C reductase complex 11kDa protein, mitochondrial precursor (Mitochondrial hinge protein)(Cytochrome C1, nonheme 11 kDa protein) (Complex III subunit VIII)(LOC220989), mRNA.	0.858
BIRC4	baculoviral IAP repeat-containing 4	0.863
MLC2mRNAfornm	MLC-2 mRNA for nonmuscle myosin light chain 2,complete cds.	0.875
LSM3	LSM3 homolog, U6 small nuclear RNA associated (S. cerevisiae)	0.858
OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	0.724
SUCLA2	succinate-CoA ligase, ADP-forming, beta subunit	0.855
MBD2	methylCpG binding domain protein 2	0.851
TXNL	thioredoxin-like, 32kDa	0.855
CSTB	cystatin B (stefin B)	0.814
BAG1	BCL2-associated athanogene	0.798
NDP52	nuclear domain 10 protein	0.838
EPHB2	EphB2	0.855
ASC	apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD	0.839
SPARC	secreted protein, acidic, cysteine-rich (osteonectin)	0.776
TNFRSF1A	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A	0.816
ANXA4	annexin A4	0.814
AF5Q31	ALL1 fused gene from 5q31	0.863
ERBB3	v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 3 (avian)	0.735
CSDA	cold shock domain protein A	0.834
MEA	male-enhanced antigen	0.853
LAK	lymphocyte alpha-kinase	0.852
TUBA1	tubulin, alpha 1 (testis specific)	0.825
OSBPL7	oxysterol binding protein-like 7	0.876
GRN	granulin	0.826
EPSTI1	epithelial stromal interaction 1 (breast)	0.739

CSPG2	chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	0.729
NDUFA6	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6, 14kDa	0.829
SLC31A2	solute carrier family 31 (copper transporters), member 2	0.842
NCF1	neutrophil cytosolic factor 1 (47kDa, chronic granulomatous disease, autosomal 1)	0.734
TRAF3IP1	TNF receptor-associated factor 3 interacting protein 1	0.849
P4HA1	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide I	0.815
MGLL	monoglyceride lipase	0.808
APOC3	apolipoprotein C-III	0.855
SELP	selectin P (granule membrane protein 140kDa, antigen CD62)	0.829
MYL9	myosin, light polypeptide 9, regulatory	0.829
CD14	CD14 antigen	0.805
DJ167A19.1	hypothetical protein DJ167A19.1	0.888
CYBRD1	cytochrome b reductase 1	0.855
SULT1B1	sulfotransferase family, cytosolic, 1B, member 1	0.816
C1orf29	chromosome 1 open reading frame 29	0.589
PPP1CA	protein phosphatase 1, catalytic subunit, alpha isoform	0.771
NP	nucleoside phosphorylase	0.763
PSMB8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional protease 7)	0.814
DNaseqRP1163P12	DNA sequence from clone RP11-63P12 on chromosome9q21.11-21.33 Contains the ZNF216 gene for zinc finger protein 216,a non-metastatic cells 1 protein (NM23A, NME1) pseudogene, the 3'end of the gene for KIAA1258 protein and a CpG island, completesequence.	0.825
STK17B	serine/threonine kinase 17b (apoptosis-inducing)	0.720
GYPA	glycophorin A (includes MN blood group)	0.820
ARHGDI2	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	0.703
CYP27A1	cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1	0.851
CLTB	clathrin, light polypeptide (Lcb)	0.852
ATP5F1	ATP synthase, H ⁺ ; transporting, mitochondrial F0 complex, subunit b, isoform 1	0.861
simtoglutamatea	similar to glutamate--ammonia ligase (EC 6.3.1.2) -pig (LOC150711), mRNA.	0.843
SCO2	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 2 (yeast)	0.738
ACE2	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 2	0.842
MRPL14	mitochondrial ribosomal protein L14	0.884
MADH2	MAD, mothers against decapentaplegic homolog 2 (Drosophila)	0.851
MAFB	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (avian)	0.761
BDKRB2	bradykinin receptor B2	0.788
SLPI	secretory leukocyte protease inhibitor (antileukoproteinase)	0.745
APOA5	apolipoprotein A-V	0.754
APLP2	amyloid beta (A4) precursor-like protein 2	0.797
FCGR3A	Fc fragment of IgG, low affinity IIIa, receptor for (CD16)	0.770
TBC1D3	TBC1 domain family, member 3	0.868
simtoalOC257018	similar to a disintegrin-like and metalloprotease(reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 17preproprotein (LOC257018), mRNA.	0.880
RNF130	ring finger protein 130	0.825
simtoAntioxidan	similar to Antioxidant protein 2 (1-Cys peroxiredoxin)(1-Cys PRX) (Acidic calcium-independent phospholipase A2) (aiPLA2)(Non-selenium glutathione peroxidase) (NSGPx) (24 kDa protein)(Liver 2D page spot 40) (red blood cells page spot 12)...(LOC205858), mRNA.	0.800
RRAS	related RAS viral (rras) oncogene homolog	0.865
BRAP	BRCA1 associated protein	0.832
CBX3	chromobox homolog 3 (HP1 gamma homolog, Drosophila)	0.851
ZYX	zyxin	0.796

CST3	cystatin C (amyloid angiopathy and cerebral hemorrhage)	0.789
simtoCLOC121026	similar to Cytochrome c, somatic (LOC121026), mRNA.	0.853
CCR1	chemokine (C-C motif) receptor 1	0.840
PSAP	prosaposin (variant Gaucher disease and variant metachromatic leukodystrophy)	0.637
PFKFB4	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 4	0.877
TPM1	tropomyosin 1 (alpha)	0.834
C3orf1	chromosome 3 open reading frame 1	0.842
LEREPO4	likely ortholog of mouse immediate early response, erythropoietin 4	0.839
IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	0.516
CIDEB	cell death-inducing DFFA-like effector b	0.859
TFEC	transcription factor EC	0.830
GSTM5	glutathione S-transferase M5	0.896
MRPS30	mitochondrial ribosomal protein S30	0.810
DHRS8	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 8	0.832
THBS4	thrombospondin 4	0.777
IL1R2	interleukin 1 receptor, type II	0.576
CTSG	cathepsin G	0.696
C5orf13	chromosome 5 open reading frame 13	0.857
SLC7A7	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 7	0.837
LY86	lymphocyte antigen 86	0.797
ITGB8	integrin, beta 8	0.851
HEXB	hexosaminidase B (beta polypeptide)	0.883
TEGT	testis enhanced gene transcript (BAX inhibitor 1)	0.813
IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	0.743
C13orf11	chromosome 13 open reading frame 11	0.843
ARHA	ras homolog gene family, member A	0.840
PBF	papillomavirus regulatory factor PRF-1	0.850
TGFBI	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa	0.829
STX6	syntaxin 6	0.868
LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin 1)	0.767

Annexe 2

*Phenotypically and Functionally Distinct CD8⁺
Lymphocyte Populations in Long-Term Drug-Free
Tolerance and Chronic Rejection in Human
Kidney Graft Recipients.*

Dominique Baeten, Stéphanie Louis, Christophe Braud, Cécile Braudeau, Caroline Ballet, Frédérique Moizant, Annaïck Pallier, Magali Giral, Sophie Brouard et Jean-Paul Soulillou.

Publié dans *Journal of the American Society of Nephrology*, **17**(1): 294-304

Phenotypically and Functionally Distinct CD8⁺ Lymphocyte Populations in Long-Term Drug-Free Tolerance and Chronic Rejection in Human Kidney Graft Recipients

Dominique Baeten,*[†] Stéphanie Louis,* Christophe Braud,* Cécile Braudeau,*
Caroline Ballet,* Frédéric Moizant,* Annaik Pallier,* Magali Giral,* Sophie Brouard,* and
Jean-Paul Soulillou*

**Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM), Unité 643: "Immunointervention dans les Allo- et Xénotransplantations," and Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation (ITERT), Nantes, France; and* [†]*Department of Clinical Immunology and Rheumatology, Amsterdam Medical Center, Amsterdam, The Netherlands*

A substantial proportion of long-term kidney graft recipients, including those with a stable renal function in the absence of immunosuppressive therapy, present a skewed T cell receptor (TCR) V β chain usage, essentially in the CD8⁺ subset. This study analyzed in more detail phenotypical and functional alterations of CD8⁺ lymphocytes in drug-free tolerant patients (DF-Tol) compared with recipients with chronic rejection (CR). Phenotyping revealed a significant increase in central memory and a decrease in effector CD8⁺ lymphocytes in DF-Tol *versus* CR. The expression of CD28⁺ and CD27⁺ on these effector cells was significantly decreased in CR. These profiles were stable over time and independent of treatment. Functionally, the CD8⁺CD28⁻ lymphocytes were less sensitive to apoptosis than their CD8⁺CD28⁺ counterparts, without differences in polyclonal proliferation. The CD8⁺CD28⁻ cells did not express GITR and FoxP3 but were characterized by high levels of preformed perforin and granzyme A, pointing toward a cytotoxic rather than a suppressor function. CD8⁺CD28⁻ lymphocytes did not show antigen-specific degranulation when co-cultured with targets that bear donor HLA class I antigens, suggesting that the cytotoxicity is directed either to other determinants of the graft or to nongraft epitopes. Of interest, CD8⁺ cells from DF-Tol displayed the same profile as healthy individuals, indicating an increase in CD8⁺CD28⁻ effector lymphocytes in CR rather than a decrease in DF-Tol. CD8⁺ lymphocytes from stable kidney recipients under conventional maintenance immunosuppression displayed a mixed profile, independent of treatment and time of sampling. Taken collectively, these data show a strong cytotoxicity-associated CD8⁺CD28⁻ signature in CR and suggest a suppression of pathologic cytotoxicity in DF-Tol. Further prospective studies should assess whether serial CD8⁺ phenotyping may help to identify patients who are at risk for CR when immunosuppression is tapered.

J Am Soc Nephrol 17: 294–304, 2006. doi: 10.1681/ASN.2005020178

Drug-free tolerance, defined as long-term maintenance of graft integrity and function without immunosuppression, is a rare event in human kidney transplantation because interruption of immunosuppressive treatment usually leads to acute or chronic graft rejection. Nevertheless, this phenomenon is of unique interest to study the physiologic basis of graft tolerance in humans. On the one hand, long-term drug-free tolerant patients (DF-Tol) represent a unique model to study the extent to which mechanisms of tolerance defined experimentally, such as active suppression by regulatory lymphocytes, ignorance of alloantigens, chimerism, homeostatic

regulation or clonal deletion, are relevant to this human situation (1–4). Most studies in rodents analyzed the induction rather than the maintenance phase of tolerance, and discrepancies with the human situation may exist, as exemplified by the role of alloreactive CD8⁺ central memory cells in rejection and tolerance induction (5,6). On the other hand, the characterization of peculiar immunologic profiles in DF-Tol may be clinically important to identify biologic signatures that are associated with graft tolerance. Considering the major medical and economic burden of chronic immunosuppression and that operational tolerance may be more common than expected but could be masked in long-term immunosuppressed patients, the identification of specific biologic signatures of tolerance could open new perspectives for rational rather than empiric minimizing of immunosuppressive drugs in well-selected patients (6–10).

As a proof of concept of the relevance of the DF-Tol model to study human tolerance, we described recently a number of specific immunologic features in these patients. First, DF-Tol

Received February 16, 2005. Accepted October 17, 2005.

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

S.B. and J.-P.S. contributed equally to this work.

Address correspondence to: Prof. Dr. Jean Paul Soulillou, INSERM U643, CHU Hôtel-Dieu, 30 Ed Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France. Phone: +33-2-240-08-74-70; Fax: +33-2-240-08-74-77; E-mail: jean-paul.soulillou@univ-nantes.fr

were characterized by a maintenance of CD25^{high}CD4⁺ lymphocytes that express regulation-associated molecules such as FoxP3, CTLA4, GITR, CCR4, and CD103, in comparison with patients with chronic rejection of their allograft (CR) (Louis *et al.*, unpublished observations). Second, peripheral blood T cells of a substantial proportion of DF-Tol and CR displayed a skewed T cell receptor (TCR) V β chain usage, which was observed mainly in the CD8⁺ subset (11). The T cells with skewed V β profiles from DF-Tol were characterized by a decrease in cytokine transcripts (IL-2, IL-13, and IFN- γ) compared with CR, suggesting a state of hyporesponsiveness or anergy (11).

On the basis of the data of this latter study, we performed here a systematic analysis of CD8 phenotypes in DF-Tol versus CR and compared this with healthy individuals (HI). Our data show that a population of CD8⁺CD28⁻ lymphocytes was dramatically increased in CR. This subpopulation was characterized further with regard to apoptosis and proliferation, regulatory markers such as GITR and FoxP3, and general as well as donor-specific cytotoxicity. Finally, we evaluated the presence of this CD8⁺ population in kidney graft recipients with stable graft function under standard maintenance immunosuppressive therapy (Sta).

Materials and Methods

Patients

A total of 38 individuals were included in the study. The protocol was approved by the University Hospital Ethical Committee and the Committee for the Protection of Patients from Biologic Risks. All patients signed a written informed consent before inclusion.

The study included six DF-Tol. Operational tolerance was clinically defined as stable graft function and absence of clinical or biologic signs of chronic rejection (blood creatinemia <150 mmol/L, proteinuria <1.5 g/24 h) for at least 2 yr (median 8 yr; range 2 to 12 yr) after complete interruption of all immunosuppressive therapy. Immunosuppressive treatment was stopped because of lymphoma in two patients and noncompliance in the four others (11). These normally functioning kidneys were not biopsied for ethical reasons. The CR group included 14 kidney graft recipients with a degradation of the renal function (blood creatinemia >150 mmol/L) and histologically proven chronic rejection lesions. As control groups, we included six HI and 12 kidney

graft recipients with stable renal function under Sta. Demographic and clinical data are shown in Table 1.

Phenotypic Characterization by Flow Cytometry

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated using a Ficoll gradient (Eurobio, Les Ulis, France) and incubated for 30 min with the following fluochrome-labeled mAb for phenotypic characterization: Anti-CD45RA-FITC, anti-CD57-FITC, anti-KIR-NKAT2-FITC, anti-CD94-FITC, anti-CD28-PE or anti-CD28-APC, anti-CD27-PE, anti-CD69-PE, anti-GITR-PE, anti-CCR7-PC7, anti-CD3-Cy-Chrome or CD3-PC7, anti-CD8-PE-Cy5.5 or anti-CD8-APC, anti-CD95-APC, and anti-NKG2D-APC (all mAb from BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA). For the assessment of intracellular proteins, PBMC were permeabilized with saponin 1% for 15 min, and intracellular perforin and granzyme A were stained with PE-labeled mAb (BD Biosciences Pharmingen). The labeled PBMC were washed, fixed in PBS/formaldehyde 1%, and analyzed by four-color flow cytometry (FACSCalibur, Becton Dickinson, San Diego, CA) using Cellquest Pro software (Becton Dickinson). T lymphocytes were identified using a forward and side scatter gate for lymphocytes in combination with a gate on CD3⁺ cells. Nonspecific staining and autofluorescence were determined by isotype-matched control mAb. Results are expressed as mean percentage of positive cells or as mean fluorescence intensity.

Detection of Apoptosis

For *in vitro* induction of apoptosis, PBMC were cultured for 18 h at 37°C in serum-free RPMI 1640 medium (Sigma, St. Louis, MO). As negative controls, PBMC were cultured in RPMI with 10% heat-inactivated FCS. After 18 h, PBMC were labeled with phenotypic markers as described and with annexin V-APC (BD Biosciences Pharmingen). The percentage of annexin V-positive cells was measured by flow cytometry after exclusion of dead cells by propidium iodide labeling.

CFSE Proliferation Assay

PBMC were stained with 1 μ M of carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) for 3 min, washed extensively, and adjusted to 5×10^5 cells/ml in RPMI 1640 with 10% FCS. CFSE-labeled PBMC were stimulated with 1 μ g/ml plate-bound anti-CD3 antibody (Orthoclone OKT3; Janssen-Cilag, Germany) with or without 100 U/ml IL-2 (Proleukin; Chiron Corp., Emeryville, CA). After 72 h, cells were stained for 15 min with anti-CD8-PE-Cy5.5 and anti-CD28-APC antibodies. Pro-

Table 1. Demographic and clinical data of the patient cohorts^a

	DF-Tol (n = 6)	CR (n = 14)	HI (n = 6)	Sta (n = 12)
Gender, male/female	5/1	7/7	4/2	8/4
Median age, yr (range)	57 (37 to 73)	53 (35 to 72)	53 (33 to 62)	53 (30 to 76)
Median yr after transplantation (range)	14 (5 to 30)	7 (2 to 6)	NA	12 (4 to 24)
Corticosteroids	0/6	6/14	0/6	6/12
Azathioprine	0/6	1/14	0/6	6/12
Calcineurin inhibitor	0/6	11/14	0/6	5/12
Mycophenolate mofetil	0/6	6/14	0/6	5/12

^aDF-Tol, kidney graft recipients who were operationally tolerant after interruption of immunosuppressive therapy (drug-free tolerant); CR, patients with chronic graft rejection despite immunosuppressive treatment; HI, healthy individuals; Sta, kidney recipients with stable renal function while treated with standard immunosuppressive maintenance regimen; NA, not applicable. Calcineurin inhibitors comprise cyclosporin A and tacrolimus.

liferation was analyzed by measuring the CFSE signal on gated CD8⁺CD28⁺ and CD8⁺CD28⁻ cells by flow cytometry.

Real-Time PCR

CD8⁺ T cells from six CR were negatively isolated by magnetic bead sorting (Milteny Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). Then, CD8⁺CD27⁺ and CD8⁺CD27⁻ subsets were separated by a positive magnetic selection (Milteny Biotec). Because CD27 and CD28 expression correlated perfectly on CD8⁺ T lymphocytes, anti-CD27 rather than anti-CD28 beads were used to avoid cell activation. The sorted CD8⁺CD27⁺ and CD8⁺CD27⁻ populations contained >90% CD8⁺CD28⁺ and CD8⁺CD28⁻ lymphocytes, respectively, as assessed by flow cytometry. Purified cells were frozen in Trizol reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) for RNA extraction according to the manufacturer's instructions. Total mRNA was reverse-transcribed using a cDNA synthesis kit (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN). Real-time quantitative PCR was performed using labeled TaqMan probes specific of FoxP3 and normalized against the hypoxanthine phosphoribosyl transferase-1 (HPRT) transcript level, as described previously (11).

Cytotoxicity-Associated Degranulation Assay

CD8⁺ lymphocytes of seven CR were assessed for antigen-specific degranulation by the CD107 mobilization assay, as described previously (12,13). Because PBMC of the kidney graft donors were not available several years after transplantation, we collected from healthy blood donors surrogate PBMC that were matched for the HLA class I molecules of the kidney graft donors. Recipient PBMC from CR were incubated for 5 h either with irradiated surrogate PBMC at a 1:1 ratio or with a pool of common viral peptides at 10 µg/ml (gift of J.-G. Guillet, Institut Pasteur, Paris, France) in RPMI medium with 10% human serum and 2 µM monensin (Sigma-Aldrich). Unstimulated recipient PBMC were used as negative control, whereas plate-bound anti-CD3 antibody or phytohemagglutinin stimulation was used as positive control. Degranulation of CD8⁺CD28⁻ lymphocytes was assessed by flow cytometric analysis with a mix of anti-CD107a-FITC and anti-CD107b-FITC antibodies (BD Biosciences Pharmingen).

Statistical Analyses

The Mann-Whitney *U* test (for unpaired samples) and the Wilcoxon test (for paired samples) were used to assess differences between groups. Correlations were calculated with the Spearman's ρ rank correlation test. $P < 0.05$ was considered as statistically significant. Classification of Sta according to their CD8⁺ phenotype was performed by Predictive Analysis of Microarray data software (14).

Results

Increase of CD8⁺CD28⁻ Effector Lymphocytes in CR

Peripheral blood CD8⁺ T lymphocytes from DF-Tol and age-matched CR were analyzed for the surface expression of CD45RA and CCR7 to distinguish naive (CD45RA⁺CCR7⁺), effector (CD45RA⁺CCR7⁻), central memory (CD45RA⁻CCR7⁺), and effector memory (CD45RA⁻CCR7⁻) CD8⁺ lymphocytes (15,16). As shown in Table 2, there was a significant increase in central memory ($P = 0.032$) and decrease in effector ($P = 0.048$) CD8⁺ lymphocytes in DF-Tol versus CR. Of interest, the percentage of CD45RA⁺CCR7⁻ effector CD8⁺ lymphocytes in age-matched HI was similar to DF-Tol but significantly lower than in CR ($P = 0.048$), indicating that these differences correspond to an increase in CD8⁺ effectors in CR rather than a decrease in DF-Tol.

Effector as well as effector memory CD8⁺ cells can be subdivided further according to the loss of surface expression of CD28 and CD27 during terminal differentiation (15). As shown in Table 2, the percentage of CD28⁺ ($P = 0.040$) and CD27⁺ ($P = 0.018$) CD8⁺ effector lymphocytes was significantly higher in DF-Tol than in CR. A similar difference in CD28 ($P = 0.002$) and CD27 ($P = 0.002$) expression was observed in the effector memory subset. This was also reflected by a significantly higher expression of both CD28 ($P = 0.001$) and CD27 ($P = 0.006$) on the global CD8⁺ population, with a high correlation between both markers ($r = 0.91$, $P < 0.001$; Figure 1). Analysis of age-matched HI revealed that the expression of CD28 and CD27 on the different CD8⁺ lymphocyte subsets was similar in

Table 2. Phenotypic analysis of CD8⁺ T lymphocytes in DF-Tol, CR, and age-matched HI^a

	DF-Tol (n = 6; %)	CR (n = 14; %)	HI (n = 6; %)
CD8 ⁺			
CD45RA ⁺ CCR7 ⁺	33.9 ± 19.5	24.4 ± 11.7	26.0 ± 14.1
CD45RA ⁻ CCR7 ⁺	19.6 ± 7.6 ^b	11.7 ± 5.7 ^b	13.6 ± 6.4
CD45RA ⁻ CCR7 ⁻	25.1 ± 13.9	31.3 ± 11.4	35.9 ± 13.8
CD45RA ⁺ CCR7 ⁻	21.4 ± 9.6 ^b	32.7 ± 11.3 ^{bc}	24.8 ± 3.8 ^c
CD8 ⁺ CD45RA ⁻ CCR7 ⁻			
CD27	77.1 ± 14.7 ^b	31.8 ± 16.9 ^{bc}	82.5 ± 14.1 ^c
CD28	78.3 ± 3.4 ^b	23.6 ± 15.7 ^{bc}	77.1 ± 14.4 ^c
CD8 ⁺ CD45RA ⁺ CCR7 ⁻			
CD27	44.0 ± 15.0 ^b	17.6 ± 14.1 ^{bc}	45.7 ± 3.8 ^c
CD28	30.8 ± 3.7 ^b	10.9 ± 12.6 ^{bc}	29.3 ± 4.5 ^c

^aThe percentage of naive (CD45RA⁺CCR7⁺), central memory (CD45RA⁻CCR7⁺), effector memory (CD45RA⁻CCR7⁻), and effector (CD45RA⁺CCR7⁻) cells was analyzed, as well as the expression of CD28 and CD27 on the effector and effector memory subsets. Results are expressed as mean ± SD percentage of positive cells. There were no significant differences between DF-Tol and HI.

^b $P < 0.05$ between DF-Tol and CR.

^c $P < 0.05$ between CR and HI.

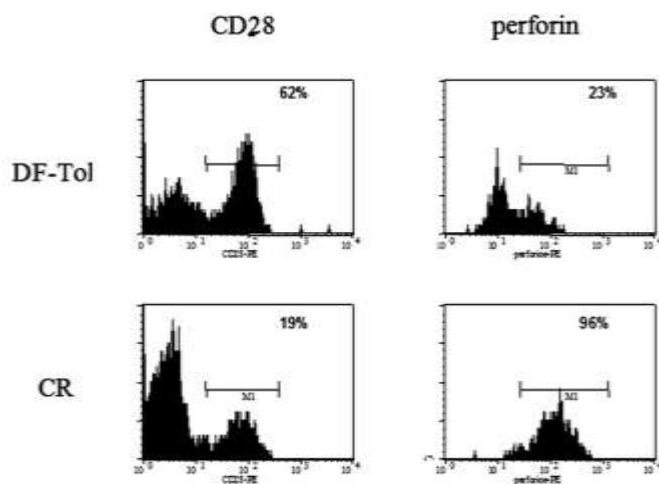


Figure 1. Analysis of the expression of CD28 on the cell surface and of intracellular perforin in peripheral blood CD8⁺ lymphocytes in drug-free tolerant kidney graft recipients (DF-Tol) and in patients with chronic rejection of the graft (CR). Representative histograms show the increased expression of CD28 and the decrease of intracellular perforin in DF-Tol *versus* CR.

DF-Tol and HI but significantly decreased in CR (Table 2). Taken together, these data indicate an increase in CD8⁺CD28⁻ effector lymphocytes in CR, whereas DF-Tol exhibited a pattern close to that of HI.

Increase of Effector CD8⁺CD28⁻ Lymphocytes in CR Is Stable over Time and Independent of Treatment

To investigate whether the increase of CD8⁺CD28⁻ lymphocytes was a stable phenomenon related directly to CR, paired PBMC that were obtained in five patients at two different time points with an interval of 7.4 (2 to 16) months were analyzed. There was no significant variation of the percentage of CD45RA⁺CCR7⁻CD8⁺ effector cells (35.5 ± 8.5 *versus* 29.4 ± 7.3%) or of the expression of CD28 (19.2 ± 10.7 *versus* 17.5 ± 10.7%) and CD27 (32.3 ± 13.8 *versus* 34.4 ± 19.7%), indicating that the observed CD8 profile was stable over time (Figure 2A).

Considering the heterogeneity of treatment in CR (Table 1), we next analyzed the potential effect of treatment on these profiles. Comparison of CR who were treated or not with corticosteroids, calcineurin inhibitors (CNI), or mycophenolate mofetil did not show a significant difference for the percentage of CD45RA⁺CCR7⁻CD8⁺ effector cells (37.4 ± 12.6 *versus* 29.2 ± 9.4%, 30.4 ± 11.3 *versus* 41.1 ± 6.8%, and 37.1 ± 10.9 *versus* 29.4 ± 11.0%, respectively), CD28 expression (15.1 ± 9.7 *versus* 24.0 ± 14.3%, 21.5 ± 14.0 *versus* 15.4 ± 13.1%, and 18.4 ± 10.9 *versus* 21.5 ± 15.9%, respectively), or CD27 expression (26.8 ± 13.1 *versus* 36.2 ± 18.4%, 32.6 ± 16.8 *versus* 26.7 ± 14.4%, and 27.5 ± 12.9 *versus* 33.1 ± 17.7%, respectively; Figure 2, B through D). Accordingly, after exclusion of corticosteroid-, CNI-, or mycophenolate mofetil-treated CR, there was still a significant decrease of CD28 expression ($P = 0.001$, $P < 0.001$,

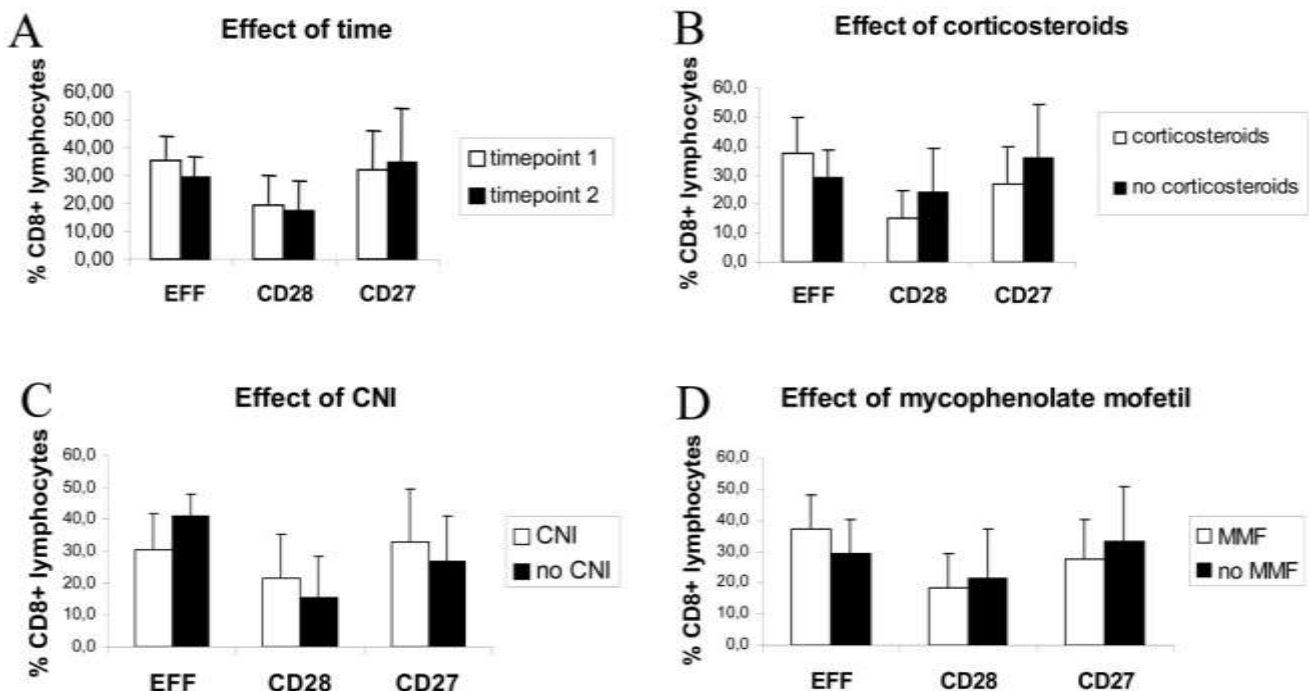


Figure 2. Stability of the effector CD8⁺CD28⁻CD27⁻ lymphocyte population in CR. Peripheral blood CD8⁺ lymphocytes were analyzed by flow cytometry for the percentage of CD45RA⁺CCR7⁻ effector (EFF) cells, CD28⁺ cells, and CD27⁺ cells. Comparisons were performed between two different time points in five patients (A). In addition, patients with ($n = 6$) and without ($n = 8$) corticosteroid treatment (B), patients with ($n = 11$) and without ($n = 3$) calcineurin inhibitor (CNI) treatment (C), and patients with ($n = 6$) and without ($n = 8$) mycophenolate mofetil treatment (D) were compared. Data are represented as mean ± SD. None of the comparisons was statistically significant.

and $P = 0.001$, respectively) and of CD27 expression ($P = 0.032$, $P < 0.001$, and $P = 0.012$, respectively) in CR versus DF-Tol with a similar trend toward increase of CD8⁺ effector lymphocytes.

Alterations of Apoptosis but not Proliferation of CD8⁺CD28⁻ Lymphocytes

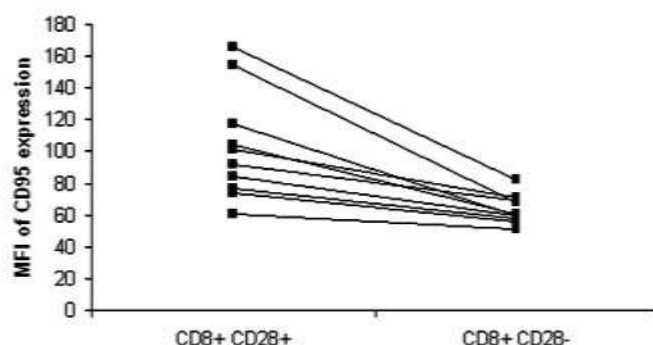
To characterize further the increase of CD8⁺CD28⁻ effector lymphocytes in CR, we studied the sensitivity to apoptosis and the proliferative capacities of these cells in comparison with their CD8⁺CD28⁺ counterparts. There was no significant difference in Fas expression on the CD8⁺CD28⁻ lymphocytes in DF-Tol versus CR (data not shown). However, although nearly all CD8⁺CD28⁻ cells expressed Fas (percentage of positive cells), the expression levels (mean fluorescence intensity) were significantly lower than on their paired CD8⁺CD28⁺ counterparts (63.3 ± 9.0 versus 103.3 ± 34.2 ; $P = 0.002$; Figure 3A). Accordingly, the CD8⁺CD28⁻ subset was less sensitive to apoptosis induced by serum deprivation than the paired CD8⁺CD28⁺ cells (15.5 ± 5.2 versus $31.1 \pm 10.0\%$; $P = 0.002$; Figure 3B).

As to the proliferative capacity, there was no significant difference between the CD8⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁺ T subsets with regard to the percentage of cells that proliferated upon anti-CD3 stimulation (46.1 ± 17.8 and $52.1 \pm 23.5\%$, respectively; Figure 3C). Addition of IL-2 did not further increase the proliferation of either subset. Also, the degree of proliferation assessed by the number of divisions per cell was not different between both subsets (Figure 3C). Finally, no significant difference was observed in proliferative capacity between DF-Tol and CR for these two populations (data not shown).

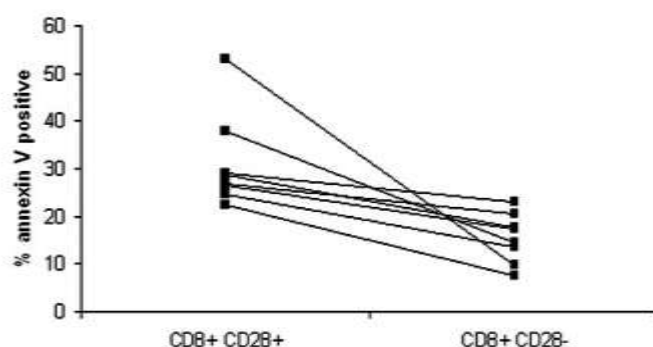
CD8⁺CD28⁻ Lymphocytes in CR Have No Characteristics of Suppressor T Cells

To explore the functional features of the CD8⁺CD28⁻ lymphocytes in CR, we first compared these cells with the recently described CD8⁺CD28⁻ suppressor lymphocytes (17-22). As indicated previously, the CD8⁺CD28⁻ cells that were detected in CR were CD45RA⁺CCR7⁻CD27⁻, which contrasted with the described phenotype of the suppressor lymphocytes (CD45RO⁺CD62L⁺CD27⁺) (21,22). Flow cytometric analysis of GITR, which is expressed on suppressor cells (19,21), revealed low expression on CD8⁺ cells of CR ($2.8 \pm 2.4\%$) compared with DF-Tol ($12.1 \pm 6.2\%$; $P = 0.011$) and HI (16.0 ± 15.5 ; $P = 0.033$; Figure 4A). Accordingly, real-time PCR showed low levels of FoxP3 transcripts in CD8⁺ lymphocytes from CR compared with DF-Tol ($P = 0.006$) and HI (NS; Figure 4B). Moreover, real-time PCR on purified lymphocyte subsets in CR showed that FoxP3 expression was very low in both the CD8⁺CD28⁺CD27⁺ and CD8⁺CD28⁻CD27⁻ cells (Figure 4C). Taken together, these data clearly distinguish the CD8⁺CD28⁻ population that was detected *in vivo* in CR from the previously described CD8⁺CD28⁻ suppressor lymphocytes that were obtained after several rounds of *in vitro* stimulation.

A Fas expression of CD8⁺ lymphocyte subsets



B Apoptosis of CD8⁺ lymphocyte subsets



C Proliferation of CD8⁺ lymphocyte subsets

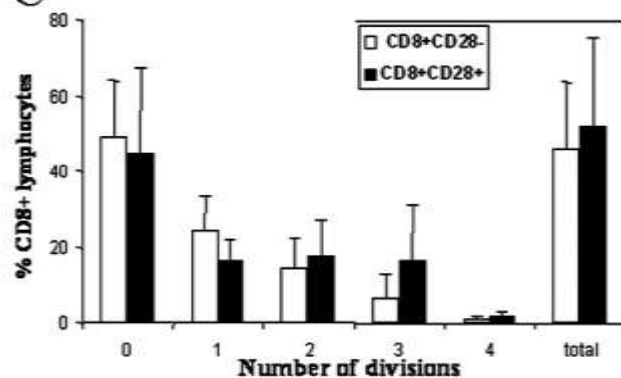


Figure 3. Analysis of apoptosis and proliferation of CD8⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁺ peripheral blood lymphocytes. Expression of Fas (CD95), assessed as mean fluorescence intensity (MFI) by flow cytometry, was significantly lower in CD8⁺CD28⁻ lymphocytes than in the paired CD8⁺CD28⁺ counterparts ($P = 0.002$; A). Accordingly, these cells were less sensitive to apoptosis upon serum deprivation, as assessed by annexin V staining ($P = 0.002$; B). In contrast, there were no significant differences for the total number of cells that proliferated or for the number of divisions per cell upon anti-CD3 stimulation of CD8⁺CD28⁺ and CD8⁺CD28⁻ lymphocytes, as assessed by CFSE-based flow cytometry (C).

CD8⁺CD28⁻ Lymphocytes Exhibit Markers of Differentiated Cytotoxic Cells

Considering that the CD8⁺CD28⁻ lymphocytes in CR were different from suppressor cells and belonged to the effector

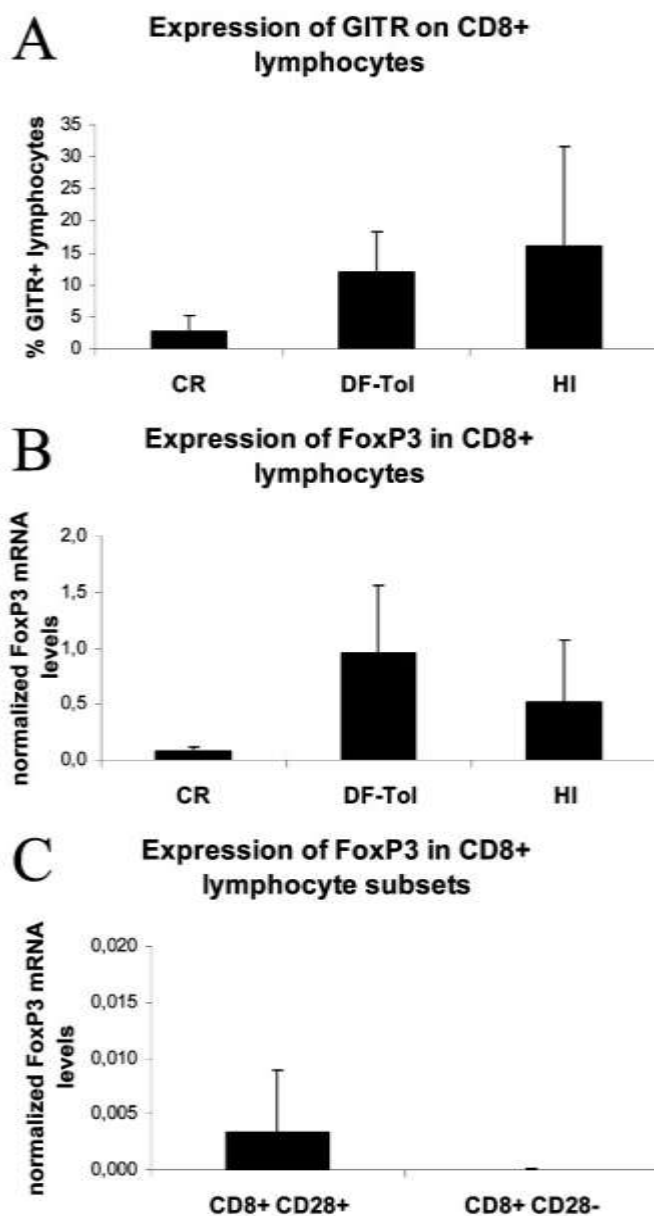


Figure 4. Analysis of the expression of the regulatory markers GITR and FoxP3 on CD8⁺ peripheral blood lymphocytes in CR in comparison with DF-Tol and healthy individuals (HI). Expression of GITR as assessed by flow cytometry was significantly lower on CD8⁺ lymphocytes of CR compared with DF-Tol ($P = 0.011$) and HI ($P = 0.033$; A). Similarly, real-time PCR indicated that the FoxP3 mRNA levels were decreased in CD8⁺ cells from CR compared with DF-Tol ($P = 0.006$) and HI (NS; B). Moreover, real-time PCR analysis of purified lymphocyte subsets of CR showed that FoxP3 expression was very low in both the CD8⁺CD28⁺(CD27⁺) and CD8⁺CD28⁻(CD27⁻) cells (C). Data are represented as mean \pm SD.

subset, we next analyzed the presence of markers of cytotoxicity. There was a highly significant increase of the number of CD8⁺ lymphocytes that were positive for intracellular perforin (85.6 ± 16.8 versus $30.1 \pm 5.3\%$; $P < 0.001$) and for granzyme A (32.7 ± 15.7 versus $6.8 \pm 8.4\%$; $P = 0.010$) in CR versus DF-Tol

(Figure 1). However, there was no difference for perforin or granzyme A between HI (30.1 ± 10.1 and $5.3 \pm 7.2\%$, respectively) and DF-Tol. Perforin and granzyme A correlated strongly ($r = 0.723$, $P = 0.009$) and both markers correlated inversely with CD28 expression ($r = -0.947$, $P < 0.001$; and $r = -0.745$, $P = 0.007$, respectively). Also the surface expression of CD57 was significantly increased on the CD28⁻ subset ($67.0 \pm 20.4\%$) compared with the CD28⁺ counterpart ($22.2 \pm 10.6\%$; $P = 0.031$; Figure 5). Whereas a similar difference in CD57 expression was found between both subsets in DF-Tol (70.9 ± 12.7 versus $26.2 \pm 16.5\%$; $P = 0.046$), there was no difference for the expression of these cytotoxicity-associated markers on the CD8⁺CD28⁻ lymphocyte subset between CR and DF-Tol, indicating that the number of these cells rather than their cytotoxicity-associated profile differentiated both situations (Figure 5). Finally, the analysis of the expression NK-cell receptors (KIR-NKAT2, CD94, and NKG2D) on CD8⁺ lymphocytes showed no difference between DF-Tol and CR or between the CD8⁺CD28⁻ and CD8⁺CD28⁺ subsets in both situations (Figure 5).

To identify the cytotoxic targets of the CD8⁺CD28⁻ lymphocytes in CR, we next performed a CD107 mobilization assay to assess donor antigen-specific degranulation. Unstimulated CD8⁺CD28⁻ cells showed low levels of degranulation ($6.0 \pm 2.0\%$), which were significantly increased upon nonspecific stimulation with anti-CD3 antibody ($14.5 \pm 3.9\%$) or phytohemagglutinin ($37.9 \pm 21.4\%$). Incubation with surrogate donor cells, which

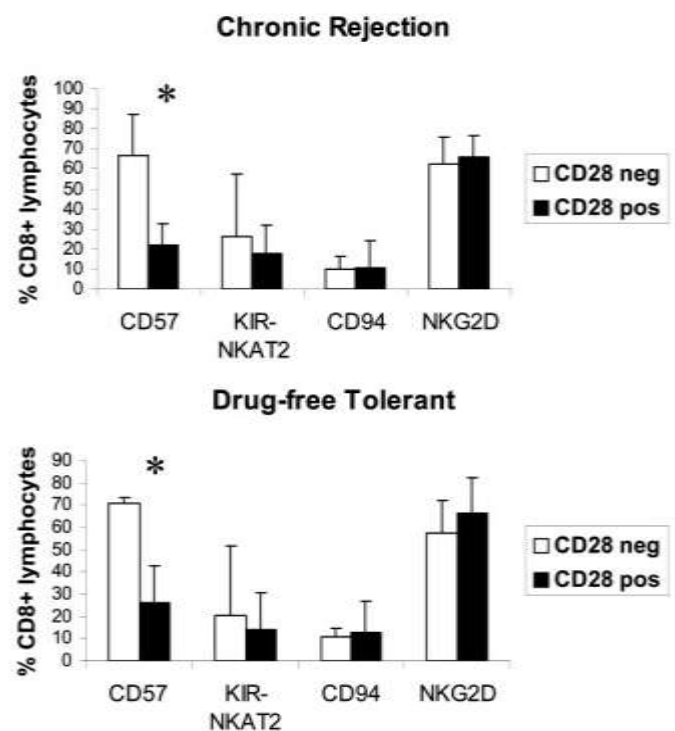


Figure 5. Flow cytometric assessment of the expression of markers associated with cytotoxicity and NK-cell receptors on the cell surface of peripheral blood CD8⁺ lymphocytes in CR and in DF-Tol. The CD8⁺CD28⁻ subset was compared with the CD8⁺CD28⁺ subset. Data are represented as mean \pm SD. * $P < 0.05$.

were matched for HLA class I with the original kidney graft donor, did not increase degranulation ($4.9 \pm 2.5\%$). Similarly, stimulation with a pool of common viral peptides did not significantly increase the degranulation of $CD8^+CD28^-$ T lymphocytes ($8.2 \pm 3.9\%$). Taken together, these data do not provide functional evidence that the targets of this cell population are donor-specific HLA class I molecules or common viral antigens.

Sta Recipients Display a Mixed $CD8^+$ Lymphocyte Profile

Finally, we analyzed whether the described $CD8^+$ lymphocyte profile that was associated with the chronic rejection process could be observed also in immunosuppressed kidney graft recipients without clinical or biologic signs of rejection. The $CD8^+$ lymphocytes of five patients showed a similar $CD28$, $CD27$, and granzyme A expression as DF-Tol, whereas two had an intermediate profile and five had similar expression levels as CR (Figure 6, A through D). As to the percentage of effector $CD45RA^+CR7^-CD8^+$ cells, seven Sta recipients had similar numbers as CR, whereas five had low numbers such as in DF-Tol. Similar to our observations in CR, these profiles were not dependent on the treatment with CNI (Figure 6E) or other immunosuppressive drugs (data not shown), and a kinetic analysis in five patients at a median of an 18 mo interval (16 to 24 mo) showed that these profiles were stable over time (Figure 6F). To analyze the Sta profiles in more detail, we set up a model using Predictive Analysis of Microarray data software based on the $CD8^+$ lymphocyte phenotypes in DF-Tol versus CR. Cross-validation of this model using the DF-Tol and CR profiles classified correctly 13 of the 14 CR samples and five of the six DF-Tol samples (Figure 6G). Applying this model to the Sta patient cohort, the $CD8^+$ lymphocyte phenotype of seven patients resembled CR, whereas the others had a profile more closely related to DF-Tol (Figure 6H).

Discussion

Considering the major burden of immunosuppression in organ transplantation and the discrepancies between tolerance in rodents and humans, spontaneous drug-free tolerance in humans is a rare but unique model to study clinically relevant immune phenomena related to graft integrity and survival. In this context, we analyzed alterations of the $CD8^+$ lymphocytes in kidney graft recipients who tolerated their graft for several years without any immunosuppressive or corticosteroid treatment. The main finding is the reduced numbers of circulating $CD8^+CD28^-$ effector lymphocytes compared with patients with chronic graft rejection. However, the DF-Tol had a similar number of $CD8^+CD28^-$ effector lymphocytes as HI, indicating an abnormal increase of this cell population in CR rather than a primary alteration in DF-Tol. Because the expression of $CD28$ on $CD8^+$ cells decreases with age (23), it is important to notice that the study groups were age matched. A bias caused by immunosuppressive therapy is also unlikely because we found no effect of the different treatment regimens on the $CD8^+$ lymphocyte profiles in CR. Finally, the increase in $CD8^+CD28^-$ effector cells was stable over time in CR.

Several mechanisms can lead to an increase of $CD8^+CD28^-$

lymphocytes. During aging, effector $CD8^+$ lymphocytes can lose the surface expression of $CD28$ by replicative senescence as a result of extensive homeostatic proliferation (16,23). A distinct mechanism is observed after TCR-mediated activation, which is associated mostly with a decreased susceptibility to undergo apoptosis (24). In this respect, $CD8^+CD28^-$ cell populations can appear as a consequence of extensive rounds of antigen-induced division such as in chronic infections or malignancies (25–27) and, in contrast with senescent cells, are characterized by increased effector functions rather than functional anergy (13,28,29). Investigation of the sensitivity to apoptosis and the proliferative capacity of the $CD8^+CD28^-$ lymphocytes in CR indicated that the loss of $CD28$ was associated with a decreased susceptibility to apoptosis, which related both to the Fas-mediated pathway and to the sensitivity to growth factor withdrawal (30–32). However, in contrast with replicative senescence, which is characterized by an irreversible nondividing state (30,33,34), the $CD8^+CD28^-$ lymphocytes in CR proliferated at a similar level as their $CD28^+$ counterparts upon $CD3$ stimulation. Because $CD28$ is required for IL-2 production and subsequent sustained proliferation, it is likely that both in our assay and *in vivo* IL-2 could be provided in a paracrine manner by $CD28^+$ lymphocytes rather than in an autocrine manner by the $CD8^+CD28^-$ lymphocytes themselves (35). The impaired sensitivity to apoptosis and the maintained proliferative potential of the $CD8^+CD28^-$ lymphocytes may influence the balance between clonal expansion and contraction and thereby contribute to the increase of this cell population in CR.

A subset of $CD8^+CD28^-$ cells have been described recently as suppressor lymphocytes, which, in contrast to our study, were obtained by multiple rounds of stimulation *in vitro* (17,18). These cells were described to express GITR and FoxP3 and to suppress $CD4$ responses by tolerization of antigen-presenting cells through an upregulation of the inhibitory molecules ILT3 and ILT4 (19,20). Whereas animal models support an *in vivo* function for these suppressor lymphocytes (36,37), their natural presence, exact phenotype, and suppressive function in humans still are a matter of debate (22). The suppressor $CD8^+CD28^-$ lymphocytes seem to be central memory cells ($CD62L^+CD45RO^+$) that co-express $CD27$ (21,22), in contrast with the cell population in CR, which are $CD27^-$ effector cells ($CCR7^-CD45RA^+$). Moreover, the regulatory-associated markers GITR and FoxP3, which were described on the suppressor cells (19,21), were not expressed on $CD8^+$ lymphocytes in CR, thereby clearly indicating that the $CD8^+CD28^-$ cells that we described here are different from suppressor lymphocytes.

In contrast to a suppressor function and in agreement with the association between loss of $CD28$ and marked cytotoxicity of $CD8^+$ effector cells (13,28,29), the $CD8^+CD28^-$ effector population in CR was characterized by high levels of perforin, granzyme A, and $CD57$. Of interest, however, we found no differences for these markers in $CD8^+CD28^-$ effector lymphocytes between DF-Tol and CR, indicating a quantitative rather than a qualitative difference between both situations. An important question raised by this observation is the target of these cells and the potential functional consequences for the graft. On the basis of reports in animal models (38–41), it would be

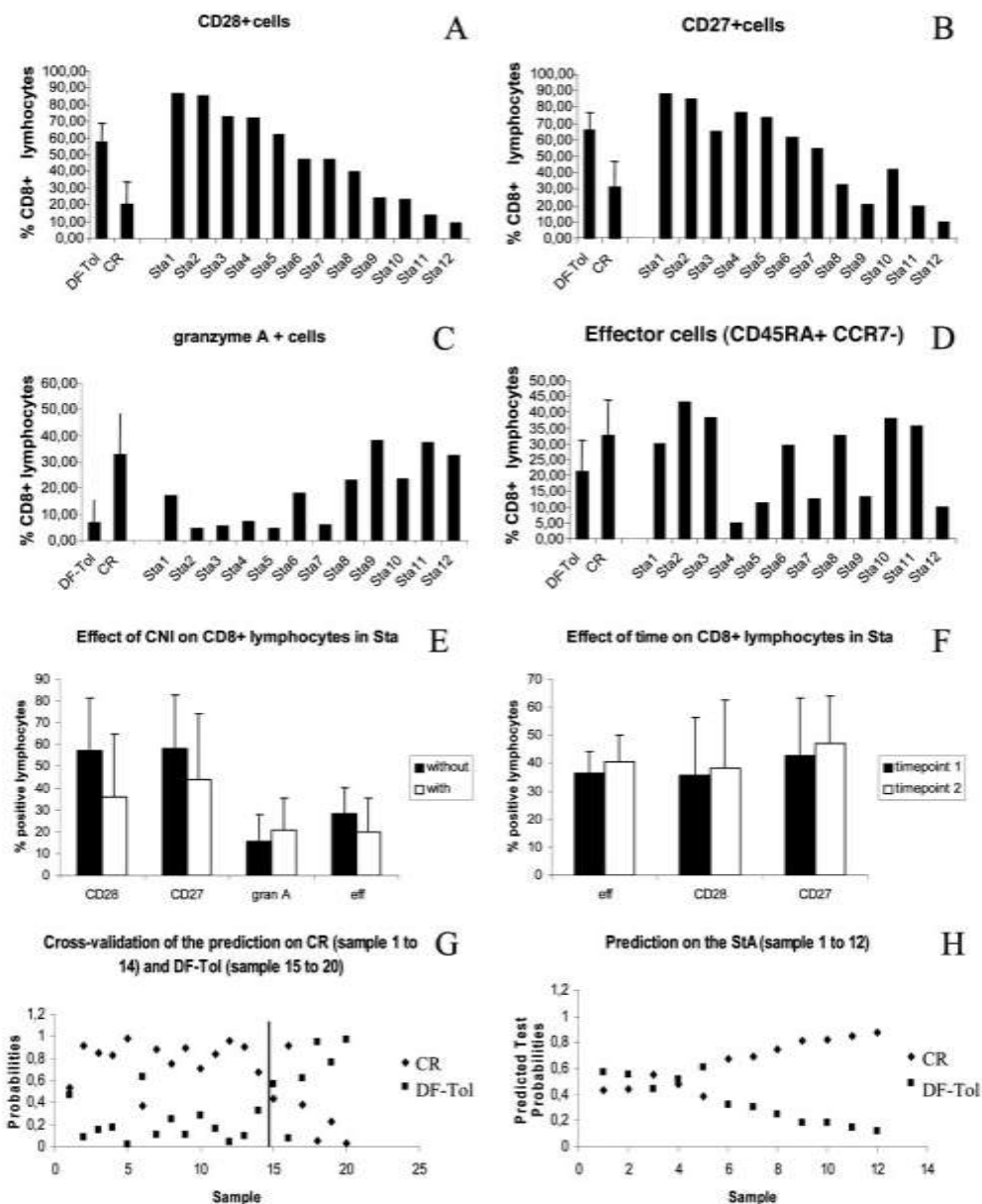


Figure 6. CD8⁺ lymphocyte profiles as assessed by flow cytometry on peripheral blood lymphocytes of 12 kidney graft recipients with stable renal function under immunosuppressive therapy (Sta). The percentage of CD8⁺ lymphocytes that expressed CD28 (A), CD27 (B), and intracellular granzyme A (C) and the number of effector CD45RA⁺CCR7⁻CD8⁺ lymphocytes (D) are shown. For comparison, the mean \pm SD is depicted for DF-Tol ($n = 6$) and CR ($n = 14$). Similar to the data in CR, there was no influence of treatment with CNIs on the CD8⁺ T lymphocyte profiles in Sta (E), and kinetic analysis of five patients at an interval of 18 mo showed that these profiles were stable over time (F; data are represented as mean \pm SD). Using the CD8⁺ lymphocyte phenotypes from CR and DF-Tol, a model was set up for classification of individual samples. Cross-validation indicated that 13 of 14 CR and five of six DF-Tol were classified correctly (G). When applied to samples of Sta patients, the model classified the CD8⁺ lymphocyte profiles of seven of 12 as CR, whereas five showed an intermediate profile (H).

tempting to speculate that these cells are induced by donor antigens by either a direct or an indirect pathway of allorecognition. Using donor HLA class I-matched cells as surrogate targets, however, our attempt to provide functional evidence that the described CD8⁺CD28⁻ lymphocyte subset is indeed committed to donor determinants was unsuccessful. Whereas our study is hampered by the lack of original donor cells, future prospective and/or experimental research is needed to address

this in more detail and to evaluate the eventual contribution of other donor determinants. An alternative hypothesis would be that pre-existing cytotoxic CD8⁺ lymphocytes directed against viruses and pathogens cross-react with the graft, as suggested by the fact that heterologous immune memory has been described as a potential to transplantation tolerance (5,6,42,43). Also here, however, we were unable to demonstrate antigen-specific degranulation of CD8⁺CD28⁻ lymphocytes against a

pool of common viral peptides. A third and most interesting possibility that should be explored further is reactivity against self-determinants as suggested by recent experimental evidence (44,45).

Independent of the precise primary target of the CD8⁺CD28⁻ effector cells in CR, the normal expression level of the activating cytotoxic receptor NKG2D, which is not counterbalanced by an increase of MHC class I-binding inhibitory receptors such as CD94/NKG2A and KIR-NKAT2, is compatible with functional cytotoxicity of these cells (46–49). In this context, it is interesting to note that cell-mediated alloimmunity has been demonstrated to contribute to chronic allograft nephropathy in renal transplant recipients (50). Moreover, Li *et al.* (51) indicated recently that operational tolerance in liver transplantation was associated with a decrease of NK cells, a distinct cytotoxic lymphocyte population that was not investigated in this study.

A final important issue is raised by the fact that some of the patients who had stable graft function and were analyzed in our study display a similar CD8⁺ lymphocyte phenotype as CR, whereas others had an intermediate profile. This indicates that the described CD8 profile is strongly but not exclusively associated with active chronic rejection. Because an increase of granzymes and perforin was also reported to precede allograft rejection in rodents as well as humans (52,53), it would be interesting to analyze whether such a CR-like signature in seemingly stable patients may help to identify a poorer prognosis and eventually subsequent rejection. All stable patients who were analyzed in our study, however, maintained a normal graft function for now almost 3 yr of follow-up.

These data also emphasize the complexity of such studies in human subjects. First, the large interindividual variability precludes conclusive statements in cross-sectional studies and requires validation by serial, prospective analyses in which each individual with changes in clinical status can serve as his own control over time. In this context, a gradual increase of a cytotoxic CD8⁺CD28⁻ population over time may be more relevant than an absolute value as such at the individual level. Second, because most of the patients with kidney transplantations remain stable for years under conventional immunosuppression, only large studies over a longer period will be able to relate the described phenotype to poor clinical outcome. An alternative would be a prospective tapering of the immunosuppression in patients with a profile close to DF-Tol, but this is still medically and ethically unacceptable without a clear, coherent, and reliable signature based on a broader panel of immunologic parameters (11). Finally, studies on spontaneous tolerance in kidney transplantation are severely hampered by the extreme rarity of these patients. Our studies have analyzed the largest number of these patients in the current literature, making it difficult to validate these findings in an independent cohort. Performing similar analyses in other types of solid organ transplantation, where tolerance is more frequently observed, such as for liver, therefore may be an interesting alternative (51).

Acknowledgments

D.B. is a senior clinical investigator of the Fund for Scientific Research-Flanders (FWO-Vlaanderen).

We thank Drs. Bignon and Cury (EFS, Nantes, France) for providing the HLA class I matched target cells and Dr. J.-G. Guillet (Cochin Hospital, Paris, France) for providing the viral peptide pool.

References

1. Sakaguchi S: Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunological self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 22: 531–562, 2004
2. Lakkis FG, Arakelov A, Koniczny BT, Inoue Y: Immunologic 'ignorance' of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nat Med* 6: 686–688, 2000
3. Cosimi AB, Sachs DH: Mixed chimerism and transplantation tolerance. *Transplantation* 77: 943–946, 2004
4. Müller J, Mathew JM, Esquenazi V: Toward tolerance to human organ transplants: A few additional corollaries and questions. *Transplantation* 77: 940–942, 2004
5. Adams AB, Williams MA, Jones TR, Shirasugi N, Durham MM, Kaech SM, Wherry EJ, Onami T, Lanier JG, Kokko KE, Pearson TC, Ahmed R, Larsen CP: Heterologous immunity provides a potent barrier to transplantation tolerance. *J Clin Invest* 111: 1887–1895, 2003
6. Adams AB, Pearson TC, Larsen CP: Heterologous immunity: An overlooked barrier to tolerance. *Immunol Rev* 196: 147–160, 2003
7. Heeger PS, Hricik D: Immune monitoring in kidney transplant recipients revisited. *J Am Soc Nephrol* 13: 288–290, 2002
8. Starzl TE, Murase N, Abu-Elmagd K, Gray EA, Shapiro R, Eghtesad B, Corry RJ, Jordan ML, Fontes P, Gayowski T, Bond G, Scantlebury VP, Potdar S, Randhawa P, Wu T, Zeevi A, Nalesnik MA, Woodward J, Marcos A, Trucco M, Demetris AJ, Fung JJ: Tolerogenic immunosuppression for organ transplantation. *Lancet* 361: 1502–1510, 2003
9. Hricik DE, Heeger PS: Minimization of immunosuppression in kidney transplantation. The need for immunomonitoring. *Transplantation* 72[Suppl]: S32–S35, 2001
10. Thomson AW, Mazariegos GV, Reyes J, Dornenberg AD, Bentejewski C, Zahorchak AF, O'Connell PJ, Fung JJ, Jankowska-Gan E, Burlingham WJ, Heeger PS, Zeevi A: Monitoring the patient off immunosuppression. Conceptual framework for a proposed tolerance assay study in liver transplant recipients. *Transplantation* 72[Suppl]: S13–S22, 2001
11. Brouard S, Dupont A, Giral M, Louis S, Lair D, Braudeau C, Degauque N, Moizant F, Pallier A, Ruiz C, Guillet M, Laplaud D, Souillou JP: Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T cell clonal regulation. *Am J Transplant* 5: 330–340, 2005
12. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA: Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 281: 65–78, 2003
13. Wolint P, Betts MR, Koup RA, Oxenius A: Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector

- and memory subsets of CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 199; 925–936, 2004
14. Tibshirani RJ, Hastie TJ, Narasimhan B, Chu G: Diagnosis of multiple cancer types by shrunken centroids of gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 6567–6572, 2002
 15. Hamann D, Roos MTL, van Lier RAW: Faces and phases of human CD8⁺ T-cell development. *Immunol Today* 20: 177–180, 1999
 16. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A: Central memory and effector memory T cell subsets: Function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22: 745–763, 2004
 17. Liu Z, Tugulea S, Cortesini R, Suciu-Foca N: Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC-class I restricted CD8⁺ CD28⁻ T cells. *Int Immunol* 10: 775–783, 1998
 18. Ciubotariu R, Colovai AI, Pennesi G, Liu Z, Smith D, Berlocco P, Cortesini R, Suciu-Foca N: Specific suppression of human CD4⁺ Th cell responses to pig MHC antigens by CD8⁺ CD28⁻ regulatory T cells. *J Immunol* 161: 5193–5202, 1998
 19. Manavalan JS, Kim-Schultze S, Scotto L, Naiyer AJ, Vlad G, Colombo PC, Marboe C, Mancini D, Cortesini R, Suciu-Foca N: Alloantigen specific CD8⁺ CD28⁻ FOXP3 T suppressor cells induce ILT3+ ILT4⁺ tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int Immunol* 16: 1055–1068, 2004
 20. Chang CC, Ciubotariu R, Manavalan JS, Yuan J, Colovai AI, Piazza F, Lederman S, Colonna M, Cortesini R, Dalla-Favera R, Suciu-Foca N: Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: The crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* 3: 237–243, 2002
 21. Scotto L, Naiyer AJ, Galluzzo S, Rossi P, Manavalan JS, Kim-Schulze S, Fang J, Favera RD, Cortesini R, Suciu-Foca N: Overlap between molecular markers expressed by naturally occurring CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells and antigen specific CD4⁺ CD25⁺ and CD8⁺ CD28⁻ T suppressor cells. *Hum Immunol* 65: 1297–1306, 2004
 22. Colovai AI, Mirza M, Vlad G, Wang S, Ho E, Cortesini R, Suciu-Foca N: Regulatory CD8⁺ CD28⁻ T cells in heart transplant recipients. *Hum Immunol* 64: 31–37, 2003
 23. Merino J, Martinez-Gonzalez MA, Rubio M, Inoges S, Sanchez-Ibarrola, Subira ML: Progressive decrease in CD8^{high} + CD28⁺ CD57⁻ cells with ageing. *Clin Exp Immunol* 112: 48–54, 1998
 24. Vallejo AN, Brandes JC, Weyand CM, Goronzy JJ: Modulation of CD28 expression: Distinct regulatory pathways during activation and replicative senescence. *J Immunol* 162: 6572–6579, 1999
 25. Hamann D, Kostense S, Wolthers KC, Otto SA, Baars PA, Miedema F, van Lier R: Evidence that human CD8⁺ CD45RA⁺ CD27⁻ cells are induced by antigen and evolve through extensive rounds of division. *Int Immunol* 11: 1027–1033, 1999
 26. Wills MR, Okecha G, Weekes MP, Gandhi MK, Sissons PJG, Carmichael AJ: Identification of naive or antigen-experienced human CD8⁺ T cells by expression of costimulation and chemokine receptors: Analysis of the human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T cell response. *J Immunol* 168: 5455–5464, 2002
 27. Sze DM, Giesajtis G, Brown RD, Raitakari M, Gibson J, Ho J, Baxter AG, Fazekas de St Groth B, Basten A, Joshua DE: Clonal cytotoxic T cells are expanded in myeloma and reside in the CD8⁺ CD57⁺ CD28⁻ compartment. *Blood* 98: 2817–2827, 2001
 28. Rufer N, Zippelius A, Batard P, Pittet MJ, Kurth I, Corthesy P, Cerottini JC, Leyvraz S, Roosnek E, Nabholz M, Romero P: Ex vivo characterization of human CD8⁺ T subsets with distinctive replicative history and partial effector functions. *Blood* 102: 1779–1787, 2003
 29. Weekes MP, Carmichael AJ, Wills MR, Mynard K, Sissons JG: Human CD28-CD8⁺ T cells contain greatly expanded functional virus-specific memory CTL clones. *J Immunol* 162: 7569–7577, 1999
 30. Spaulding C, Guo W, Effros RB: Resistance to apoptosis in human CD8⁺ T cells that reach replicative senescence after multiple rounds of antigen-specific proliferation. *Exp Gerontol* 34: 633–644, 1999
 31. Schirmer M, Vallejo AN, Weyand CM, Goronzy JJ: Resistance to apoptosis and elevated expression of Bcl-2 in clonally expanded CD4⁺ CD28⁻ T cells from rheumatoid arthritis patients. *J Immunol* 161: 1018–1025, 1998
 32. Vallejo AN, Schirmer M, Weyand CM, Goronzy JJ: Clonality and longevity of CD4⁺ CD8null T cells are associated with defects in the apoptotic pathways. *J Immunol* 165: 6301–6307, 2000
 33. Brenchley JM, Karandir NJ, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, Crotty LE, Casazza JP, Kuruppu J, Migueles SA, Connors M, Roederer M, Douek DC, Koup RA: Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. *Blood* 101: 2711–2720, 2003
 34. Geginat J, Lanzavecchia A, Sallusto F: Proliferation and differentiation potential of human CD8⁺ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood* 101: 4260–4266, 2003
 35. Topp MS, Riddell SR, Akatsuka Y, Jensen MC, Blattman JN, Greenberg PD: Restoration of CD28 expression in CD28⁻ CD8⁺ memory effector T cells reconstitutes antigen-induced IL-2 production. *J Exp Med* 198: 947–955, 2003
 36. Najafian N, Chitnis T, Salama AD, Zhu B, Benou C, Yuan X, Clarkson MR, Sayegh MH, Khoury SJ: Regulatory functions of CD8⁺ CD28⁻ T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest* 112: 1037–1048, 2003
 37. Davila E, Kang YM, Park YW, Sawai H, He X, Pryshchep S, Goronzy JJ, Weyand CM: Cell-based immunotherapy with suppressor CD8⁺ T cells in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 174: 7292–7301, 2005
 38. Fischbein MP, Yun J, Laks H, Irie Y, Fischbein MC, Bonavida B, Ardehali A: Role of CD8⁺ lymphocytes in chronic rejection of transplanted hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123: 803–809, 2002
 39. Yang J, Jaramillo A, Liu W, Olack B, Yoshimura Y, Joyce S, Kaleem Z, Mohanakumar T: Chronic rejection of murine cardiac allografts discordant at the H13 minor histocompatibility antigen correlates with the generation of the H13-specific CD8⁺ cytotoxic T cells. *Transplantation* 76: 84–91, 2003
 40. Choy JC, Kerjner A, Wong BW, McManus BM, Granville DJ: Perforin mediates endothelial cell death and resultant transplant vascular disease in cardiac allografts. *Am J Pathol* 165: 127–133, 2004
 41. Kreisel D, Krupnick AS, Balsara KR, Riha M, Gelman AE,

- Popma SH, Szeto WY, Turka LA, Rosengard BR: Mouse vascular endothelium activates CD8+ T lymphocytes in a B7-dependent fashion. *J Immunol* 169: 6154–6161, 2002
42. Heeger PS, Greenspan NS, Kuhlenschmidt S, DeJelo C, Hricik DE, Schulak JA, Tary-Lehmann M: Pretransplant frequency of donor-specific, IFN-gamma-producing lymphocytes is a manifestation of immunologic memory and correlates with the risk of posttransplant rejection episodes. *J Immunol* 163: 2267–2275, 1999
 43. Pantenburg B, Heinzl F, Das L, Heeger PS, Valujskikh A: T cells primed by *Leishmania major* infection cross-react with alloantigens and alter the course of allograft rejection. *J Immunol* 169: 3686–3693, 2002
 44. Lovegrove E, Pettigrow GJ, Bolton EM, Bradley JA: Epitope mapping of the direct T cell response to allogeneic class I MHC: Sequences shared by donor and recipient MHC may prime T cells that provide help for alloantibody production. *J Immunol* 167: 4338–4344, 2001
 45. Fedoseyeva EV, Kishimoto K, Rolls HK, Illigens BM, Dong VM, Valujskikh A, Heeger PS, Sayegh MH, Benichou G: Modulation of tissue-specific immune response to cardiac myosin can prolong survival of allogeneic heart transplants. *J Immunol* 169: 1168–1174, 2002
 46. Raullet DH: Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 3: 781–790, 2003
 47. Jabri B, Selby JM, Negulescu H, Lee L, Roberts AI, Beavis A, Lopez-Botet M, Ebert EC, Winchester RJ: TCR specificity dictates CD94/NKG2A expression by human CTL. *Immunity* 17: 487–499, 2002
 48. Leibson PJ: The regulation of lymphocyte activation by inhibitory receptors. *Curr Opin Immunol* 16: 328–336, 2004
 49. Vivier E, Anfosso N: Inhibitory NK-cell receptors on T cells: Witness of the past, actors of the future. *Nat Rev Immunol* 4: 190–198, 2004
 50. Poggio ED, Clemente M, Riley J, Roddy M, Greenspan NS, DeJelo C, Najafian N, Sayegh MH, Hricik DE, Heeger PS: Alloreactivity in renal transplant recipients with and without chronic allograft nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 15: 1952–1960, 2004
 51. Li Y, Koshiba T, Yoshizawa A, Yonekawa Y, Masuda K, Ito A, Ueda M, Mori T, Kawamoto H, Tanaka Y, Sakaguchi S, Minato N, Wood KJ, Tanaka K: Analyses of peripheral blood mononuclear cells in operational tolerance after pediatric living donor transplantation. *Am J Transplant* 4: 2118–2125, 2004
 52. Chen RH, Ivens KW, Alpert S, Billingham ME, Fathman GC, Flavin TF, Shizuru JA, Starnes VA, Weissman IL, Griffiths GM: The use of granzyme A as a marker of heart transplant rejection in cyclosporine or anti-CD4 monoclonal antibody-treated rats. *Transplantation* 55: 146–153, 1993
 53. Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, Serur D, Mouradian J, Schwartz JE, Suthanthiran M: Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine. *N Engl J Med* 344: 947–954, 2001
 54. Simon T, Opelz G, Wiesel M, Ott RC, Susal C: Serial peripheral blood perforin and granzyme B gene expression measurements for prediction of acute rejection in kidney graft recipients. *Am J Transplant* 3: 1121–1127, 2003

Please see the related Controversies in Nephrology article by Wilkinson in this month's *CJASN* (pages 130–137), which reviews the pros and cons of serial biopsies in renal transplant patients.

Détermination d'une signature transcriptionnelle sanguine du devenir à long terme du greffon de patients recevant une allogreffe rénale.

L'un des objectifs en transplantation est d'induire un état de tolérance « opérationnelle ». Ce statut clinique, rare en transplantation rénale, se définit comme l'acceptation à long terme d'un greffon avec une fonction stable sans traitement immunosuppresseur et sans rejet aigu et/ou chronique chez un hôte immunocompétent. Actuellement, il n'existe pas de bons facteurs prédictifs de cet état. Ce travail a donc consisté à rechercher une signature transcriptionnelle de la tolérance « opérationnelle » dans le sang de patients recevant une allogreffe rénale par l'utilisation de la technologie des puces à ADN. Nous avons déterminé une liste de quarante-neuf gènes discriminant les patients « opérationnellement » tolérants des patients en rejet chronique ainsi que des individus sains. De plus, nous avons combiné des analyses statistiques et des analyses non statistiques afin de mieux caractériser les mécanismes moléculaires impliqués dans ce processus de tolérance « opérationnelle ».

Mots clefs : Tolérance « opérationnelle », Rejet chronique, Transplantation rénale, Puces à ADN.

Determination of a peripheral blood transcriptional signature associated with long-term outcome in kidney allograft recipients.

A major goal in transplantation is to induce a state of operational tolerance. This state, which is rare in kidney transplant recipients, is defined as long-term graft acceptance with a stable function without immunosuppressive treatment and without acute and/or chronic rejection in an immunocompetent recipient. At present, there are no good predictive factors of this state. This work consists of identifying a peripheral blood transcriptional signature associated with operational tolerance using microarray technology. We have identified a panel of forty-nine genes that discriminate operationally tolerant patients from patients with chronic rejection and from healthy volunteers. Furthermore, we have combined statistical and non-statistical analyses in order to better characterize the molecular mechanisms involved in this operational tolerance phenomenon.

Key words: Operational tolerance, Chronic rejection, kidney transplantation, Microarrays.