

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

Ecole Doctorale : BIOLOGIE SANTE

Année 2012

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Etude des biomarqueurs en transplantation et plus particulièrement de Tribbles-1.

THESE DE DOCTORAT

Discipline : SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Spécialité : IMMUNOLOGIE

*Présentée
et soutenue publiquement par*

Emilie DUGAST

Le 26 avril 2012, devant le jury ci-dessous :

Rapporteurs : Flora ZAVALA, Directeur de Recherches, Paris
Pierre FAFOURNOUX, Directeur de Recherches, Clermont-Ferrand

Examineur : Benoît SALOMON, Directeur de Recherches, Paris

Directeur de thèse :

Sophie BROUARD, Directeur de Recherches, Nantes

Co-encadrant :

Joanna ASHTON-CHESS, Chef de projet, Nantes

« En essayant continuellement on finit par
réussir. Donc : plus ça rate, plus on a de
chances que ça marche.»

Devise Shadok

Abréviations

ADCC: Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity

ADN: Acide désoxyribonucléique

AML: Acute myeloid leukemia

AMP : Adénosine mono-phosphate

ATP : Adénosine tri-phosphate

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ATG: Anti-thymocyte globulin

CAN: Chronic allograft nephropathy

C/EBP: Ccaat-enhancer-binding proteins

cKO : conditionnelle Knock-out

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

CPA: Cellule présentatrice d'antigène

CTGF : Connective tissue growth factor

CTL: Cytotoxic T lymphocyte

DC: Dendritic cell

DSA: Donnor specific antibody

DT2: Diabète de type 2

FI/AT: Fibrose interstitielle/atrophie tubulaire

FoxP3: Forkhead box P3

GFP: Green fluorescent protein

GrzB: Granzyme B

GVHD: Graft versus host disease

HLA: Human leukocyte antigen

IFN: Interferon

Ig: Immunoglobuline

IL: Interleukine

IPEX: Immunodysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked

IVIG: Intravenous immunoglobuline

KO: Knock-out

LB: Lymphocyte B

LPS: Lipopolysaccharides

LT: Lymphocyte T

MAP: Mitogen-activated protein
MICA: MHC class I-related chain A
MMF: Mycophenolate Mofetil
MMP: Matrix metalloprotease
NK: Natural Killer
PCA: Protein complementation assay
PMA: Phorbol-12-myristate-13-acetate
PSMB: Proteasome subunit beta type-10
RCHA: Rejet chronique humoral actif
SNP: Single nucleotide polymorphism
TCR: T cell receptor
TGF: Tumor growth factor
THBS: Thrombospondin
Th3: T helper 3
TLR: Toll-like receptor
TNF: Tumor necrosis factor
Tr1: T regulatory cell type 1
Tregs: Cellule T régulatrices
TRIB: Tribbles homologue

Sommaire

INTRODUCTION	1
I. LES MECANISMES IMMUNOLOGIQUES INTERVENANT APRES TRANSPLANTATION.....	2
1. Brève histoire de la transplantation.....	2
2. Les limites de la transplantation.....	3
3. Le rejet d'allogreffe.....	4
a. Le rejet hyper aigu.....	4
b. Le rejet aigu	5
i. Le rejet aigu cellulaire	5
ii. Le rejet aigu humoral	8
c. Les dysfonctions chroniques du greffon	9
i. Les dysfonctions chroniques du greffon d'origine non-immune	9
ii. Le diagnostic du rejet chronique.....	10
iii. Les mécanismes du rejet chronique.....	11
iv. Les traitements utilisés dans le rejet chronique à médiation humorale	14
4. La tolérance	16
a. Les mécanismes de la tolérance.....	16
b. La tolérance en transplantation	18
II. LES BIOMARQUEURS.....	21
1. Définition	21
2. Les biomarqueurs des dysfonctions chroniques.....	22
a. Le C4d et les anticorps anti-donneur	22
b. Les nouveaux biomarqueurs des dysfonctions chroniques	23
c. Les biomarqueurs du RCHA.....	25
III. LES MOLECULES TRIBBLES.....	28
1. Les Tribbles chez la <i>Drosophile</i>	28
2. Tribbles-1 chez les mammifères	29
a. Structure de TRIB1	29
b. Mode d'action de TRIB1	31
c. Rôles de TRIB1 dans les pathologies	33
i. Cancer.....	33
ii. Infarctus du myocarde	39
iii. Inflammation	40
3. Tribbles-2 et Tribbles-3 chez les mammifères	41
a. Tribbles-2.....	41
b. Tribbles-3.....	42
IV. LES LYMPHOCYTES T REGULATEURS	46
1. Les lymphocytes T CD4 ⁺ naturels.....	46
a. Le phénotype des Tregs	46
b. Le facteur de transcription FoxP3	47
c. Le développement des Tregs	49
d. Les mécanismes d'action des Tregs	50
i. Suppression par les cytokines inhibitrices	50
ii. La suppression par la cytolyse.....	52

iii. Suppression via des perturbations métaboliques.....	53
iv. Suppression via l'interaction avec les cellules dendritiques.....	53
2. Les lymphocytes T CD4 ⁺ induits	54
3. Les autres cellules régulatrices.....	55
4. Les Tregs en transplantation	56
V. OBJECTIFS	59
1. Projet n°1 : Biomarqueurs	59
2. Projet n°2 : Etude de TRIB1	61
RESULTATS	63
I. ETUDES DES BIOMARQUEURS.....	64
1. Article n°1	64
2. Article n°2	75
3. Etude complémentaire de TRIB1 en transplantation	88
a. Etude de TRIB1 dans les Tregs.....	88
b. Etude de TRIB1 sur des coupes histologiques de rein	89
4. Autres études de biomarqueurs	91
5. Discussion	93
a. Discussion article n°1	93
b. Discussion article n°2 et de l'étude complémentaire sur TRIB1 en transplantation	96
c. Discussion des autres études de biomarqueurs	98
II. ETUDE DE TRIB1.....	99
1. Article sur TRIB1 dans les Tregs	99
2. Résultats complémentaires	125
a. Etude de TRIB1 dans une lignée cellulaire : les Jurkats	125
b. Etude de TRIB1 dans les lymphocytes T régulateurs	127
c. Production de souris TRIB cKO	128
d. Recherche de molécules interagissant avec TRIB1	130
3. Discussion	131
a. Discussion de l'article sur TRIB1 dans les Tregs	131
b. Discussion des résultats complémentaires	133
DISCUSSION GENERALE.....	134
PERSPECTIVES.....	137
I. ETUDE DE TRIB1 DANS LES TREGS DE PATIENTS TRANSPLANTES RENALES	138
II. ETUDE DU ROLE DE TRIB1 DANS LES TREGS	138
1. Etude de TRIB1 dans les Tregs de souris <i>in vitro</i>	138
a. Sous-expression de TRIB1 dans les Tregs issus des souris cKO.....	138
b. Sur-expression de TRIB1 dans Tregs et non-Tregs issus de souris sauvages	140
2. Etude de TRIB1 dans les lymphocytes T <i>in vivo</i>	141
III. ETUDE DES MOLECULES INTERAGISSANT AVEC TRIB1	141
BIBLIOGRAPHIE.....	143
ANNEXES	163

Liste des figures :

Figure 1: Les différentes voies de présentation.....	6
Figure 2 : Représentation schématique des mécanismes de rejet aigu.	7
Figure 3: Caractéristiques histologiques du RCHA.	11
Figure 4: Les quatre étapes du développement du rejet chronique à médiation humorale. .	12
Figure 5: Diverses stratégies de traitement du RCHA.	15
Figure 6: Mécanismes de tolérance périphérique.	17
Figure 7: (a) Affiche de l'épisode de Star Trek avec les Tribbles. (b) Marquage d'un embryon de drosophile mutante pour Tribbles.	28
Figure 8: Structure du gène Trib1.	29
Figure 9: Structure schématique de TRIB1 avec ses 3 domaines et leurs fonctions associées.	31
Figure 10: Représentation schématique de l'implication de TRIB1 dans le développement des cancers.....	38
Figure 11: Structure du gène Trib2.	41
Figure 12: Structure du gène Trib3.	42
Figure 13: Implication des molécules Tribbles dans diverses pathologies chez les mammifères.	45
Figure 14: Structure du gène FoxP3 chez la souris ainsi que les voies de signalisation et les facteurs de transcription impliqués dans la transcription de FoxP3.	48
Figure 15: Représentation schématique des 4 principaux mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs.	51
Figure 16: Expression relative d'ARNm de TRIB1 et de FoxP3 dans les lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+CD127- et dans les lymphocytes T CD4+CD25-	88
Figure 17 : Marquage histologique d'une coupe de rein avec un anticorps anti-TRIB1.....	90
Figure 18: Expression relative d'ARNm de TRIB1, TRIB2, TRIB3 et FoxP3 au cours du temps dans des Jurkats activées à la PMA. Corrélation entre l'expression d'ARNm de TRIB1 et FoxP3 dans ces Jurkats.	125
Figure 19: Expression relative d'ARNm de TRIB1, TRIB2 et TRIB3 dans des Jurkats activées à la PMA pendant 12 heures et transfectées avec des siRNA dirigées contre TRIB1 ou avec un siRNA control.....	126

Figure 20: a- Image représentative des analyses par FACS de la transfection des Tregs avec le siRNA-Cy5 dirigés contre TRIB1.b- Analyse de l'expression de TRIB1 dans les Tregs non transfectées ou dans les Tregs transfectées avec un siRNA dirigé contre TRIB1 ou un siRNA contrôle négatif.....	127
Figure 21: Représentation du gène TRIB1 en fonction du stade de production.	129
Figure 22: Principe du système de levure double hybride utilise par Hybrigenics.....	130
Figure 23: Carte du plasmide CRE-GFP.....	139
Figure 24: carte du plasmide P2A	140

Liste des tableaux

Tableau n°1 : Récapitulatifs des principaux biomarqueurs de dysfonctions chroniques	27
Tableau n°2 : Récapitulatif sur les Tregs naturels et induits CD4+CD25+.....	55

Introduction

I. Les mécanismes immunologiques intervenant après transplantation

1. Brève histoire de la transplantation

Commençons par un peu d'histoire.... Bien qu'il existe plusieurs références à la transplantation dans divers ouvrages anciens tels que la Bible ou bien une fresque datant du troisième siècle au couvent de San Marco à Florence, la véritable histoire de la transplantation a débuté au XIXème siècle. En effet, en 1804, Giuseppe Boronio réalisa des greffes de peau sur des moutons et il sera suivi en 1822 par Berger qui réalisa des autogreffes (greffe où le donneur et le receveur sont la même personne) de peau chez l'homme. Cependant, les plus grandes avancées en transplantation voient le jour au cours du XXème siècle. Le français Alexis Carrel est le premier à s'essayer à la transplantation d'un organe chez l'animal en 1902 et c'est en 1912 qu'il obtiendra le prix Nobel pour ses travaux sur « la suture vasculaire et la transplantation de cellules sanguines et d'organes ». En 1906, Mathieu Jaboulay et Emerich Ullman échouent chacun de leur côté dans leur tentative de xénogreffe (greffe réalisée sur un individu avec un organe provenant d'une espèce différente. Ex : rein de porc greffé à l'homme). Un peu plus tard, en 1933, le russe Serguey Voronoy réalise la première allogreffe de rein (greffe réalisée sur un individu avec un organe provenant d'un autre individu de la même espèce mais avec un fond génétique différent) à partir d'un donneur mort. Bien que cette tentative échoue, elle permet à Voronoy de donner naissance à la notion de rejet immunologique. De nombreuses découvertes vont être réalisées après la deuxième guerre mondiale. Au cours de l'année 1952, Jean Dausset met en évidence l'existence du système HLA (Human Leucocyte Antigen), ce qui lui vaudra un prix Nobel. La même année, Jean Hamburger et Jean Vaysse de l'hôpital Necker de Paris vont réaliser la première greffe de rein à partir d'un donneur vivant, mais le patient greffé ne survivra que 21 jours. Deux ans plus tard, à Boston, la première greffe entre deux jumeaux, réalisée par John Merrill et Joseph Murray, est une réussite. En 1959, une greffe entre faux jumeaux est réalisée et afin d'éviter le rejet, les médecins ont l'idée « d'endormir » le système immunitaire du patient en associant la transplantation à un traitement immunosuppresseur par irradiation (effet immunosuppresseur découvert en 1955) et corticoïdes (découvert en 1950). C'est une première petite réussite puisque le patient survivra 21 mois.

Un nouveau traitement immunosuppresseur, l'azathioprine, utilisée pour la première fois en 1962 et va être à l'origine d'une amélioration de la survie des patients greffés. Cependant, la révolution dans le domaine de la transplantation arrive en 1972 grâce à la découverte, par le biologiste suisse Jean-François Borel, des propriétés immunosuppressives de la ciclosporine. Cette molécule, synthétisée artificiellement à partir de 1980, va augmenter considérablement la survie du greffon des patients.

Au cours de la dernière partie du XXème siècle, plusieurs axes intervenant dans la transplantation vont être améliorés tels que les traitements, les techniques chirurgicales mais également les techniques de conservation des organes.

A voir toutes les avancées considérables réalisées au cours de ce siècle dernier, on pourrait penser que la transplantation est la solution « miracle » afin soigner les patients ayant une défaillance grave d'un ou plusieurs organes (rein, foie, cœur, poumon...). En effet, en l'absence de transplantation, certains traitements utilisés pour soigner des maladies ne suffisent pas à restaurer les fonctions de l'organe touché par la pathologie et dans d'autres cas, les traitements sont trop contraignants comme, par exemple, la dialyse pour pallier la défaillance des reins. La transplantation, qui consiste à remplacer l'organe malade par un nouveau, permet ainsi de ne plus avoir recours à ces traitements lourds et d'avoir un organe qui assure toutes ses fonctions biologiques. Cependant, la transplantation ne résout pas tous les problèmes, elle en crée aussi de nouveaux...

2. Les limites de la transplantation

Effectivement, la transplantation a amélioré le quotidien d'un bon nombre de patients avec une insuffisance terminale d'un organe vital. Malgré l'optimisme que l'on peut montrer face aux progrès considérables réalisés dans ce domaine, un premier frein vient noircir le tableau. La forte demande d'organe fait que « l'offre et la demande » ne sont malheureusement pas à l'équilibre. D'après les données de l'Agence de la Biomédecine, en France, le nombre de patients sur la liste d'attente pour une greffe de rein est passé de 6222 en 2007 à 7616 en 2010 alors que le nombre de patients greffés, quant à lui, n'a pas augmenté et reste aux environs de 2900. Ces données mettent bien en évidence l'importance de la pénurie d'organe. C'est la raison pour laquelle la recherche en xénotransplantation est très active car elle permettrait de résoudre ce problème majeur. Le deuxième frein est le rejet de greffe, qui peut, dans certains

cas, être empêché par des traitements immunosuppresseurs adaptés mais qui, dans d'autre cas, est irréversible. Il faut savoir que la durée moyenne d'une greffe de rein est de 15 ans. Enfin, le dernier frein important est le traitement immunosuppresseur prescrit aux patients. Il est vrai que ces traitements ont amplement amélioré le taux de survie du greffon, qui, un an après greffe est ainsi passé de 60% dans les années 70 à plus de 90% aujourd'hui (Peter J Morris 2004), mais les immunosuppresseurs induisent également des effets néfastes tels qu'une toxicité rénale, de l'hypertension ainsi que des cancers....

3. Le rejet d'allogreffe

Les progrès réalisés au cours du siècle dernier ont permis d'améliorer la durée de survie du greffon. Cependant, plusieurs phénomènes, immunologiques ou non, peuvent aboutir à une dysfonction du greffon dans un délai plus ou moins long après transplantation. Les causes immunologiques regroupent les rejets de greffes qui sont classés d'une part en fonction de leur rapidité de survenue après transplantation, et d'autre part, en fonction des mécanismes qui sont intervenus ainsi que des lésions qu'ils ont provoquées.

Au cours de cette introduction, je vais principalement traiter de la transplantation rénale. La classification de Banff, réalisée par un comité d'experts, permet de classer les différentes pathologies du greffon suite à une transplantation rénale. Cette classification est établie depuis 1991 par un comité d'expert qui se réunit dans la ville de Banff au Canada (première publication en 1993) (Solez et al. 1993) et elle est remise à jour régulièrement en fonction des nouvelles données issues de la recherche clinique. La dernière mise à jour a été faite en juin 2011 et publiée en 2012 (Mengel et al. 2012). Le diagnostic des rejets est déterminé en fonction de cette classification de Banff.

a. Le rejet hyper aigu

Le rejet hyper aigu intervient quelques minutes à quelques heures après la reperfusion de l'organe transplanté chez les receveurs hyperimmunisés. L'hyperimmunisation est due à un titre élevé d'anticorps dans le sérum causé par de précédentes transfusions sanguines, grossesses ou alors greffes. Deux types d'anticorps sont à l'origine du rejet hyper aigu : les anticorps dirigés contre les antigènes ABO (Kissmeyer-Nielsen et al. 1966) présents à la surface des globules rouges ainsi que les anticorps dirigés contre les molécules du CMH

(Complexe majeur d'histocompatibilité) (G. M. Williams et al. 1968) situés, entre autres, à la surface des cellules endothéliales du greffon.

La fixation des anticorps du receveur aux antigènes de l'organe transplanté va induire l'activation de la coagulation ainsi que l'activation de la cascade du complément qui va engendrer la thrombose ainsi que la nécrose de l'organe.

Dans le domaine de l'allotransplantation clinique, ce type de rejet est, de nos jours, extrêmement rare, principalement grâce au typage sanguin limitant les greffes ABO incompatibles, mais également grâce aux techniques de détection des alloanticorps présents chez le receveur. Cependant, ce type de rejet est toujours très étudié car il joue un rôle majeur au cours de la xénotransplantation.

b. Le rejet aigu

Le rejet aigu intervient généralement entre trois jours et trois mois après la transplantation. Ce rejet est provoqué soit par l'activation des lymphocytes T : on parlera alors de rejet aigu cellulaire, soit par les anticorps cytotoxiques et dans ce cas, il s'agit d'un rejet aigu humoral.

i. Le rejet aigu cellulaire

Ce rejet commence par la rencontre entre les cellules présentatrices d'antigène (CPA), qui sont majoritairement des cellules dendritiques, avec les lymphocytes T (LT) du receveur (Rosenberg & Singer 1988). Cette reconnaissance peut être de deux types : directe ou indirecte (Pietra et al. 2000; Popov et al. 1995; Benham et al. 1995). On parle de présentation directe lorsque les LT du receveur reconnaissent les complexes CMH allogénique - peptide allogénique portés à la surface des CPA du donneur. Par contre, on parle de présentation indirecte lorsque les LT du receveur reconnaissent les complexes CMH du receveur-peptide allogénique portés à la surface des CPA du receveur (Figure n°1).

Il existe également une voie de présentation semi-directe, mais il n'a actuellement pas été décrit de rôle concernant cette voie de présentation au cours du rejet de greffe.

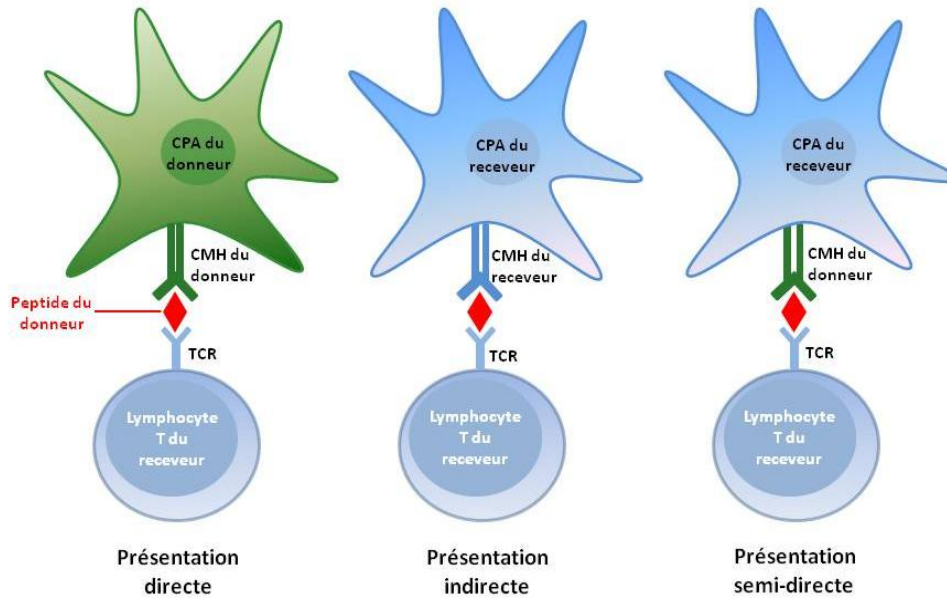


Figure 1: Les différentes voies de présentation.

Présentation au lymphocyte T du receveur, du peptide du donneur par les molécules du CMH présentes à la surface de la cellule présentatrice d'antigène.

La présentation directe intervient principalement dans les premiers temps après la transplantation, car les CPA du donneur sont présentes dans les vaisseaux du greffon. Plus tard, ce sont les CPA du receveur qui vont coloniser le greffon tandis que les CPA du donneur auront été éliminées. C'est alors la présentation indirecte qui sera principalement en cause lors de phase de rejet aigu cellulaire plus tardif. Cependant, une étude menée par Kreisel et al. a montré que les LT $CD8^+$ peuvent être également activés par la présentation directe par les cellules endothéliales du greffon (Kreisel, Krupnick, Gelman, et al. 2002) pendant toute la durée où le greffon est en place chez le receveur. Les rencontres entre CPA et LT ont lieu principalement au niveau des organes lymphoïdes secondaires mais elles peuvent également avoir lieu au niveau du greffon (C P Larsen et al. 1990; Lakkis et al. 2000). Cette rencontre va induire l'activation des LT $CD4^+$ et $CD8^+$ du receveur (Auchincloss et al. 1993). Les LT $CD4^+$ sont activés, entre autre, par la reconnaissance des complexes CMH de classe II/peptides allogéniques portés par les CPA. Les LT $CD8^+$, quant à eux, sont activés par la reconnaissance des complexes CMH de classe I/peptides allogéniques portés par les cellules du transplant, dont l'endothélium.

L'activation totale des LT nécessite 4 signaux. Le signal 1 est initié par l'interaction du TCR (T cell receptor) qui est couplé à la molécule de surface CD3 du LT avec le complexe CMH - peptide porté par la CPA. Ce signal permet, au LT, d'activer des voies de signalisation

(calcineurine, MAP kinase et protéine kinase C) et ainsi d'induire l'expression de molécules comme l'interleukine-2 (IL-2), et le CD154 mais également de passer de la phase G0 à la phase G1 du cycle cellulaire. Le signal 2, dit de co-stimulation, renforce le signal 1. Il est fourni par l'interaction entre des molécules membranaires du LT (CD28) et de la CPA (CD80/86). L'action de ces deux premiers signaux va conduire à la production de l'IL-2 et à l'expression du récepteur à l'IL-2 de haute affinité. Lors du signal 3, l'IL-2 va se fixer sur son récepteur et permettre ainsi de faire progresser le LT de la phase G1 à S du cycle cellulaire. Enfin, le signal 4 correspond à l'étape de prolifération (phase M du cycle cellulaire) du lymphocyte.

Dans les cas où l'interaction lymphocyte - CPA a lieu dans un organe lymphoïde secondaire, l'activation totale du lymphocyte va conduire à sa prolifération puis à sa migration vers le greffon grâce au contexte pro-inflammatoire qui règne au niveau des cellules endothéliales du greffon qui sécrète des chimiokines tel que CCL2, CXCL9 ou CXCL10 (Collins et al. 1984; J S Pober & Cotran 1990; Al-Lamki et al. 2008).

Les mécanismes de ce rejet aigu cellulaire sont schématisés sur la figure 2.

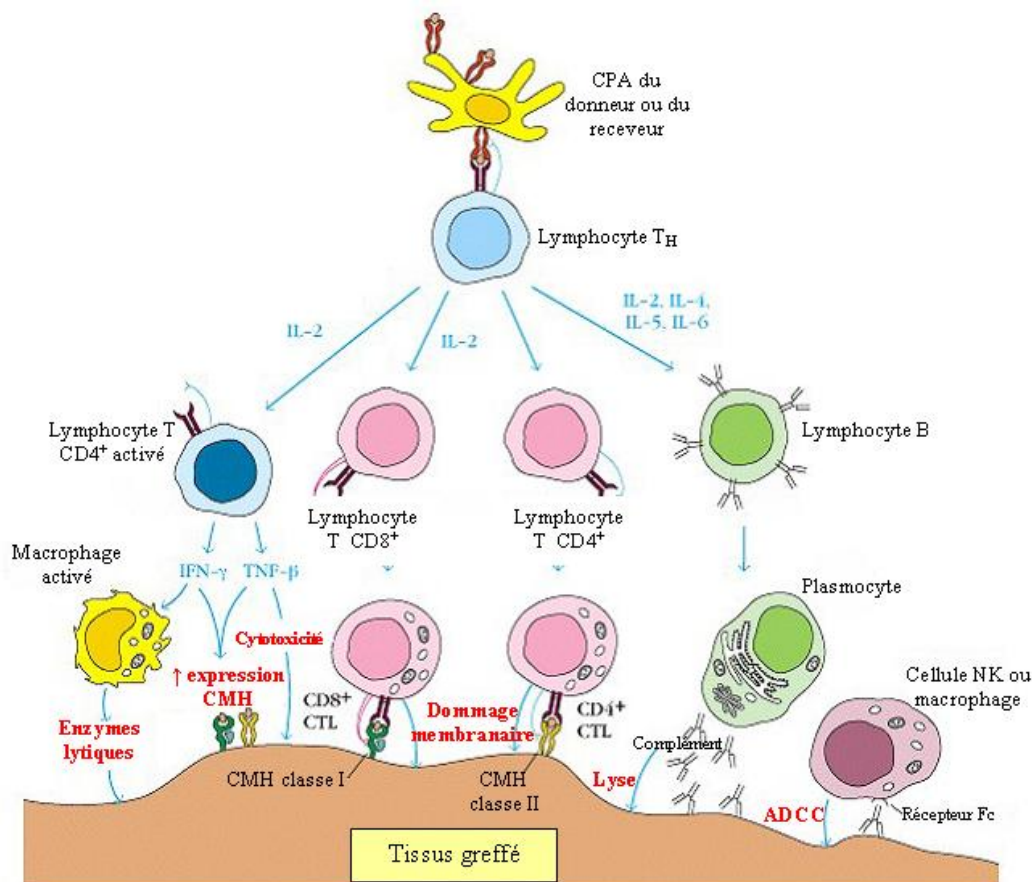


Figure 2 : Représentation schématique des mécanismes de rejet aigu.

D'après Goldsby, R. A., T. J. Kindt, et al. (2000). Kuby immunology. New York, W.H. Freeman.

Au niveau du greffon, on retrouve ainsi les LT mais également des macrophages (Mannon 2011) qui seront activés à la fois par l'IFN γ sécrété par les LT CD4⁺ activés mais également par la stimulation de certains de leurs récepteurs comme les Toll-like récepteurs (TLR) via les DAMPs (Damage-associated molecular patterns) qui peuvent être présents dans le greffon suite aux lésions dues à l'ischémie-reperfusion (Wyburn et al. 2005; Wood & Goto 2012). Les macrophages ainsi activés vont sécréter des enzymes lytiques afin de dégrader le greffon. Les lymphocytes T CD8⁺ et certains lymphocytes T CD4⁺ vont, quant à eux, se transformer en lymphocytes T cytotoxiques (CTL) (Grazia et al. 2010) et exercer leur activité cytotoxique en se liant directement à l'endothélium via leur TCR et les molécules du CMH exprimées par les cellules endothéliales du greffon. L'activité cytotoxique de ces CTL intervient soit en induisant l'apoptose des cellules endothéliales via la voie Fas/FasL, soit en libérant des enzymes lytiques comme perforine et granzyme qui vont percer la membrane et fragmenter l'ADN (Kreisel, Krupnick, Balsara, et al. 2002).

ii. Le rejet aigu humoral

Ce rejet est, quant à lui, dépendant des anticorps cytotoxiques dirigés spécifiquement contre les antigènes du donneur, c'est-à-dire des alloanticorps. Ces alloanticorps sont principalement dirigés contre les molécules du CMH de classe I mais aussi contre les molécules du CMH de classe II (Mauiyyedi & Colvin 2002). Ce sont les LB activés avec l'aide des LT eux-mêmes activés qui vont se différencier en plasmocytes afin de produire ces anticorps spécifiques (Steele et al. 1996). Les alloanticorps ainsi produits vont se lier à l'endothélium vasculaire du greffon et enclencher la cascade du complément qui va aboutir à la formation du complexe d'attaque membranaire et ainsi détruire l'endothélium. Ce mécanisme est clairement observé par l'étude histopathologique de biopsie du greffon qui montre des dépôts de C4d (molécule produite lors de la cascade du complément) dans les capillaires péri-tubulaires du rein (Solez et al. 2008; Racusen et al. 2003). Parallèlement, les cellules NK (Natural killer), qui possèdent des récepteurs aux fragments Fc des immunoglobulines, vont fixer les anticorps liés aux cellules endothéliales et induire la lyse de ces cellules en libérant des enzymes lytiques : c'est le phénomène d'ADCC (Antibody-dependant cell-mediated cytotoxicity). Les mécanismes qui interviennent dans ce rejet aigu humoral sont récapitulés sur la figure 2.

Tous ces phénomènes immunologiques liés à l'activité des cellules et des anticorps créent diverses lésions au niveau du greffon. Dans le cas du rein, ce rejet aigu est caractérisé par un infiltrat cellulaire par des cellules mononucléées, de l'inflammation interstitielle, des lésions de tubulite, d'une atteinte glomérulaire et enfin des lésions vasculaires.

Avant les traitements immunosuppresseurs, le rejet aigu était la principale cause de perte du greffon. Dorénavant, les rejets aigus sont de plus en plus rares (moins de 15%) (Nankivell & Kuypers 2011) et se traitent assez bien en adaptant les protocoles d'immunosuppression.

c. Les dysfonctions chroniques du greffon

La dysfonction chronique du greffon est une altération lente, progressive et irréversible des structures mais également de la fonction du greffon. Cette pathologie ne répond que très faiblement aux traitements immunosuppresseurs. Certaines dysfonctions chroniques sont d'origine non immunologique et l'autre partie des dysfonctions chroniques sont, quant à elles, d'origine immunologique : on parle alors de rejet chronique actif à médiation humorale ou rejet chronique actif à médiation cellulaire également appelé vasculopathie chronique du transplant.

Dans la classification de Banff de 2005 (Solez et al. 2007), le terme de néphropathie chronique d'allogreffe ou CAN (Chronic Allograft Nephropathy), couramment utilisé, a été éliminé car il était employé de manière trop générique comme une maladie spécifique plutôt qu'un terme général pour décrire des lésions chroniques. Avant son élimination de la classification, ce terme a ainsi été utilisé afin de définir les patients souffrant de dysfonction chronique du greffon aboutissant à une détérioration de la fonction rénale et à des lésions histologiques d'origine non-immunologique et/ou immunologique telles que la fibrose interstitielle/atrophie tubulaire. Dorénavant, la classification de Banff permet de classer les différents rejets de greffe rénale en fonction des caractères histologiques observables sur des biopsies.

i. Les dysfonctions chroniques du greffon d'origine non-immune

Plusieurs pathologies peuvent être à l'origine des dysfonctions chroniques non-immunes telles que l'hypertension chronique, la récurrence de la maladie initiale (exemple : syndrome

néphrotique), la pyélonéphrite bactérienne, certaines infections virales, le développement de nouvelles maladies (glomérulonéphrite) ou bien la toxicité de certains traitements immunosuppresseurs comme par exemple les inhibiteurs de calcineurine (ciclosporine ou tacrolimus) (Pascual et al. 2002; Nankivell et al. 2003; Solez et al. 2007)... Le terme de CAN, a été remplacé, pour les dysfonctions chroniques d'origine non-immunologique, par le terme de fibrose interstitielle/atrophie tubulaire qui est une description histologique que l'on peut fréquemment observer lors de pathologies tardives du greffon sans causes immunologiques déterminées (Solez et al. 2007).

ii. Le diagnostic du rejet chronique

Dans la classification de Banff de 2005 (Solez et al. 2007), on peut voir apparaître les termes « chronic active T-cell-mediated rejection » et « Chronic active antibody-mediated rejection ». Depuis celle-ci, la définition du rejet chronique actif à médiation cellulaire n'a pas évolué, il est toujours caractérisé par une fibrose de l'intima des artères associée à un infiltrat de la néo-intima par des lymphocytes et des macrophages.

En ce qui concerne le rejet chronique actif à médiation humorale (RCHA), la définition de 2005 ne mentionnait pas encore la présence des anticorps. C'est depuis la classification de 2007 que la définition du RCHA a été plus finement établie et est actuellement toujours la même. Ainsi, d'après la classification de Banff 2007 (Solez et al. 2008), le RCHA est caractérisé par la présence de C4d au niveau des capillaires péri-tubulaires (Figure 3a) avec des anticorps anti-donneur circulants également appelés DSA (Donor Specific Antibody).

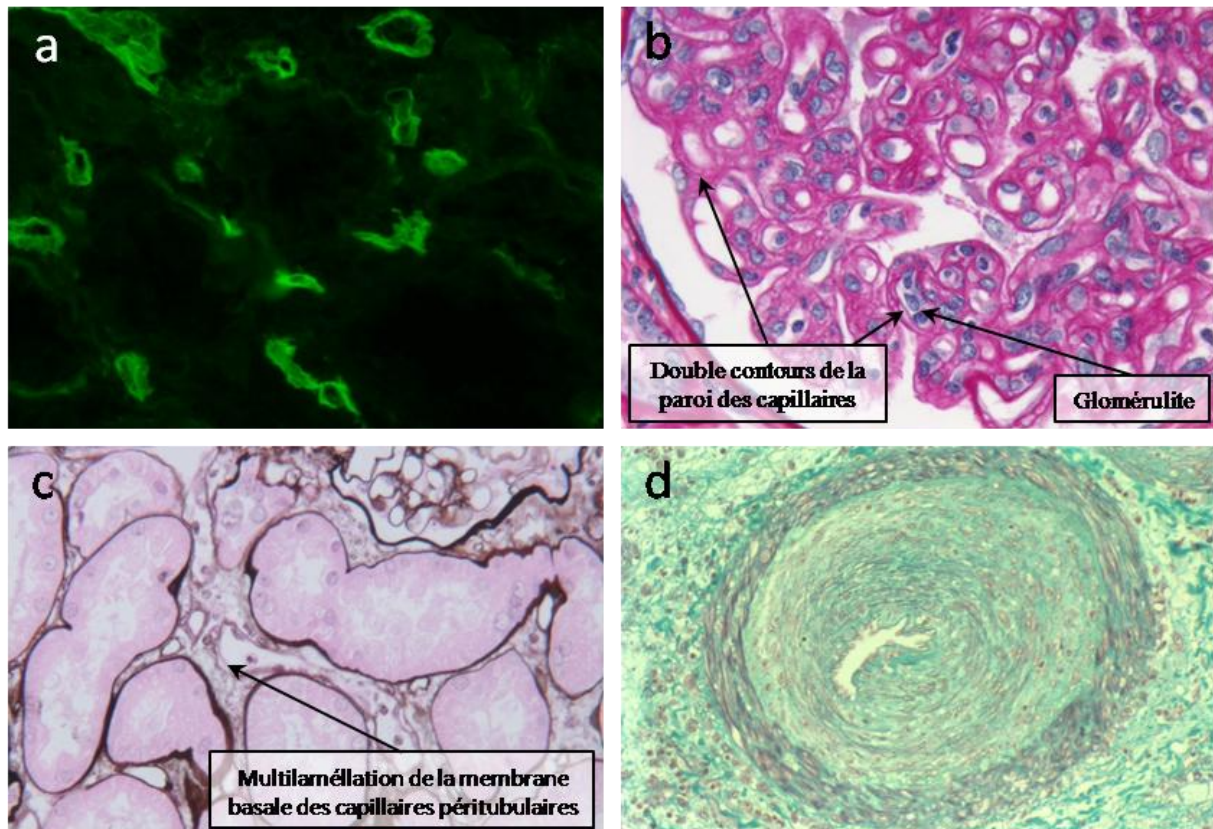


Figure 3: Caractéristiques histologiques du RCHA.

a. Dépôts de C4d dans les capillaires péri-tubulaires (Immunofluorescence x400). b. Glomérulopathie d'allogreffe caractérisée par des membranes basales glomérulaires avec aspect en doubles contours (Periodic Acid Schiff x400). c. Multilamellation de la membrane basale des capillaires péri-tubulaires (Coloration de Jones x400). d. Endartérite fibroproliférative (Trichrome Vert Lumière x100). (D'après (Giral, Martinez, et al. 2010))

La dernière classification de Banff publiée récemment s'est particulièrement intéressée à l'existence éventuelle d'un rejet à médiation humorale et l'absence de C4d (Mengel et al. 2012). Sans introduire pour le moment, dans la classification, le rejet à médiation humorale C4d-, ils émettent l'idée de l'intégrer lors de la prochaine réunion en 2013 après avoir étudié plusieurs points auparavant.

iii. Les mécanismes du rejet chronique

Lorsque l'on parle de rejet chronique, on parle principalement du rejet chronique actif à médiation humorale. En effet, le rejet chronique actif à médiation cellulaire ne représente qu'une infime partie des rejets chroniques.

Le rejet chronique actif à médiation cellulaire

Au cours du rejet chronique cellulaire, c'est la voie de présentation indirecte qui intervient principalement. Lors de cette présentation indirecte, les cellules dendritiques du receveur vont porter à leur surface des molécules du CMH chargées avec des antigènes provenant des cellules du donneur et les présenter aux LT du receveur afin de les activer (Fangmann et al. 1992). Cette voie de présentation intervient également suite au remplacement des cellules endothéliales du greffon par des cellules mésenchymateuse du receveur. Dans ces conditions, les cellules mésenchymateuses présentent des alloantigènes via les molécules de CMH de classe II aux lymphocytes T CD4⁺ (Grimm et al. 2001; Kapessidou et al. 2006; Safinia et al. 2010). De plus, les macrophages jouent également un rôle dans ce rejet chronique cellulaire (Mannon 2010) via leur activation par les cytokines présentes au niveau du greffon (Yang et al. 2003; Croker et al. 1996; Wyburn et al. 2005).

Le rejet chronique actif à médiation humorale

Le RCHA représente la majeure partie des dysfonctions chroniques du greffon dues à des phénomènes immunologiques. Quatre grandes étapes ont été définies à l'aide de modèles animaux utilisant des primates afin de définir le développement de ce RCHA (R N Smith et al. 2006; R N Smith et al. 2008; Colvin & R Neal Smith 2005; Thaunat 2011) (Figure 4).

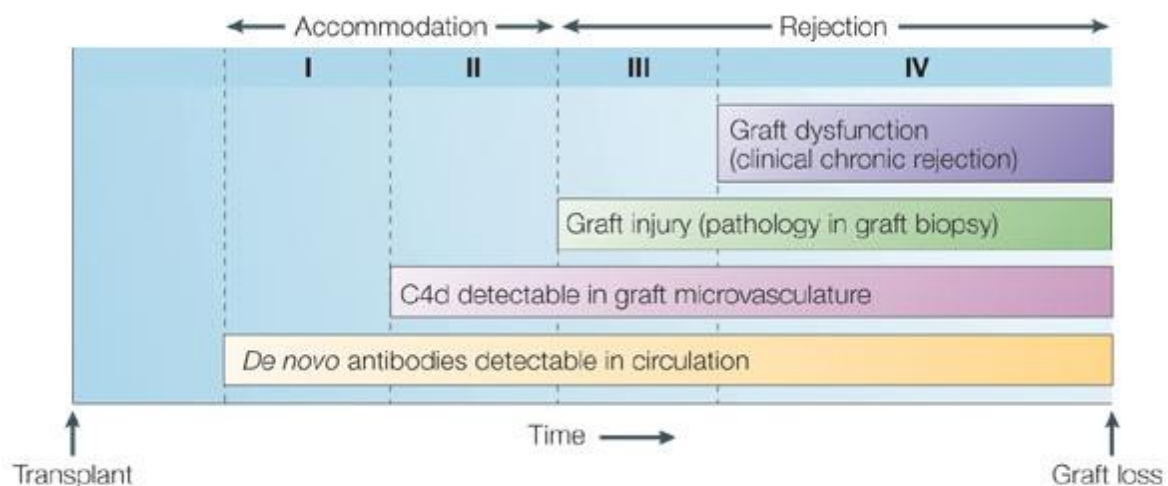


Figure 4: Les quatre étapes du développement du rejet chronique à médiation humorale.
D'après (Colvin & R Neal Smith 2005)

L'étude menée sur les primates montre des lésions tissulaires semblables à celles observées chez l'homme, ce qui permet de faire le lien entre les données obtenues chez le primate et ce qui se passe chez l'homme bien que l'étude soit réalisée sans l'utilisation de traitement immunosuppresseur.

(1) La première étape correspond à la détection d'anticorps anti-donneur principalement dirigé contre les molécules HLA du donneur. L'origine de ces anticorps est encore débattue. En effet, il a été démontré, que ces anticorps étaient produits par les lymphocytes B grâce à la coopération des lymphocytes $CD4^+$ activés par voie indirecte (Baker et al. 2001; Vella et al. 1997). Cependant, une étude récente menée par l'équipe de Benichou G. montre que, chez le primate, la production d'alloanticorps serait principalement due à l'activation de LT $CD4^+$ par voie directe (voir peut-être semi-directe) (Nadazdin et al. 2011).

(2) La seconde étape est la détection du C4d au niveau des capillaires péritubulaires du greffon. L'origine du C4d est due à la fixation des alloanticorps aux antigènes présents à la surface des cellules endothéliales du greffon. Cette fixation induit l'activation de la cascade du complément et ainsi la formation du C4d qui se dépose dans le greffon.

(3) La troisième étape correspond à l'observation de lésions au niveau du greffon dues à l'attaque des cellules endothéliales par le complément mais également à l'activation de ces cellules par le complément, ce qui va conduire à la sécrétion de molécules d'adhésion et de cytokines qui vont permettre le recrutement de cellules effectrices telles que les macrophages ou les cellules NK (Saadi & Platt 2002). De plus, en l'absence de complément, des anticorps vont se fixer sur les molécules du CMH de classe I des cellules endothéliales, ce qui va conduire à leur activation ainsi qu'à leurs proliférations, induisant de l'endartérite fibroproliférative caractéristique de RCHA (Y.-P. Jin et al. 2002; J. D. Smith et al. 2000).

(4) La quatrième et dernière étape correspond à la dysfonction du greffon due à toutes les lésions histologiques provoquées par l'inflammation chronique.

On peut noter que dans certains rares cas, on observe des anticorps anti-donneur ainsi que du C4d mais sans modification histologique et avec une fonction rénale normale. Ce phénomène est appelé l'accommodation (C. A. Koch et al. 2004; Sis et al. 2006; Allen et al. 2009).

iv. Les traitements utilisés dans le rejet chronique à médiation humorale

En transplantation, le nombre de rejets hyper aigus et aigus a été très largement réduit grâce à l'amélioration des traitements immunosuppresseurs. En revanche, le rejet chronique humoral, lui, ne tire presque aucun bénéfice de ces avancées thérapeutiques. Ainsi, le taux de cette pathologie reste inchangé avec une perte d'environ 4% par an (Meier-Kriesche et al. 2004; Nankivell & Kuypers 2011).

Cinq stratégies sont principalement utilisées en thérapeutique clinique (Levine & Abt 2011) (Figure 5) :

(1) Action sur les lymphocytes B (LB): Inhiber la prolifération des LB à l'aide d'immunosuppresseurs tel que le Mycophenolate Mofetil, ou dépleter les LB avec du Rituximab qui est un anticorps anti-CD20, sachant que le CD20 est une molécule de surface des LB (Kohei et al. 2011).

(2) Action sur les LT : Inhiber la prolifération des LT avec du Mycophenolate Mofetil associé à des stéroïdes ou bien inhiber la voie de signalisation de l'IL-2 et donc l'activation des LT avec des inhibiteurs de la calcineurine comme la ciclosporine ou le tacrolimus. Il est aussi possible de dépleter les LT avec de l'ATG (anti-thymocyte globulin), anticorps polyclonal provenant de lapins immunisés avec du tissu thymique humain (Y. Liu et al. 2010).

(3) Action sur les anticorps (Montgomery et al. 2011) : Eliminer les anticorps, principaux acteurs des rejets humoraux par plasmaphérèse ou immuno-adsorption. La plasmaphérèse est souvent utilisée en association avec un autre traitement comme l'IVIG, le Rituximab ou encore le Bortezomib... Une autre possibilité est de diluer ces anticorps par administration d'IVIG. Les IVIG sont des IgG (90%) issus du plasma de plusieurs donneurs sains. Ces injections permettent d'inhiber l'activation et la différenciation des lymphocytes, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoire et la fixation du complément. De plus, les IgG neutralisent les anticorps anti-HLA circulants et se fixent aux récepteurs FcγRIIB qui induisent une action inhibitrice.

(4) Action sur les plasmocytes : éliminer les plasmocytes par l'utilisation du Bortezomib, inhibiteur du protéasome. Actuellement, c'est la seule molécule connue qui agit sur les plasmocytes et permet de diminuer la quantité d'anticorps circulants (Everly et al. 2008; Walsh et al. 2010).

(5) Action sur le complément : un dernier acteur du rejet humoral est le complément. L'Eculizumab est un anticorps dirigé contre la protéine C5 du complément. La fixation de l'anticorps à la molécule C5 permet d'inhiber la cascade du complément et donc d'empêcher la formation du complexe d'attaque membranaire. Ce traitement, encore très récent, montre des premiers résultats assez intéressants (H. Wang et al. 2007; Locke et al. 2009) mais des études sur des cohortes plus importantes sont nécessaires afin de se faire une réelle idée du bénéfice de cette thérapie.

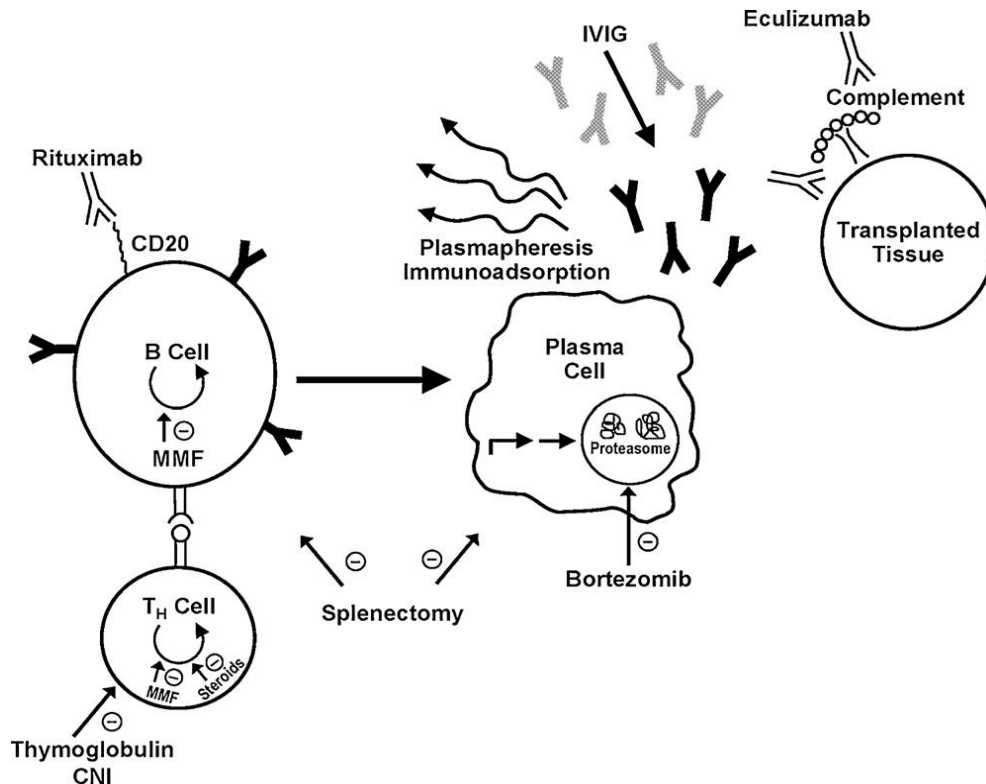


Figure 5: Diverses stratégies de traitement du RCHA.

D'après (Levine & Abt 2011), (CNI =calcineurine inhibitor, MMF=Mycophénolate Mofetil)

Malgré la diversité des traitements existants, il n'y a toujours pas de solution efficace pour enrayer le RCHA. En effet, ces traitements ont une efficacité observée surtout sur les rejets aigus. Un autre problème causé par les traitements est que leur utilisation sur du long terme cause des effets secondaires comme la néphrotoxicité, l'augmentation de maladies cardiovasculaires, de diabète, de cancers et d'infections. De plus, le diagnostic du RCHA n'est établi que lorsque le rejet est très avancé, ce qui rend l'action des traitements d'autant plus difficile pour agir à son encontre. Une meilleure connaissance des mécanismes intervenant dans ce rejet, mais également la découverte de biomarqueurs spécifiques, sensibles et pronostiques du rejet chronique, permettrait certainement d'améliorer les

traitements et de les adapter en fonction des patients afin d'améliorer la survie du greffon à long-terme.

4. La tolérance

a. Les mécanismes de la tolérance

Les mécanismes de tolérance sont de deux types. Il y a la tolérance centrale et la tolérance périphérique qui elle-même est divisée en plusieurs mécanismes.

La tolérance centrale est basée sur le principe de sélection positive et négative des LT au cours de leur développement dans le thymus (Billingham et al. 1953). La sélection positive, qui a lieu dans le cortex, permet aux lymphocytes CD4+CD8+ reconnaissant les molécules de CMH du Soi via leur TCR d'être conservés, les autres étant éliminés. En fonction de la classe du CMH reconnue, les lymphocytes qui étaient alors double positif vont perdre soit le CD4 soit le CD8 et ainsi devenir simple positif. Quant à la sélection négative, elle a lieu dans la médulla du thymus. Elle permet de supprimer les LT reconnaissant les molécules de CMH présentant un peptide du Soi avec une trop forte affinité, il n'y a donc plus, normalement, de LT auto-réactifs : c'est la tolérance centrale. Malheureusement, certains LT reconnaissant fortement des antigènes du soi subsistent et sont responsables des maladies auto-immunes (Roitt & Cooke 1987).

La tolérance périphérique, quant à elle, utilise les fonctions que le système immunitaire a développé naturellement afin d'empêcher l'attaque des LT auto-réactifs (visant les antigènes du Soi) qui ont réussi à échapper à la sélection négative, ou bien de limiter l'activation des lymphocytes T effecteurs. Plusieurs mécanismes ont ainsi été décrits (Figure 6) :

(1) L'ignorance : ce mécanisme est dû à la séquestration des antigènes dans des zones qui ne sont pas accessibles aux cellules immunitaires (cerveau ou testicule), ou bien à l'expression trop faible d'antigènes. Le phénomène d'ignorance a été mis en évidence dans un modèle d'allogreffe cardiaque chez une souris dépourvue d'organe lymphoïde secondaire. Dans ce modèle, la rencontre entre les LT et les CPA ne se fait pas (Lakkis et al. 2000).

(2) La délétion : en plus de la sélection dans le thymus, il existe également une délétion en périphérie. Ce phénomène est dû à l'interaction entre le CMH-peptide avec le TCR en

l'absence des signaux de co-stimulation ce qui aboutit à l'apoptose des cellules via la voie Fas/FasL. En ce qui concerne la délétion, des modèles d'allogreffes cardiaques et pancréatiques ont démontré que l'utilisation d'agents bloquant la voie de co-stimulation ou de rapamycine bloquant la voie de prolifération due à l'IL2, induit l'apoptose des lymphocytes et ainsi un état de tolérance (Wells et al. 1999).

(3) L'anergie : ce phénomène est également dû à l'absence de signal de co-stimulation et il est caractérisé par l'incapacité du LT activé de proliférer lors d'une nouvelle stimulation. Cependant, l'apport exogène d'IL2 peut lever cette anergie. L'anergie a également pu être démontrée en transplantation via la rencontre préalable entre les LT du receveur avec les APC du donneur associée à un blocage de la co-stimulation *in vitro*, ce qui rend ces cellules anergiques. Ainsi leur transfert lors d'une allogreffe rénale chez le primate induit une tolérance (Bashuda et al. 2005).

(4) La régulation/suppression : il existe, parmi les cellules du système immunitaire, des cellules dites régulatrices ou suppressives : les LT régulateurs naturels ou induits qui sont dans les deux cas $CD4^+CD25^+$. Ces cellules possèdent des propriétés immunosuppressives permettant d'inhiber l'activation ou la fonction des LT auto-réactifs. L'importance des cellules régulatrices en transplantation a également été démontrée à plusieurs reprises (X. C. Li & Turka 2010). Ces cellules régulatrices seront plus amplement décrites dans la IVème partie de cette introduction.

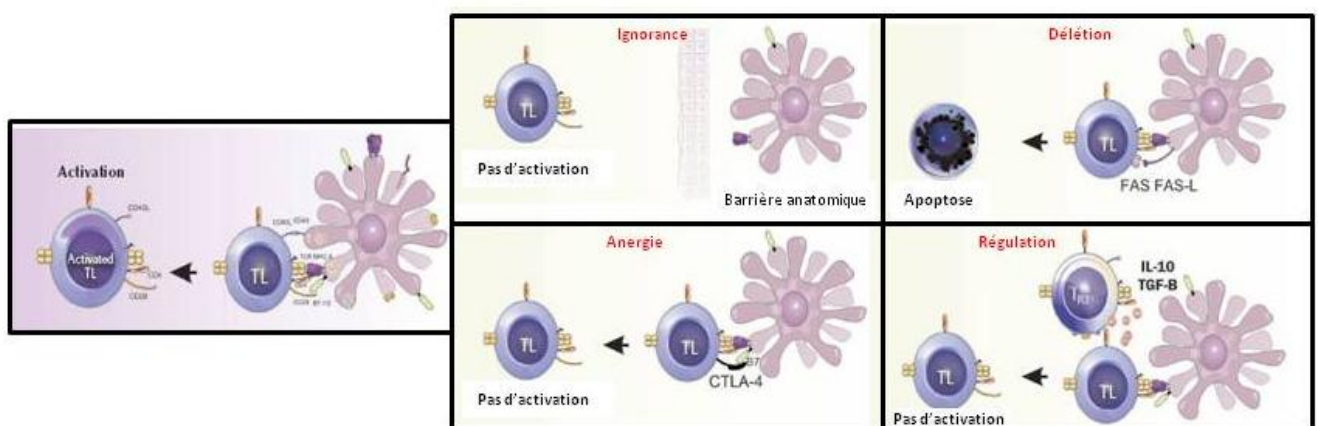


Figure 6: Mécanismes de tolérance périphérique.
D'après (de Souza et al. 2010).

b. La tolérance en transplantation

En transplantation, le but ultime est d'éteindre le système immunitaire de manière spécifique afin qu'il ne rejette pas le greffon qui constitue un organe étranger, c'est-à-dire induire un état de tolérance. De manière générale, l'induction de tolérance en transplantation est donc ainsi définie : c'est l'absence de réponse immunitaire délétère vis-à-vis des antigènes du donneur exprimée par le greffon en l'absence de traitements immunosuppresseurs tout en conservant la capacité de répondre contre des antigènes étrangers comme par exemple des pathogènes microbiens. Cette tolérance aurait de multiples avantages : l'arrêt des immunosuppresseurs de manière chronique et donc la diminution d'effets secondaires comme la toxicité au niveau du greffon (Nankivell et al. 2003), les infections opportunistes (Singh 2005) et les cancers (Dantal et al. 1998).

En transplantation chez l'animal, les études menées par Billingham, Brent et Medawar ont permis de définir l'état de tolérance « vrai » qui consiste en « une greffe fonctionnelle, sans lésions histologiques de rejet en l'absence d'immunosuppression » (Billingham et al. 1953). En revanche, chez l'homme, la définition de la tolérance « vrai » n'est pas possible étant donné que l'on ne peut pas avoir accès à l'histologie du greffon. Il a donc été défini un état de tolérance appelé « opérationnel » car celui-ci ne se base que sur des critères fonctionnels du greffon et est ainsi définie «une bonne fonction du greffon rénal en absence de traitement immunosuppresseur depuis plus d'un an » (Roussey-Kesler et al. 2006).

De multiples études ont décrit des états de tolérance chez le petit animal tel que le rongeur. En revanche, de grandes différences au niveau du système immunitaire font que, chez le primate non humain et chez l'homme, cet état apparaît beaucoup plus difficile à induire. De plus, la nature de l'organe greffé joue également un rôle dans l'induction de tolérance. En effet, en clinique chez l'homme, on observe que dans le cadre de la transplantation hépatique, la tolérance semble beaucoup plus fréquente que dans le cadre de la transplantation rénale (Lerut & Sanchez-Fueyo 2006; Martínez-Llordella et al. 2007; Roussey-Kesler et al. 2006).

Afin d'induire un état de tolérance chez le primate non humain et chez l'homme, les mécanismes de tolérance centrale ont été utilisés. Le but de l'induction de cette tolérance était que les lymphocytes sortant du thymus ne reconnaissent pas les antigènes du donneur comme étranger. Elle peut être obtenue en induisant un chimérisme hématopoïétique (Sykes & Sachs 1988; Kawai et al. 2008; Jacobsen et al. 1994; Butcher et al. 1999). Malheureusement, ces études n'ont montré qu'une faible réussite avec des risques souvent supérieurs aux bénéfices,

comme par exemple de développement de GVHD (Graft versus host disease) lors de greffe de moelle osseuse (Barton-Burke et al. 2008).

De nombreuses études ont également utilisé les mécanismes de la tolérance périphérique afin d'induire une tolérance du transplant :

(1) la déplétion des lymphocytes T chez le primate non humain (Myburgh et al. 1980; Myburgh et al. 2001) et chez l'homme (Strober et al. 1989; Strober et al. 2000).

(2) le blocage de la co-stimulation chez le primate non humain (Kirk et al. 1997; Poirier et al. 2010) et chez l'homme (Christian P Larsen et al. 2010; Pestana et al. 2012). Cependant, il faut noter qu'actuellement, ces protocoles sont utilisés en traitement sur du long-terme et non pas pour l'induction de tolérance.

(3) la régulation de l'activation des lymphocytes par l'infusion de cellules T anergiques ou régulatrices. Ces études ont donné de bons résultats chez la souris lors de greffe de peau (Sagoo et al. 2011). Chez le primate non humain, une étude a montré que les animaux tolérants avaient des lésions de rejet chronique (Bashuda et al. 2005). Plus récemment, il a été montré que les LB pouvaient aussi avoir des capacités régulatrices (Vitale et al. 2010; Blair et al. 2010). Leur utilisation pourrait donc être envisagée.

Ainsi, toutes ces études ont montré que l'induction de tolérance s'avère difficile. En effet, dans certains cas où la tolérance a été obtenue, les protocoles d'induction sont pas assez fiables afin d'être utilisés en routine clinique. Il est donc indispensable de mieux comprendre les mécanismes de rejet afin de développer de nouvelles stratégies avec des résultats plus homogènes.

Bien que l'induction de tolérance ne soit actuellement pas possible par des protocoles de routine chez l'homme, plusieurs cas de tolérance spontanée qui ont été décrits chez des patients ayant arrêté leurs traitements par non-compliance (Orlando et al. 2010). Quelques équipes dans le monde travaillent sur l'étude de ces patients opérationnellement tolérants afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans ce phénomène.

Depuis plusieurs années maintenant, notre équipe travaille sur une des plus grandes cohortes regroupant 27 patients opérationnellement tolérants. Nous participons également activement dans la recherche d'une signature biologique de la tolérance via deux programmes européens (*Reprogramming the immune system for establishment of tolerance* et *Indice of Tolerance*) et

un programme américain (*Immune tolerance network*). Une première étude a permis de définir un profil transcriptionnel spécifique des patients tolérants avec 49 gènes différentiellement exprimés chez les patients tolérants en comparaison aux individus normaux, aux patients stables avec un traitement immunosuppresseur et aux patients avec un rejet chronique (Brouard, Mansfield, Braud, Li Li, Giral, S. Hsieh, Baeten, M. Zhang, Ashton-Chess, Braudeau, F. Hsieh, et al. 2007). Nous avons également montré une diminution de cellules T CD8+CD28- cytotoxique et une augmentation des cellules T régulatrices CD4+CD25+CD127- FoxP3+ chez les patients tolérants (Louis et al. 2006; Baeten et al. 2006). Plus récemment, nous avons mis en évidence que chez les patients opérationnellement tolérants, il y avait une signature B importante ainsi qu'une augmentation du nombre de cellules B en périphérie avec un profil régulateur/inhibiteur (Braud et al. 2008; Pallier et al. 2010). Enfin, une dernière étude menée par notre équipe a montré que les lymphocytes B des patients tolérants surexpriment le miR-142-3p qui serait ainsi impliqué dans cet état de tolérance.

Ces dernières études nous laissent à penser que les cellules régulatrices T et B jouent probablement un rôle majeur dans la tolérance et nous incitent à étudier plus en détail ces cellules afin de comprendre comment elles interviennent dans la tolérance opérationnelle.

Il ne faut pas oublier que plusieurs facteurs cliniques et biologiques influencent le risque de développer une dysfonction chronique. En effet, un receveur ayant développé un ou plusieurs rejets aigus va avoir une probabilité plus forte d'avoir un RCHA (Opelz & Döhler 2008), de même, la présence d'anticorps anti-HLA de classe I et II (Süsal et al. 2009) ou la présence d'anticorps anti-MICA (Major-histocompatibility-complex (MHC) class I-related chain A) (Y. Zou et al. 2007) avant transplantation sont également d'importants facteurs de risque pour la perte du greffon. De plus, le retard du démarrage du greffon (Giral-Classe et al. 1998), le taux de CD30 soluble (Pelzl et al. 2002) dans le sérum, la créatinémie (Bruce Kaplan et al. 2003) ainsi que le poids du greffon et du receveur (Giral, Foucher, et al. 2010) vont également avoir un impact sur la survie à long-terme du greffon. Tous ces facteurs de risque nous orientent sur le profil du patient transplanté. Cependant ces indicateurs ne sont pas suffisants et nécessitent d'être associés à d'autres biomarqueurs plus précis et spécifiques de chaque dysfonction chronique. Ainsi, de nombreuses études sont menées afin de connaître les profils des patients en fonction de leur statut. Ces études sont réalisées dans le but de découvrir des biomarqueurs non invasifs, diagnostics, ou bien pronostics.

II. Les biomarqueurs

1. Définition

La notion de biomarqueur a été définie en 2001 par le Biomarker definitions working group. Ce terme est issu de la contraction de marqueur biologique et est ainsi défini : « un biomarqueur est une caractéristique qui est mesurée objectivement et évaluée comme un indicateur d'un processus biologique normal ou pathologique, ou d'une réponse pharmacologique à une intervention thérapeutique » (Atkinson et al. 2001).

Ainsi, un biomarqueur est donc utilisable comme outil diagnostique pour définir des patients atteints d'une maladie (taux de glucose élevé dans le sang pour le diabète), il peut également être un outil afin de déterminer le stade d'une maladie. Le biomarqueur peut aussi être un indicateur pronostic d'une maladie, ou alors informer sur la réponse à un traitement.

En transplantation rénale, de nombreux biomarqueurs sont déjà quotidiennement utilisés. En effet, la mesure régulière de la protéinurie et de la créatinémie permet d'évaluer la fonction rénale en les comparant à des valeurs de référence. Cependant, lorsque ces valeurs s'éloignent des valeurs de référence, c'est le signe d'une dégradation fonctionnelle qui, dans le cas du rejet chronique, est déjà irréversible. La biopsie réalisée en cas de dégradation ne vient ensuite que confirmer et préciser le diagnostic.

L'intérêt de nombreuses études est donc de définir de nouveaux biomarqueurs qui permettraient de réaliser un diagnostic précoce avant l'apparition de lésions irréversibles, et ainsi de pouvoir empêcher la dégradation du greffon. Certaines études cherchent également des biomarqueurs qui seraient plutôt pronostiques. De tels marqueurs biologiques permettraient de déterminer les patients ayant un risque de développer des rejets et ainsi d'adapter un traitement plus particulier pour ces patients à risque. De plus, la recherche s'intéresse également à découvrir de bons biomarqueurs qui sont peu ou pas invasifs à partir du sang ou des urines.

Parallèlement, comme je l'ai évoqué précédemment, certains patients ont arrêté leurs traitements sans développer de rejet, et sont devenus « opérationnellement » tolérants. L'étude de leur profil transcriptomique ou protéomique pourrait permettre de définir des biomarqueurs de tolérance qui identifieraient ainsi les patients qui ne développeraient pas de rejet suite à l'arrêt des traitements. De plus, ces études pourraient également permettre de comprendre les

mécanismes de tolérance et ainsi d'aider à développer de nouvelles stratégies d'induction de tolérance.

2. Les biomarqueurs des dysfonctions chroniques

a. Le C4d et les anticorps anti-donneur

Afin de définir le rejet chronique, plusieurs marqueurs sont déjà utilisés. Ces marqueurs, cités précédemment, la créatinémie et la protéinurie sont trop tardifs car ils indiquent que le greffon rénal n'est déjà plus fonctionnel, et ils ne sont pas spécifiques non plus. Ils ne permettent donc pas de traiter le rejet en conséquence. D'autres marqueurs faisant partie intégrante de la définition du rejet chronique à médiation humorale sont aussi utilisés tels que le C4d qui se dépose dans les capillaires péritubulaires et les anticorps anti-donneur circulants. Cependant ces marqueurs ne sont pas parfaits. En effet, on peut observer des dépôts de C4d associés à des allo-anticorps sans qu'il y ait pour autant des lésions tissulaires : c'est le phénomène d'accommodation. Une revue récente pose bien le pour et le contre de l'utilisation du C4d comme biomarqueur (Cohen et al. 2012). Parmi les points « contre », il mentionne, entre autres, que le C4d n'est pas sensible pour le diagnostic du RCHA et qu'il est totalement inutile en cas de transplantation ABO-incompatible car dans ce type de transplantation, il y a automatiquement des dépôts de C4d. A l'inverse, plusieurs études ont montré qu'il peut y avoir des signes de RCHA mais sans C4d (Sis et al. 2007; Loupy et al. 2011). Un groupe de travail a donc été mis en place lors de la dernière conférence de Banff 2011 afin de mieux définir le C4d et son implication dans le rejet à médiation humorale et ainsi affiner la classification des rejets.

La présence d'anticorps spécifiques du donneur fait également partie intégrante de la définition du RCHA. La présence de tels anticorps au moment de la transplantation est un réel facteur de risque de développer un rejet à médiation humorale d'où l'importance de leur détection avant transplantation (Riethmüller et al. 2010). Cependant, dans certains cas, il est possible d'observer la présence de C4d mais sans détection de DSA. Ce phénomène peut être dû à une quantité d'anticorps inférieure à la limite de détection car un bon nombre de ceux-ci sont immunoadsorbés par le greffon lui-même. De plus, il faut savoir que les DSA peuvent être présents pendant longtemps en présence de fonction stable du greffon. Ainsi, les deux

biomarqueurs cités dans la définition du RCHA sont intéressants mais nécessitent d'être utilisés avec beaucoup de précautions.

Dans le domaine de la transplantation, l'idéal serait donc de définir de nouveaux biomarqueurs peu invasifs voir même non-invasifs afin de diagnostiquer de manière précise et fiable une pathologie du greffon ou un rejet, ce qui permettrait d'évaluer le devenir du greffon et d'adapter les traitements de la meilleure manière possible.

b. Les nouveaux biomarqueurs des dysfonctions chroniques

De nombreuses études ont analysé les profils transcriptomiques, protéomiques et histologiques de patients ayant eu une greffe rénale. Grâce à celles-ci, un bon nombre de biomarqueurs sanguins, urinaires ou histologiques ont pu être associés au rejet aigu (Spivey et al. 2011; Anglicheau & Suthanthiran 2008). Cependant, à l'inverse, l'identification de nouveaux biomarqueurs du RCHA semble beaucoup plus difficile. En effet, les quelques biomarqueurs identifiés sont rarement spécifiques du RCHA : ce sont des biomarqueurs de dysfonctions chroniques qui ne différencient pas les dysfonctions immunes, des non-immunes. Le tableau 1 récapitule les principaux biomarqueurs de dysfonctions chroniques identifiées.

En 2003, deux études par microarray ont été réalisées afin de comparer les profils transcriptomiques de patients transplantés. La première étude réalisée par Scherer et al. a comparé l'expression de gène dans des biopsies de patients transplantés sains au moment du prélèvement qui ont ensuite développé un rejet chronique ou alors qui sont restés avec une fonction stable de leur greffon (Scherer et al. 2003). Ils ont ainsi pu isoler 10 gènes différenciellement exprimés entre les deux groupes. Cependant, cette étude est réalisée sur les critères de Banff 97 donc avec une définition incomplète non spécifique du rejet chronique..

L'équipe de Walz (Donauer et al. 2003) a, quant à elle, comparé l'expression de gène à partir de tissu rénal de patients avec une néphropathie chronique du transplant, de patients transplantés stables et de patients avec une pathologie rénale. Ils ont ainsi identifié 571 gènes différenciellement exprimés entre les 3 groupes. Les protéines correspondant à ces gènes sont principalement des protéines du métabolisme cellulaire, du transport, de la signalisation, de l'activation, de la transcription, de l'adhésion et de la réponse immune.

Dans ces deux études, le nombre de patients utilisés reste faible. Il est donc nécessaire de confirmer l'expression de ces gènes dans des études avec une plus grande cohorte et avec des diagnostics plus précis en accord avec la dernière classification de Banff afin d'avoir des groupes avec des pathologies du transplant bien définies en accord avec les diagnostics réalisés quotidiennement en clinique et donc de pouvoir éventuellement utiliser ces gènes comme biomarqueurs.

D'autres études ont utilisé des microarray afin de comparer les profils d'expression de gènes dans les biopsies de patients transplantés stables avec des patients atteints de néphropathie chronique d'allogreffe (Hotchkiss et al. 2006; Mas et al. 2007). Leurs résultats ont permis d'identifier des gènes, cependant, leurs études utilisent le terme de CAN et incluent donc les dysfonctions chroniques immunes et non immunes et ils n'identifient donc pas de nouveaux gènes spécifiques du rejet chronique humoral actif qui pourrait être utilisé comme biomarqueur.

De nombreuses études ont également permis de trouver des gènes différentiellement exprimés dans la fibrose interstitielle associée à l'atrophie tubulaire (FI/AT) (Cheng et al. 2006; Maluf et al. 2008; Rödder et al. 2009) mais aussi des microRNA (Scian et al. 2011) qui sont des petites molécules d'ARN qui se lient à des ARNm cibles afin de les dégrader.

Parmi les molécules identifiées, on retrouve le CTGF (Connective tissue growth factor), une molécule importante dans la prolifération cellulaire, la synthèse de collagène et le chemotaxis et qui est surexprimé dans la FI/AT (Cheng et al. 2006). On observe également une surexpression de chemokines, et de récepteurs de chemokines, d'interleukine et des récepteurs aux interleukines (Maluf et al. 2008) ainsi que la matrix metalloprotease-7 (MMP-7) elle-même impliquée dans le remodelage extracellulaire et la thrombospondin-2 (THBS-2) impliquée dans les interactions cellules-cellules ou cellules-matrice extra-cellulaire (Rödder et al. 2009). L'étude de Scian a, quant à elle, identifié 56 microRNA dont 3 ont ensuite été confirmés dans les urines des patients (Scian et al. 2011). Ces études permettent de mieux comprendre les mécanismes intervenant dans la FI/AT qui est un signe histologique couramment observé chez les patients en rejet chronique humoral. Cependant, ils ne sont toujours pas spécifiques de cette pathologie.

Une autre étude s'est intéressée à l'analyse de l'expression de gènes chez des patients ayant un rejet chronique versus des patients avec une toxicité chronique due aux immunosuppresseurs et plus précisément la ciclosporine (Koop et al. 2004). Cette étude a

permis d'identifier la laminine $\beta 2$ et le TGF- β comme étant surexprimée lors de toxicité due à la ciclosporine comparé aux patients avec un rejet chronique. Cependant, dans cette étude seuls 26% des patients ont du C4d et il n'y a aucune donnée sur les DSA, ainsi on ne peut pas connaître exactement le profil des rejets chroniques. Bien que cette étude ne permette pas de définir des gènes du rejet chronique, elle reste tout de même intéressante car elle différencie des dysfonctions chroniques liées à la toxicité des immunosuppresseurs des autres dysfonctions chroniques.

c. Les biomarqueurs du RCHA

La dernière classification de Banff a permis d'affiner les recherches en ciblant beaucoup mieux les groupes étudiés. Ainsi, plusieurs études ont donc été réalisées en séparant bien le groupe des RCHA des autres groupes.

Une molécule à laquelle plusieurs équipes se sont intéressées depuis une décennie est le CD30 soluble. Il s'agit d'une glycoprotéine exprimée à la surface des cellules. Une stimulation des cellules CD30⁺ engendre le clivage de la molécule qui devient ainsi soluble et détectable dans le sérum. Le taux de CD30 soluble (sCD30) est mesuré avant et après transplantation. Il est généralement élevé avant transplantation puis diminue après transplantation. En revanche, ce taux augmente lors d'une dysfonction rénale (Pelzl et al. 2003; Süsal et al. 2011) et permet donc d'y associer un épisode de rejet à médiation humorale. Malgré l'intérêt que peut représenter ce biomarqueur, on peut noter qu'il semblerait que les protocoles d'induction et les traitements immunosuppresseurs influencent les taux de sCD30, ce qui est préjudiciable pour l'élaboration d'un diagnostic fiable à partir de cette mesure.

Notre équipe a réalisé deux études en comparant les profils d'expression de plusieurs molécules entre des patients RCHA (avec glomérulopathie du transplant + C4d + DSA) et d'autres groupes de patients. Une première étude de 2008 (Braudeau et al. 2008) a montré que dans les cellules mononucléées du sang périphérique, l'expression du Toll-like receptor 4 (TLR4) et d'une protéine adaptatrice, de la voie de signalisation de TLR4, le myeloid differentiation factor 88 (MyD88) sont toutes les deux surexprimées chez les patients ayant un RCHA en comparaison à des volontaires sains, des patients non transplantés ayant une dysfonction rénale d'origine non-immunologique, et des patients transplantés opérationnellement tolérants ou stables. Plus précisément, la molécule TLR4 est augmentée dans les monocytes de patients RCHA en comparaison à des volontaires sains ou des patients

opérationnellement tolérants mais, également, dans les biopsies de patients en RCHA versus des patients transplantés avec une histologie normale ou avec une glomérulopathie du transplant. Cette étude nécessite également d'être confirmée sur plus de patients afin de valider ces résultats. Cependant, on peut dire que ces données nous informent sur l'éventualité d'une composante de l'immunité innée via la voie des TLR dans le RCHA.

La deuxième étude de notre équipe a porté sur l'analyse de l'expression d'un des composants de l'immunoprotéasome, PSMB10 (immunoproteasome- β subunit 10), dans le RCHA (Ashton-Chess et al. 2010). On a ainsi montré que PSMB10 était sur exprimé dans les biopsies de patients en RCHA versus les patients transplantés avec une biopsie normale, ou avec de la fibrose interstitielle et de l'atrophie tubulaire, ou encore avec des signes de toxicité dues aux inhibiteurs de la calcineurine. De plus, cette étude montre que le taux de PSMB10 est augmenté dans les cellules mononucléées du sang périphérique par rapport à des patients transplantés stables. Cependant, cette analyse précise également qu'il faut absolument tenir compte d'autres facteurs qui influencent le taux de PSMB10 tels que le temps post-transplantation auquel est réalisé le prélèvement mais également le genre du receveur, car chez les hommes, le taux de PSMB10 est plus élevé que chez les femmes. Il semblerait donc que PSMB10 pourrait constituer un bon biomarqueur du RCHA, mais il est malgré tout important de confirmer ces résultats sur une plus grande cohorte.

Enfin, une étude récente, a montré par immunohistochimie, que dans les biopsies de patients en RCHA, il y avait une plus grande quantité de molécule c-jun phosphorylées et donc activées dans les cellules endothéliales des capillaires péri-tubulaires contrairement aux patients normaux ou aux patients avec juste de la fibrose interstitielle associée avec une atrophie tubulaire (Kobayashi et al. 2012). La molécule c-jun est un facteur de transcription qui est un des constituants du complexe d'activation AP-1 impliqué dans l'inflammation ainsi que dans la fibrose. Ces résultats suggèrent que l'activation des cellules endothéliales via c-jun contribue au développement du rejet chronique humoral.

Toutes ces études, principalement réalisées au cours de la dernière décennie, ont donc permis d'identifier un bon nombre de biomarqueurs (résumé dans le tableau 1). Cependant, la spécificité des biomarqueurs pour le rejet chronique humoral actif est encore rare. En effet, très peu d'études ont été réalisées en utilisant la classification de Banff 2009 (Sis et al. 2010). De plus, le nombre de patients généralement utilisé est assez faible. Ainsi il serait donc

intéressant de confirmer la plupart des résultats sur de plus grandes cohortes afin d'être sûr de la puissance de certains biomarqueurs qui semblent, à première vue, intéressants.

Enfin, on peut préciser que les biomarqueurs potentiels précédemment cités ont tout de même permis de mieux comprendre les mécanismes d'action à l'origine des dysfonctions chroniques du greffon.

Biomarqueurs	Type d'échantillon biologique utilisé	Pathologies concernées	Avantages/Intérêts	Inconvénients	Références
C4d	biopsie	RCHA	Fait partie intégrante de la définition actuelle du RCHA	Peu sensible. Inutile en cas de transplantation ABO-incompatible	Cohen et al. 2012
Anticorps anti-donneur	sang	RCHA	Fait partie intégrante de la définition actuelle du RCHA	Pas toujours observable du fait de l'immuno-adsorption par le greffon	Riethmüller et al. 2010
sCD30	sérum	Rejet humoral	Augmente lors d'une dysfonction rénale	Taux influencé par les protocoles d'induction et les traitements IS	Peldi et al. 2003 Süsal et al. 2011
Pool de 10 gènes	biopsie	Néphropathie chronique de l'allogreffe (CAN)	Différencie les patients stables des patients avec une CAN	Nécessité d'analyser les 10 gènes en même temps. Étude basée sur la classification de Banff 97. Petite cohorte de patients	Scherer et al. 2003
Pool de 571 gènes	biopsie	CAN	Différencie les patients stables des patients avec une CAN	Étude basée sur la classification de Banff 97. Petite cohorte de patients	Donauer et al. 2003
CTGF/MMP7/THBS-2	biopsie	Fi/AT	Permet de diagnostiquer et évaluer la progression d'une Fi/AT	Pas spécifique du RCHA	Rödter et al. 2009
56 microRNA	Biopsie + 3 confirmé dans les urines	dysfonction chronique avec Fi/AT	Différencie les patients stables des patients avec une dysfonction chronique avec Fi/AT. 3 sont confirmés dans les urines, ils peuvent donc constituer des biomarqueurs non invasifs	Pas spécifique du RCHA	Scian et al. 2011
Laminine $\beta 2$ et TGF- β	Biopsie	Toxicité aux inhibiteurs de la calcineurine	Permet de différencier les dysfonctions chroniques due à la toxicité des CNI des autres dysfonctions	Pas spécifique du RCHA. Pas d'information sur les DSA et pas toujours d'information sur le C4d des patients en rejet chronique	Koop et al. 2004
TLR4	Sang	RCHA	Différencie les patients avec un RCHA des autres patients transplantés	Petite cohorte de patients	Braudeau et al. 2008
PSMB10	Sang et biopsie	RCHA	Différencie les patients avec un RCHA des autres patients transplantés	Petite cohorte de patients. Influence de facteurs démographiques et cliniques	Ashton-Chess et al. 2010
c-jun phosphorylé	biopsie	RCHA	Différencie les patients avec un RCHA des patients transplantés sables ou avec une Fi/AT	Petite cohorte de patients	Kobayashi et al. 2012

Tableau n°1 : récapitulatifs des principaux biomarqueurs de dysfonctions chroniques

III. Les molécules Tribbles

1. Les Tribbles chez la *Drosophile*

La première description de la protéine Tribbles a été réalisée par Seher et Leptin en 2000 (Seher & Leptin 2000). Cette protéine doit son nom à des petits animaux extra-terrestres ronds et hyper-prolifiques dans la série télévisée Star Trek (Figure 7a) car ils font penser au marquage du mésoderme observé chez la drosophile mutante pour Tribbles (Figure 7b).

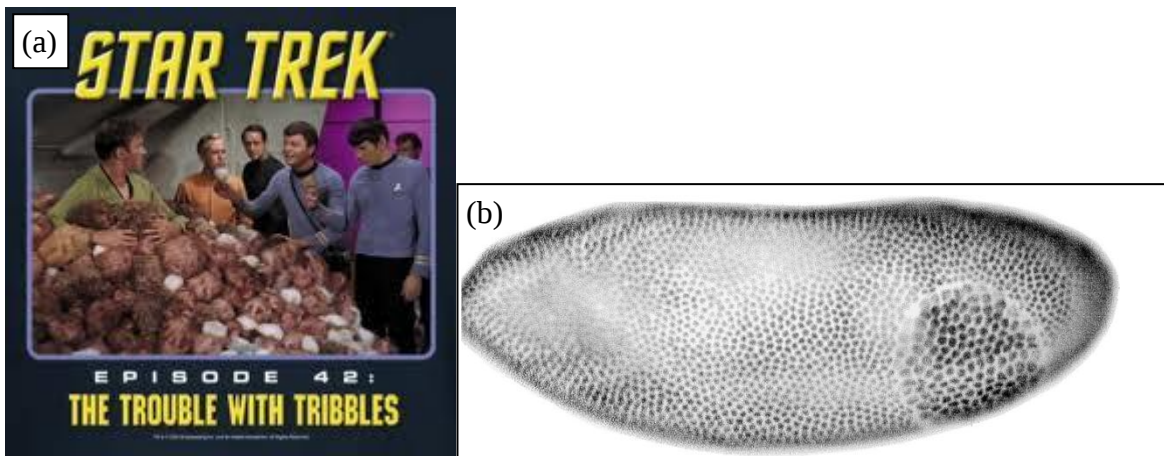


Figure 7: (a) Affiche de l'épisode de Star Trek avec les Tribbles. (b) Marquage d'un embryon de drosophile mutante pour Tribbles.

Au cours de l'année 2000, plusieurs études ont été publiées sur la protéine Tribbles chez la *Drosophile* et plus particulièrement lors du développement embryonnaire. Pendant le développement embryonnaire, toutes les étapes sont particulièrement bien orchestrées et synchronisées. Une des premières étapes du développement embryonnaire est la gastrulation qui consiste en des larges mouvements de cellules de l'extérieur vers l'intérieur de l'embryon. Toutes les divisions cellulaires, parfaitement minutées, font intervenir de nombreuses molécules comme les cyclines mais également des phosphatases dont String/cdc25 (Edgar et al. 1994). Deux équipes ont montré via l'utilisation de mutants pour Tribbles (défaut de Tribbles), que l'invagination du mésoderme était plus précoce chez ces mutants en comparaison avec des embryons sauvages, et que la surexpression de Tribbles, par contre, inhibait la mitose (Grosshans & Wieschaus 2000; Seher & Leptin 2000). L'étude menée par Grosshans a également démontré que la protéine avait une forte homologie avec les sérine-thréonine kinases mais sans l'activité de phosphorylation que possèdent ces kinases. Une

autre équipe a démontré via une sur-expression de Tribbles que cette protéine ralentissait le passage de la phase G2 à la phase M du cycle cellulaire (Mata et al. 2000). Ils ont également démontré que l'activité de Tribbles était opposée à celle de String et que Tribbles induisait la dégradation de String via le protéasome. Ces trois études ont ainsi mis en évidence que chez la *Drosophila*, Tribbles permettait de ralentir la progression du cycle cellulaire via la dégradation de la molécule pro-mitotique String par le protéasome. Une autre étude, a décrit Tribbles comme interagissant avec Slbo, mais également comme étant à l'origine de sa dégradation via son ubiquitination (Rørth et al. 2000). Il faut savoir que Slbo est, chez la *Drosophila*, l'homologue des facteurs de transcription de la famille C/EBP chez les mammifères et elle possède un rôle essentiel dans la migration cellulaire pendant l'oogenèse.

Chez la *Drosophila*, Tribbles semble donc avoir un rôle fondamental pendant la morphogène en s'associant à d'autres protéines et en induisant ainsi leur dégradation par le protéasome.

Les protéines Tribbles découvertes chez la *Drosophila*, ont leurs homologues chez les mammifères. Trois protéines ont ainsi été décrites et plus ou moins étudiées : il s'agit de Tribbles homolog 1 (aussi appelée Tribbles-1 ou TRIB1) ; 2 (aussi appelée Tribbles-2 ou TRIB2) ou 3 (aussi appelée Tribbles-3 ou TRIB3).

Dans cette introduction, je vais plus particulièrement vous présenter les données obtenues sur l'étude de Tribbles-1.

2. Tribbles-1 chez les mammifères

a. Structure de TRIB1

La protéine Tribbles-1 est codée par un gène porté par le chromosome 8 au locus 8q24.13 et composé de 3 exons (Figure 8).



Figure 8: Structure du gène Trib1.

Les rectangles rouges représentent les exons et les rectangles blancs représentent les UTR (régions non traduites)

TRIB1 est composée de trois parties principales : un domaine central dénommé kinase-like et de chaque côté, les domaines N- et C- terminaux. Une étude publiée en 2006 a précisé que le domaine kinase-like était très largement conservé au cours de l'évolution contrairement aux deux autres domaines N- et C-terminaux qui eux, comportent plusieurs modifications à l'exception de quelques acides aminés qui ont été conservés (Hegedus et al. 2006).

Les études précédemment citées, réalisées chez la *Drosophile*, rapportent que les Tribbles de *Drosophile* possèdent un domaine avec une homologie partielle au domaine kinase sans en avoir la fonction. Chez les mammifères, il en est de même pour la protéine Tribbles-1 dont aucune activité catalytique caractéristique des kinases n'a été démontrée. En effet, le domaine central de Tribbles-1 ne possède pas les résidus nécessaires à l'activité kinase comme par exemple celui qui permet la fixation de l'ATP (Adénosine triphosphate).

Bien que ce domaine soit incapable de fournir une activité catalytique, il reste cependant indispensable à la fonction de la protéine. En effet, ce domaine permet à Tribbles-1 d'avoir un rôle de scaffold protéine, ce qui signifie que Tribbles-1 joue son rôle via des interactions avec d'autres protéines (Figure 5). Ces interactions ont été décrites dans plusieurs études dont l'étude de Sung et al. (Hye Youn Sung et al. 2007a). Il faut savoir que les scaffold protéines sont des protéines qui interagissent avec plusieurs partenaires d'une même voie de signalisation afin de former un complexe qui permet ainsi au processus de signalisation d'avoir lieu (Good et al. 2011).

Le domaine N-terminal quant à lui est constitué des 60 à 80 résidus qui sont, pour une bonne partie, des sérines et des prolines (Hegedus et al. 2007), ce qui confère à la protéine une courte durée de vie. Ce domaine est également responsable de la localisation principalement nucléaire de la molécule.

En ce qui concerne le domaine C-terminal, celui-ci est composé de 25 résidus (Hegedus et al. 2007) et est également un site de fixation pour d'autres protéines et ces interactions permettent de stabiliser Tribbles-1, qui est une protéine qui se dégrade rapidement (Endre Kiss-Toth et al. 2004).

La figure n°9 représente de manière schématique la protéine TRIB1 avec ses 3 domaines associés à leurs fonctions décrites.

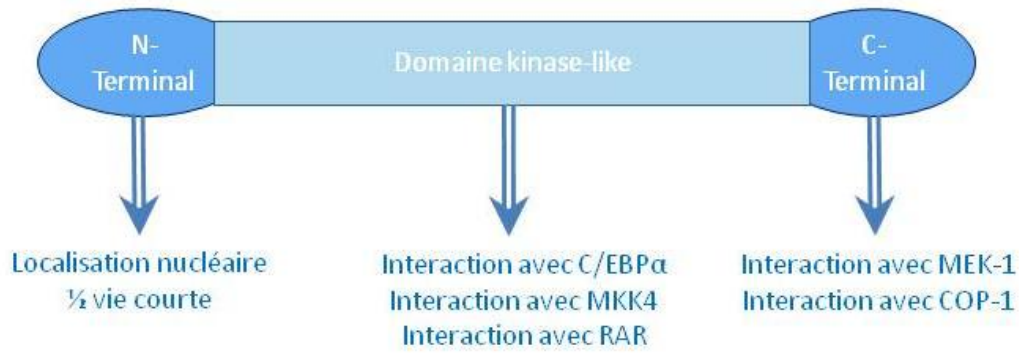


Figure 9: Structure schématique de TRIB1 avec ses 3 domaines et leurs fonctions associées.

b. Mode d'action de TRIB1

La protéine TRIB1 est exprimée dans de nombreux tissus parmi lesquels le muscle squelettique, la glande thyroïde, le pancréas, les cellules mononucléées du sang périphérique, la moelle osseuse (Endre Kiss-Toth et al. 2004) et le tissu adipeux (Bi et al. 2008). D'après les données actuelles présentées dans la littérature, on peut sans conteste dire que la molécule TRIB1 possède des mécanismes d'action particulièrement complexes, très finement régulés et dépendant à la fois de l'environnement mais également du type cellulaire dans lequel elle est exprimée. En effet, il a été démontré que TRIB1 intervenait à des moments bien précis étant donné que, en réponse à un stimulus inflammatoire, l'ARNm codant pour TRIB1 est surexprimé de manière tout à fait transitoire dans tous les types cellulaires analysés mais différemment en fonction du type cellulaire (H Y Sung et al. 2006). De plus, une étude menée sur des cellules souches embryonnaires de souris a montré que l'ARNm de TRIB1 faisait partie des ARNm ayant une demi-vie très courte de moins d'une heure (Sharova et al. 2009). Or, il a été décrit qu'une demi-vie d'ARNm courte est souvent associée à une fonction qui doit survenir à un moment très précis. Les fonctions cellulaires qui peuvent ainsi être concernées sont, par exemple, le cycle cellulaire et le développement (fonctions dans lesquelles la protéine Tribbles chez la *Drosophila* a déjà été impliquée) mais également la croissance, la différenciation ou bien encore la signalisation.

L'action de TRIB1 intervient donc via ses interactions avec de multiples protéines qui possèdent des fonctions très différentes les unes des autres (Endre Kiss-Toth et al. 2004). Ce qui explique que ces interactions soient très variées ; c'est qu'elles sont dépendantes à la fois

du type cellulaire mais également de l'espèce animale ainsi que de l'environnement (Endre Kiss-Toth et al. 2004; Ostertag et al. 2010; Yamamoto et al. 2007).

Le fait que la fonction de TRIB1 soit organisme-spécifique a été montré par plusieurs équipes. En effet, une étude réalisée sur une lignée de cellules humaines immortalisées, les HeLa (pour Henrietta Lacks), a montré l'inverse de ce qui était observé chez la *Drosophila*. En l'occurrence, dans les HeLa, les protéines Tribbles ne semblent avoir aucun effet sur le cycle cellulaire (Endre Kiss-Toth et al. 2004). Il en est de même en ce qui concerne la fertilité, car chez des souris KO pour TRIB1, les femelles sont infertiles (Yamamoto et al. 2007) alors que chez la *Drosophila* déficiente en Tribbles, des naissances de mouches mutantes sont observées bien que seulement 14% de ces mouches atteignent l'âge adulte (Mata et al. 2000).

Cependant, malgré les disparités observées inter-espèces, il persiste tout de même quelques similarités entre la *Drosophila* et les mammifères. En effet, chez la *Drosophila*, il a été montré que Tribbles interagissait avec Slbo et cette interaction aboutit à la dégradation de Slbo lui-même (Rørth et al. 2000). De manière similaire, chez l'homme, il a été montré que TRIB1 interagissait avec C/EBP α , qui est l'homologue de Slbo, et cette interaction aboutit également à sa dégradation (Dedhia et al. 2010). Cette activité très similaire chez la *Drosophila* et chez l'homme est très certainement liée à la forte conservation de la protéine au cours de l'évolution.

De nombreuses études réalisées au cours de ces dix dernières années ont impliqué TRIB1 dans plusieurs pathologies. En effet, TRIB1 semble jouer un rôle dans plusieurs formes de cancer (Yokoyama & T. Nakamura 2011). Mais il apparaît également que cette protéine serait aussi impliquée dans des pathologies plutôt liées aux triglycérides tels que l'infarctus du myocarde (Kathiresan et al. 2008; J. Wang et al. 2008; Willer et al. 2008). Enfin, elle a aussi été décrite dans le rejet de greffe à long-terme (Ashton-Chess et al. 2008; Alvarez et al. 2009). Le rôle que joue TRIB1 dans le cancer semble très dépendant de ses interactions avec d'autres protéines. Par contre, le mode d'action de TRIB1 dans les pathologies liées aux triglycérides n'est pour le moment pas encore bien défini.

*c. Rôles de TRIB1 dans les pathologies**i. Cancer**Amplification du gène TRIB1*

L'étude de certains types de tumeurs a conduit à l'observation de double minutes (dmin)-circulaires qui sont des amplifications extra-chromosomales de fragments d'ADN spécifiques et acentriques. Plus précisément, il existe certains virus qui intègrent leur ADN au sein de l'ADN de sa cellule hôte au niveau de sites bien spécifiques qui sont appelés les « sites d'intégration rétrovirale ». En fonction du site où l'intégration virale a lieu, l'expression du gène viral sera plus ou moins favorisée. Si cette expression est plutôt favorisée, elle peut ainsi aboutir à la tumorigénèse via l'augmentation de l'expression de certains proto-oncogènes situés à proximité (Lewinski et al. 2006). Ainsi, dans de nombreuses études, le gène TRIB1 a été cité comme étant un site d'intégration rétrovirale et parallèlement il a aussi été décrit comme étant surexprimé dans le type de cancer bien spécifique qu'est la leucémie myéloïde aigue (AML) (G. Jin et al. 2007; Röthlisberger et al. 2007; Rücker et al. 2006; Dedhia et al. 2010). En effet, dans plusieurs études sur la leucémie myéloïde aigue, des aberrations chromosomiques ont été observées. Ces aberrations apparaissent sous la forme de dmin qui est donc de l'ADN circulaire extra-chromosomal issu de l'excision d'un fragment de chromosome (Storlazzi et al. 2004; Storlazzi et al. 2006; Kamath et al. 2008), ou alors de LEE (Hirano et al. 2008) qui signifie Large Extrachromosomal Element qui correspond à de larges dmin. Dans les AML avec des dmin observées, le fragment d'ADN qui est amplifié correspond au locus 8q24 porté par le chromosome 8. Ce fragment d'ADN comporte le gène MYC qui fait une taille de 4,3 mega-bases mais également, comme je l'ai dit précédemment, le gène TRIB1. Plusieurs études ont ainsi montré que le gène TRIB1 était souvent amplifié contrairement au gène MYC qui est présent sans être amplifié (Storlazzi et al. 2004; Storlazzi et al. 2006). Ces données suggèrent que TRIB1 joue probablement un rôle dans l'AML contrairement à MYC. D'autres études, réalisées sur l'AML mais également dans le cas de cancers folliculaires ou ovariens, n'ont pas mis en évidence la présence de dmin, cependant ils ont tout de même observé une augmentation de l'expression de TRIB1 (Röthlisberger et al. 2007; Rücker et al. 2006; Puskas et al. 2005; Puiffe et al. 2007). L'augmentation de

l'expression de TRIB1 n'est pas expliquée mais il serait intéressant de connaître son origine dans ces cas de cancer.

De manière contradictoire, dans une autre étude menée sur l'analyse de cancer œsophagien, aucune amplification de l'expression du gène TRIB1 n'a pu être mise en évidence (X.-P. Huang et al. 2006). Ils n'ont également pas pu montrer une augmentation du taux de la protéine. Enfin, une autre étude s'est intéressée à l'analyse transcriptomique de 285 cas d'AML en comparaison à des individus sains (Gilby et al. 2010). Dans cette étude, ils ont réalisés des clusters en fonctions des profils d'expression de gène des patients souffrant d'AML et contrairement à ce qui a pu être démontré dans de multiples études antérieures, une diminution de l'expression de TRIB1 a été notée.

Ainsi lorsque l'on regarde tous les résultats obtenus par de multiples équipes différentes, on peut penser que la surexpression de TRIB1 est très variable en fonction du type de cancer. Ainsi TRIB1 ne constitue pas un biomarqueur général du cancer, mais il peut cependant indiquer la présence éventuelle d'un sous-type bien précis de cancer.

De plus, dans le cas des AML, la disparité des résultats peut être due soit à des différences de profil des patients soit à des techniques expérimentations variables. D'autres études complémentaires pourraient être nécessaires afin de déterminer si TRIB1 a une réelle implication dans les cancers et plus particulièrement dans l'AML.

Plusieurs équipes étudiant l'implication de TRIB1 dans les cancers, ont montré que TRIB1 agissait par l'intermédiaire d'interaction avec d'autres protéines issues de différentes voies de signalisation telle que la voie MEK/ERK (Yokoyama et al. 2010).

Interaction TRIB1-12-LOX

Une des premières études relatant une interaction entre TRIB1 et une molécule impliquée dans les cancers a été réalisée par Tang et al. (Tang et al. 2000). En effet, cette équipe a procédé à un screening avec le système de levures double-hybrides afin de trouver des partenaires d'interaction d'une isoforme de la 12-lipoxygénase (12-LOX) dans des cellules provenant d'un carcinome épidermoïde humain A431. Cette étude a ainsi montré que TRIB1 et 12-LOX interagissaient ensemble. Or, 12-LOX est une enzyme qui métabolise l'acide arachidonique en acide 12(S)-hydroxyeicosatétraénoïque (12(S)-HETE) et qui est très largement représentée dans de nombreux types de tumeurs humaines avec un rôle probablement dans la progression de cette tumeur ainsi que dans la formation de métastases. Il a été montré que le

rôle de 12-LOX dans le cancer intervient probablement via la production de 12-HETE qui va phosphoryler ERK et ainsi induire deux phénomènes majeurs dans le développement des cancers : la survie cellulaire et la prolifération (Agarwal et al. 2009). En associant ces résultats avec ceux provenant d'autres études ayant montré que TRIB1 activait ERK, on peut spéculer sur le rôle de TRIB1 dans les cancers via son interaction avec l'enzyme 12-LOX activant ainsi la voie de signalisation ERK. Il faut cependant prendre cette hypothèse avec beaucoup de précaution étant donné que l'interaction TRIB1 et 12-LOX n'a encore jamais été confirmée par aucune autre étude.

Interaction TRIB1-MEK1

Le rôle de TRIB1 dans plusieurs pathologies cancéreuses mais principalement dans l'AML a été également étudié par l'équipe de Nakamura (G. Jin et al. 2007). Dans leur étude, ils ont utilisé des cellules leucémiques de souris ou des cellules de la moelle osseuse. Ils ont ainsi pu montrer que TRIB1 permettait d'activer une voie de signalisation des MAP kinases suite à un stimulus inflammatoire. Cette activation permet de stimuler la prolifération des cellules mais également d'inhiber l'apoptose.

Le rôle de TRIB1 sur la voie des MAP kinase a déjà été décrite précédemment par plusieurs études dans des conditions normales c'est-à-dire non pathologiques. Dans une de ces études, il a été mis en évidence que TRIB1 pouvait interagir avec MEK-1 et MKK4 et que ces interactions permettaient à la fois de stabiliser TRIB1, qui est une protéine qui se dégrade assez rapidement, mais également d'inhiber l'activité d'AP-1 (Endre Kiss-Toth et al. 2004) qui est un facteur de transcription jouant un rôle dans la différenciation, la prolifération et l'apoptose.

L'interaction MEK-1/TRIB1 a été étudiée au cours de plusieurs études dans une situation normale mais aussi dans des situations pathologiques. Dans ces dernières, il a été montré que l'interaction TRIB1/MEK1 avait lieu via le domaine C-terminal de TRIB1 et que cette interaction aboutissait à la phosphorylation d'ERK induisant ainsi l'auto-renouvellement et activant la prolifération des cellules de la moelle osseuse de souris exprimant Hoxa9/Meis1 (deux molécules impliquées dans le développement de leucémie) (G. Jin et al. 2007; Yokoyama et al. 2010). Il a aussi été montré que le gène Trib1 coopérait avec Hoxa9/Meis1 afin d'induire l'AML et d'accélérer la progression de la maladie (G. Jin et al. 2007). Un peu plus tard, la même équipe a démontré que c'est un motif bien particulier de TRIB1 qui est

important pour réaliser l'interaction avec MEK1 et qui induit ainsi la phosphorylation de la protéine kinase ERK afin d'aboutir de manière indirecte à l'induction de l'AML (Yokoyama et al. 2010). Ces résultats confirment ceux déjà publiés par de l'équipe de Mes-Masson en 2007 qui avait montré que TRIB1 jouait un rôle dans le cancer ovarien en induisant l'invasion cellulaire provoquée par l'activation de ERK, ce qui conduisait à la progression du cancer (Puiffe et al. 2007). L'association des données issues de toutes ces études semble conférer un rôle important à la protéine TRIB1 dans le développement et la progression de divers types de cancers en agissant principalement sur la voie des MAP kinase et plus particulièrement au niveau de la voie de signalisation MEK1/ERK.

De plus, la majeure partie de ces études a montré que lorsque TRIB1 était lié à une forme de cancer, on observait également une augmentation du taux de TRIB1. L'action de TRIB1 pourrait donc être dépendante de la concentration en protéine. Cette hypothèse est soutenue par le fait que chez la *Drosophile*, l'activité de Tribbles était très dépendante du ratio Tribbles/string. Aussi, chez les mammifères, il a été rapporté que l'activation, ou, au contraire l'inhibition de voie de signalisation comme la voie des MAP kinase est liée au ratio entre les MAPK et les scaffold protéines. Ainsi, il est possible que, dans les situations de cancer, la surexpression du gène TRIB1 induise une augmentation importante en protéines et inverse ainsi la balance MAPK/Scaffold protéine. Il y a alors une activation anormale de la voie de signalisation induisant la phosphorylation d'ERK.

Interaction TRIB1-C/EBP α

Une autre molécule à été décrite comme intervenant dans l'induction d'AML. Il s'agit de la molécule C/EBP α qui semble interagir avec TRIB1. C/EBP α (pour CCAAT-enhancer-binding protein) est un facteur de transcription qui est impliqué dans de nombreuses fonctions comme le contrôle de la prolifération, la croissance et la différenciation. Il a déjà été démontré qu'une diminution du taux de C/EBP α était très fortement associée à l'induction d'AML (Mueller & Pabst 2006). L'étude de Dedhia et al. a ainsi démontré que, dans des lignées cellulaires myéloïdes de souris, TRIB1 se lie à C/EBP α et induit sa dégradation par l'intermédiaire du protéasome, ceci empêchant la différenciation myéloïde (Dedhia et al. 2010). Ces données sont confirmées par une étude de Yokoyama et al. qui montre que TRIB1 interagit avec MEK-1 résultant en la phosphorylation d'ERK mais aussi induisant la dégradation de C/EBP α qui lie TRIB1 via la partie N-terminale de son domaine central kinase-like (Yokoyama et al. 2010). Une troisième étude a aussi présenté cette interaction TRIB1- C/EBP α (Gilby et al.

2010) dans le cancer. Cette étude précise que l'interaction a lieu au niveau du noyau de la cellule et par une étude *in silico*, ils montrent également que le promoteur de TRIB1 possède plusieurs domaines potentiels pour la liaison de C/EBP α . Cependant cette dernière étude montre des effets opposés à ceux observés dans les autres études, c'est-à-dire, ils montrent que TRIB1 inhibe la prolifération d'une lignée cellulaire leucémique Me-1 par une action pro-apoptotique via l'inhibition de la voie de signalisation JNK. Ainsi, cette étude confèrerait plutôt à TRIB1 des effets suppresseurs de tumeur et donc n'induisant pas d'AML (Gilby et al. 2010). Le même groupe a également montré qu'une augmentation du taux de facteur de transcription C/EBP α dans des cellules HeLa induisait une augmentation de l'expression de TRIB1. Celle-ci serait probablement due à la fixation de C/EBP α sur les sites de fixation présents au niveau du promoteur de TRIB1. L'hypothèse soutenue par cette étude est que C/EBP α induit l'expression de TRIB1 et qu'ensuite TRIB1 vient inhiber la voie de signalisation de JNK ce qui permet une protection face à l'AML.

Des différences aussi importantes entre diverses études nous obligent à nous poser des questions quant à la véracité de certains résultats. Cependant, on peut préciser qu'il a été montré que la fonction de TRIB1 était très ciblée et intervenait à des moments très précis. De plus, la protéine n'est pas très stable et son expression est très type-cellulaire et organisme dépendante. Toutes ces informations nous permettent de penser que les différences observées peuvent être dues à l'utilisation de lignées cellulaires différentes. Les techniques utilisées pour étudier le rôle de TRIB1 doivent également être prisent en compte.

Interaction TRIB1-RAR α

Récemment, une étude japonaise a montré que TRIB1 interagissait avec RAR α (Rétinoic acid receptor α) via son domaine kinase-like. De plus, TRIB1 semble inhiber l'activité de RAR α probablement via cette interaction (Imajo & Nishida 2010). Or, il a été décrit que les acides rétinoïdes, qui se lient à leurs récepteurs RAR, inhibent la prolifération et stimulent l'apoptose (Hashimoto & Shudo 1991). De part leurs fonctions, les rétinoïdes sont donc des molécules inhibitrices de tumeurs (Altucci et al. 2007; Freemantle et al. 2003) et sont utilisées dans études cliniques anti-cancéreuses (Paroni et al. 2011). On peut donc émettre l'hypothèse que TRIB1 induit des cancers via sa fixation avec RAR et ainsi en inhibant l'activité anti-tumorale de RAR.

Interaction TRIB1-COP1

Une dernière étude implique TRIB1 de manière indirecte dans le développement de cancer. En effet, il a été montré que TRIB1 interagissait avec COP1 qui est une E3 ubiquitine ligase (Qi et al. 2006), un inhibiteur de la p53. Or, lorsque le gène de la p53 est muté, la protéine perd ainsi ses capacités anti-prolifératives et ses fonctions pro-apoptotiques ce qui aboutit à l'induction de cancer (Goh et al. 2011). Ainsi, on peut émettre l'hypothèse que l'interaction entre TRIB1 et COP1 inhibe la p53, ce qui aurait le même effet que la mutation de la p53 et alors serait à l'origine de certains cancers.

Ainsi, d'après toute la littérature concernant TRIB1, il semble que cette protéine ait un rôle central dans cette pathologie cancéreuse en activant les voies de signalisation induisant ainsi la prolifération et l'inhibition de l'apoptose. La figure 10 représente un schéma récapitulatif des hypothèses concernant l'implication de TRIB1 dans les cancers.

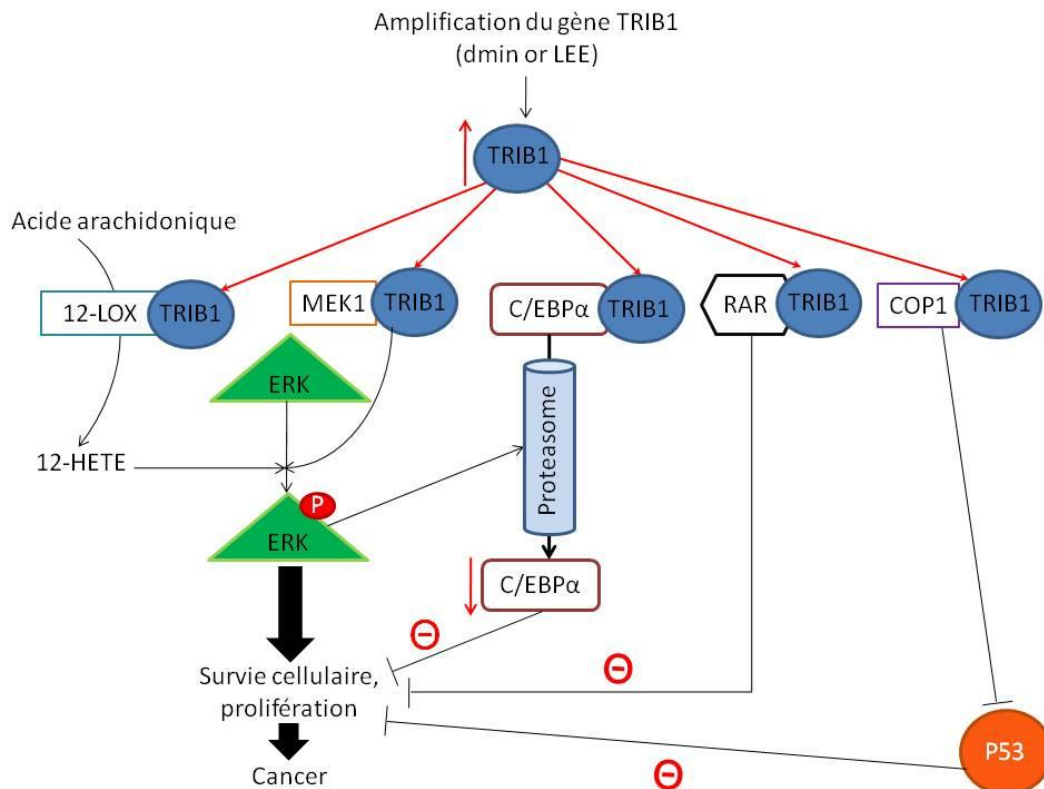


Figure 10: Représentation schématique de l'implication de TRIB1 dans le développement des cancers.

ii. Infarctus du myocarde

L'infarctus du myocarde est une pathologie liée à la mort de certaines cellules musculaires du cœur due à un manque d'oxygénation. L'absence d'oxygénation est causée par la réduction de l'afflux sanguin par les artères coronaires qui sont bouchées. Un des constituants à l'origine de l'occlusion des artères coronaires sont les lipides. Ainsi le taux de lipides plasmatiques constitue un biomarqueur du risque de développer un infarctus du myocarde.

En plus d'être impliqué dans le cancer, il semblerait que TRIB1 soit également un acteur dans cette pathologie qu'est l'infarctus du myocarde. En effet, en 2008, deux études publiées dans *Nature Genetics* ont réalisé des méta-analyses à partir de 3 études pangénomiques européennes différentes (Genome-wide association studies : GWAS) afin de déterminer, chez l'homme, des locus associés à la concentration lipidique dans le sang (Kathiresan et al. 2008; Willer et al. 2008). Ces deux études ont identifié des SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) à proximité du locus 8q24 du gène TRIB1 comme étant liés à la dérégulation du taux de triglycérides dans le sang. Les allèles situés à proximité de TRIB1 comme le SNP rs17321515 sont associés à une diminution de la concentration en triglycérides et ainsi à une diminution du risque de maladies des artères coronaires pouvant aboutir à un infarctus du myocarde (Willer et al. 2008). Par la suite, de nombreuses études, sur l'analyse du génome humain, réalisées sur d'autres populations ont également retrouvé le locus de TRIB1 lié à des dérégulations du taux de lipides plasmatiques (incluant les triglycerides, mais également le cholestérol) (J. Wang et al. 2008; Hegele et al. 2009; Garcia-Rios et al. 2011; Weissglas-Volkov et al. 2010; Z. Zhang, Tao, et al. 2011). En s'appuyant sur toutes ces études on peut donc penser que TRIB1 est largement associé à l'homéostasie lipidique.

Etant donnée l'importance de TRIB1 dans l'homéostasie lipidique, deux études ont étudié les mécanismes moléculaires qui interviennent dans ce contrôle. Une première étude réalisée sur une lignée cellulaire de souris ayant un phénotype proche des adipocytes (les 3T3-L1) a montré que TRIB1 est un inhibiteur de l'adipogenèse. D'après leurs données, il semblerait que TRIB1 agisse comme un régulateur rétroactif négatif car il est sur-régulé de manière transitoire pendant l'adipogenèse et donc son augmentation permet d'inhiber l'adipogenèse (Naiki et al. 2007).

La seconde étude réalisée par Burkhardt et al. chez la souris a mis en évidence que la surexpression de TRIB1 dans le foie induisait une diminution du cholestérol et des triglycérides et qu'à l'inverse, lorsqu'il y a une sous-expression de TRIB1, on observe alors

une augmentation du cholestérol et des triglycérides (principalement les VLDL) (Burkhardt et al. 2010). Dans cette étude, ils montrent que TRIB1 agit directement sur l'expression des gènes de la lipogenèse dans le foie. Ces résultats sont tout à fait cohérents avec ceux obtenus par une autre étude du génome qui a montré que le locus de TRIB1 précédemment décrit, était associé à la concentration plasmatique d'enzymes hépatiques (Chambers et al. 2011).

TRIB1 serait donc associé à un risque diminué de développer un infarctus du myocarde via la diminution de certains lipides dans le sang.

iii. Inflammation

De récentes études mettent en avant l'implication de TRIB1 dans le processus d'inflammation. En effet, il a été montré *in vitro* que TRIB1 était sur-régulé suite à un stimulus inflammatoire via le LPS dans des cellules humaines aortiques du muscle lisse (Hye Youn Sung et al. 2007a). Ils ont également mis en évidence une augmentation de TRIB1 dans les cellules du muscle lisse d'artère provenant de patients souffrant de cardiopathie ischémique qui est une pathologie en partie due à la libération de cytokines et chemokines pro-inflammatoires. Enfin, une dernière étude réalisée dans un modèle de souris obèses a montré que l'expression de TRIB1 dans le tissu adipeux est stimulé par des signaux pro-inflammatoires (Ostertag et al. 2010) mais également que TRIB1 induit la sécrétion de certaines cytokines pro-inflammatoires. Cette dernière fonction serait due à la fixation de TRIB1 à Rel A (sous-unité du facteur de transcription NF- κ B) qui permettrait ainsi de contrôler l'expression de cytokines. Or, un contexte pro-inflammatoire est en partie impliqué dans le développement d'une pathologie auto-immune qu'est le diabète de type 2, diabète lié en partie à l'obésité qui est un facteur de risque bien connu.

Ainsi, ces deux études impliquent clairement TRIB1 dans des pathologies inflammatoires variées. Il faut savoir que la cardiopathie ischémique peut aboutir à un infarctus du myocarde maladie dans laquelle TRIB1 est également impliquée. De plus, la cardiopathie ischémique et le diabète sont deux pathologies en partie dues aux lipides. On peut alors penser que TRIB1 joue un rôle central dans les pathologies liées de manière plus ou moins directe avec le métabolisme des lipides.

3. Tribbles-2 et Tribbles-3 chez les mammifères

a. Tribbles-2

Tribbles-2 (aussi appelé TRIB2) est une protéine codée par un gène porté par le chromosome 2 au locus 2p24.3 (Figure 11).



Figure 11: Structure du gène Trib2.

Les rectangles rouges représentent les exons et les rectangles blancs représentent les UTR (régions non traduites)

Wilkin et al. ont été les premiers à décrire cette protéine chez le chien. Ils l'ont découverte car elle est sur-réglée lors de l'induction de la prolifération par des agents mitogènes dans la thyroïde (Wilkin et al. 1996). Par la suite, ils ont montré que TRIB2 possédait plusieurs sites de phosphorylation et qu'il s'agissait d'une protéine cytoplasmique très labile (Wilkin et al. 1997). TRIB2, qui possède 41% d'homologie avec TRIB1, est une protéine qui est principalement exprimée dans les lymphocytes (Endre Kiss-Toth et al. 2004). De la même manière que TRIB1, TRIB2 est une protéine kinase-like avec un domaine central qui comporte des homologies avec des kinases mais sans activité kinase et son expression est fortement régulée suite à un stimulus inflammatoire (H Y Sung et al. 2006) mais également très dépendante du type cellulaire. Dans les monocytes, il a été décrit que TRIB2 permettait de réguler leur activité inflammatoire (Deng et al. 2009; Eder et al. 2008).

Tout comme TRIB1, il semblerait que TRIB2 soit impliquée dans diverses formes de cancers. En effet, une première étude a montré que TRIB2 était surexprimée dans des cas de cancer de la prostate (Bisoffi et al. 2004). Cette étude a été suivie par un bon nombre d'autres études qui ont également retrouvé TRIB2 comme étant surexprimée, dans la leucémie aigue myéloïde (Keeshan et al. 2006; Wouters et al. 2007; Keeshan et al. 2008; Argiropoulos et al. 2008; Keeshan et al. 2010), dans le mélanome malin (Zanella et al. 2010) et dans le cancer du poumon (Grandinetti et al. 2011). Plusieurs de ces études ont ainsi rapportés que, comme TRIB1, TRIB2 interagissait avec COP1 et C/EBP α ce qui induisait ainsi la dégradation de

C/EBP α par le protéasome. Il a également été démontré que TRIB2 coopérait avec Hoxa9 et Meis1 dans la promotion des leucémies ce qui est aussi le cas de TRIB1.

En plus du rôle décrit dans le cancer, TRIB2 à également été mis en évidence dans des maladies auto-immunes. En effet une étude a montré par phage display que TRIB2 constituait un auto-antigène qui était ciblé par les anticorps chez des patients souffrant d'uvéite qui est une maladie inflammatoire auto-immune (Y. Zhang et al. 2005). Des auto-anticorps dirigés contre TRIB2 ont également été retrouvé chez des patients atteints de narcolepsie associée à des crises de cataplexie. Il semblerait que cette pathologie serait peut-être partiellement causée par des phénomènes auto-immuns (Cvetkovic-Lopes et al. 2010; Kawashima et al. 2010; Toyoda et al. 2010). Enfin, une étude du génome chez l'homme à montré que la région codant pour le gène TRIB2 pouvait être impliqué dans la sclérose en plaque mais cette donnée nécessite d'être confirmée par d'autres analyses (Cavanillas et al. 2011). TRIB2 à également été impliquée dans une maladie inflammatoire des intestins qui est souvent une pathologie d'origine auto-immune (Wei et al. 2012). Dans cette maladie inflammatoire, TRIB2 est diminué via l'activation du toll-like recepteur 5. Enfin TRIB2 à aussi été décrite dans le diabète (Xie et al. 2012) et l'athérosclérose (Deng et al. 2009).

On peut donc voir qu'il existe de nombreuses corrélations entre TRIB1 et TRIB2 dans leurs modèles d'action mais également dans leurs implications dans de multiples pathologies, principalement cancéreuses et inflammatoires.

b. Tribbles-3

Tribbles-3 (aussi appelé TRIB3) est une protéine codée par un gène porté par le chromosome 20 au locus 20p12.2 (Figure 12).



Figure 12: Structure du gène Trib3.

Les rectangles rouges représentent les exons et les rectangles blancs représentent les UTR (régions non traduites)

Comme ses deux homologues TRIB1 et TRIB2, cette protéine possède un domaine central kinase-like sans activité catalytique et exerce donc son activité par l'intermédiaire

d'interactions avec d'autres protéines. Parmi les Tribbles, cette molécule est la plus étudiée des tribbles probablement car elle intervient dans d'importants mécanismes pathologiques. Elle a été décrite pour la première fois en 1999 par l'équipe de Sakata où ils ont montré qu'elle induisait la mort programmée de neurones d'où un de ses autres noms : neuronal cell death inducible putative kinase (NIPK) (Mayumi-Matsuda et al. 1999). Par la suite, de nombreuses études ont décrit des interactions avec TRIB3 induisant ainsi des pathologies.

La fonction dans laquelle TRIB3 est la plus décrite est la réponse à un stress. En effet, de nombreuses études décrivent une augmentation du taux de TRIB3 lors de divers cas de stress tels que le stress du réticulum, ou stress métabolique (privation en acides aminées ou en glucose et l'insuline) (Schwarzer et al. 2006; Carraro et al. 2010; Jousse et al. 2007). Dans ces conditions, il semblerait que l'expression de TRIB3 soit très finement régulée par des mécanismes de rétrocontrôles négatifs. En effet, en cas de stress métabolique, il va y avoir une transcription de plusieurs gènes de stress tel que CHOP (C/EBP homologous protein) et ATF4 (Activating transcription factor 4). Ces deux molécules vont se lier ensemble et induire la transcription de TRIB3 en se fixant sur le motif AARE (Amino Acid Response Elements) de son promoteur (Carraro et al. 2010). A son tour, TRIB3 va se lier au complexe CHOP/ATF4 dans le noyau et induire la dégradation d'ATF4 via le protéasome (D. Ord & T. Ord 2003; Ohoka et al. 2005; D. Ord & T. Ord 2005; Jousse et al. 2007; Carraro et al. 2010). Il a également été démontré que la surexpression de TRIB3 induisait l'inhibition de la transcription d'autres molécules de stress tel que CHOP et ASNS (Asparagine synthetase) (Jousse et al. 2007). Ce phénomène conduit à la stimulation de l'apoptose ainsi qu'à l'inhibition de la prolifération cellulaire. Cependant, certaines études montrent des effets inverses c'est-à-dire une prolifération et une inhibition de l'apoptose (Ding et al. 2008; Rzymiski et al. 2008). Deux explications peuvent expliquer cette divergence de résultats : une première est qu'il semblerait que l'effet du stress soit dépendant du type cellulaire comme le montre l'étude de Ding et al. où il n'observe pas la même réponse dans les cellules hépatiques ou les adipocytes par rapport à des cellules musculaires ou des cellules β du pancréas (Ding et al. 2008). La seconde peut être la durée du stress car l'étude de Rzymiski montre qu'un stress de courte durée n'influence pas la surexpression de TRIB3. Dans son étude, l'expression de TRIB3 n'augmente qu'à partir de 24h de stress anoxique (Rzymiski et al. 2008).

TRIB3 semblerait également impliqué dans le diabète de type II (DT2). Dans cette pathologie, l'insuline n'assure plus son rôle qui consiste à réguler la glycémie dans le sang en stockant le glucose dans les muscles, le tissu adipeux ou le foie. Dans une situation normale,

l'insuline va phosphoryler la sérine/thréonine kinase Akt et ainsi l'activer afin d'empêcher la libération du glucose des lieux de stockage vers le sang. Dans DT2, une étude a montré que TRIB3 est augmenté et inhibe Akt et donc empêche l'inhibition du relargage du glucose dans le sang (K. Du et al. 2003). Une autre étude a mis en évidence que l'augmentation de l'expression de TRIB3 se fait via le C/EBP β qui est activé lui-même par l'insuline (K. Du & Ding 2009). Plusieurs études ont également présenté des interactions entre TRIB3 et d'autres molécules qui seraient en lien le DT2. En effet, l'interaction de TRIB3 avec MLK3 (mixed lineage kinase 3) inhiberait Akt et MLK3 induirait aussi l'apoptose des cellules β du pancréas responsables de la sécrétion d'insuline (Humphrey et al. 2010). Une autre étude, réalisée chez l'homme et chez la souris, a également mis en évidence l'interaction TRIB3/ATF4 dans le DT2 et cette interaction serait à l'origine de la diminution de l'exocytose de l'insuline par les cellules β du pancréas (Liew et al. 2010). Cette dernière étude a aussi montré que la surexpression de TRIB3 induisait une diminution de la prolifération ainsi qu'une augmentation de l'apoptose des cellules β . Très récemment, l'équipe de Zhang a utilisé un modèle de rat diabétique chez lequel ils ont inhibé l'expression de TRIB3 et ils ont ainsi observé une amélioration de tous les symptômes associés au DT2 (Ti et al. 2011). Enfin, l'équipe de De Souza a montré que l'exercice physique permettait de diminuer l'expression de TRIB3 et ainsi améliorerait le diabète dans un modèle de souris (Lima et al. 2009; Matos et al. 2010).

D'autres pathologies semblent également influencées par TRIB3 telles que le cancer (Hua et al. 2011; J. Zhang, Wen, et al. 2011) où TRIB3 est augmenté suite à des conditions de stress telle que l'anoxie qui règne au cœur de la tumeur. Cependant dans les études menées sur le cancer, le rôle de TRIB3 serait l'inverse de celui observé dans le diabète. En effet plusieurs études sur le cancer utilisent le schéma suivant : tumeur $\rightarrow$ anoxie = stress $\rightarrow$ augmentation de TRIB3 $\rightarrow$ induction de prolifération et inhibition de l'apoptose $\rightarrow$ croissance tumeur (J. Zhang, Wen, et al. 2011; Rzymiski et al. 2008; Bowers et al. 2003). Une autre étude a montré que dans certaines tumeurs, TRIB3 interagissait avec CtIP, une molécule qui régule le cycle cellulaire, ce qui pourrait intervenir dans la tumorigénèse (Xu et al. 2007).

TRIB3 a aussi été retrouvée impliquée dans l'athérosclérose. Cette pathologie est en partie provoquée par une dysfonction des cellules endothéliales. Il semble que l'homocystéine induit l'expression de TRIB3 qui déphosphoryle Akt et ainsi diminue la prolifération des cellules endothéliales. TRIB3 aurait donc un rôle dans l'athérosclérose en inhibant la prolifération des cellules endothéliales (T. Zou et al. 2011).

Les trois homologues Tribbles chez les mammifères possèdent donc des ressemblances principalement par leur mode de fonctionnement qui se fait par des interactions avec des protéines kinases. Cependant, de nombreuses voies de signalisation différentes ont été décrites et on peut ainsi dire que, malgré les quelques homologues existantes entre ces trois molécules, les mécanismes par lesquelles elles interviennent ne sont pas identiques, ce qui est confirmé par la différence des pathologies qu'elles induisent. La figure 13 résume les principales implications des molécules Tribbles dans diverses pathologies chez les mammifères.

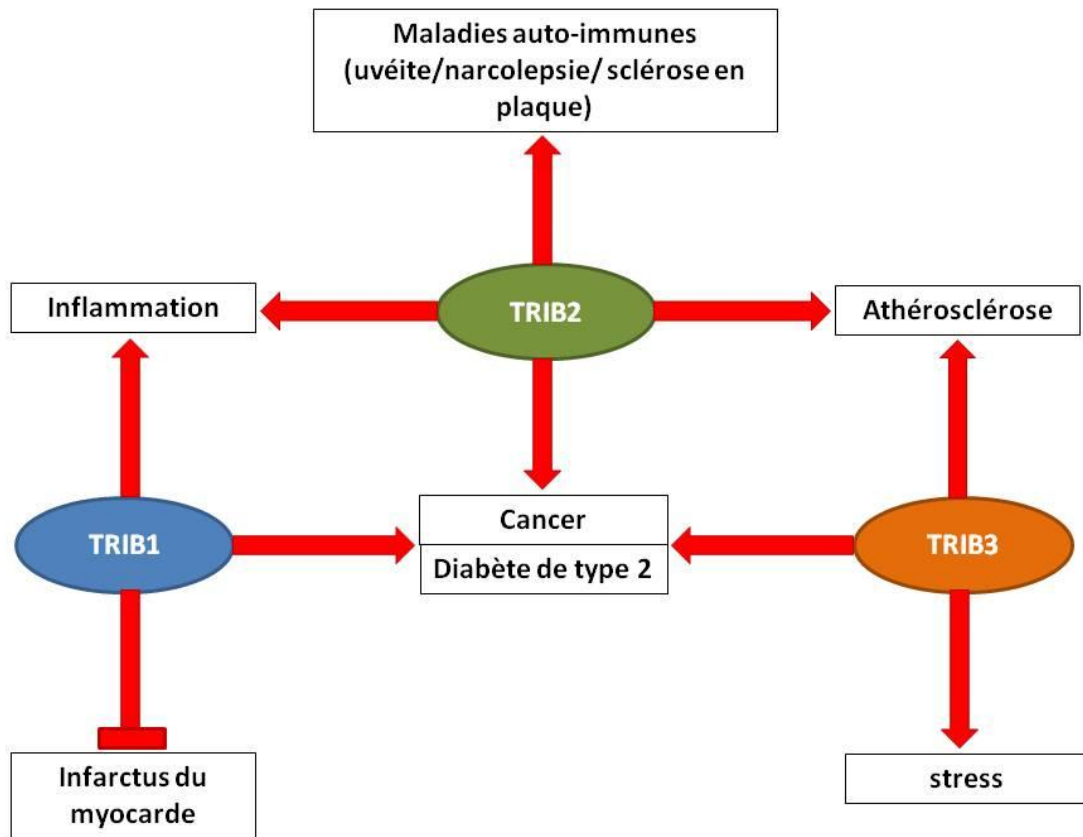


Figure 13: Implication des molécules Tribbles dans diverses pathologies chez les mammifères.

IV. Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) sont des cellules du système immunitaire indispensables afin de limiter l'attaque du Soi par nos propres cellules. Elles constituent un des mécanismes de la tolérance périphérique. En effet, au cours du développement des lymphocytes T dans le thymus, certains lymphocytes échappent à la sélection clonale et sont donc dits auto-réactifs : ils reconnaissent des antigènes du Soi. Afin de limiter l'attaque de nos propres cellules, les Tregs vont donc inhiber l'activation de ces lymphocytes T auto-réactifs. Cependant, dans certains cas, ces Tregs ne jouent plus leur rôle suppresseur, c'est alors que l'on voit apparaître, entre autres, les maladies auto-immunes.

Il existe un grand nombre de cellules T régulatrices décrites dans la littérature. Les Tregs majoritairement décrits sont les lymphocytes T régulateurs naturels $CD4^+CD25^+FoxP3^+$. Il existe également des Tregs induits de type Tr1 ou Th3. Enfin plusieurs types de cellules $CD4$ négatives ont aussi été décrites telles que les lymphocytes $CD8^+$ régulateurs, les lymphocytes T $\gamma\delta$, les lymphocytes double négatifs $CD4-CD8-$, les NKT mais également des cellules non T.

Le concept de suppression via les lymphocytes T est apparu au cours des années 70 grâce à des études réalisées par Gershon et al. (Gershon & Kondo 1970). Ils ont ainsi démontré qu'un groupe de cellules était capable d'inhiber une réponse immunitaire indépendamment des lymphocytes B. Ils ont appelé ces cellules, des lymphocytes T suppresseurs. Cette étude a mis en évidence des T suppresseurs majoritairement Lyt-2 ($CD8$). L'étude des T suppresseurs a ensuite été délaissée dans les années 80, entre autre, faute de marqueurs spécifiques afin de les identifier. C'est ensuite dans les années 90 que l'étude sur ces cellules va reprendre : elles sont alors dénommées cellules T régulatrices.

1. Les lymphocytes T $CD4^+$ naturels

a. Le phénotype des Tregs

Bien que la caractérisation des lymphocytes T régulateurs naturels ait énormément progressé depuis les années 90, elle reste cependant imparfaite, du moins, chez l'homme. En effet, chez la souris un marquage relativement simple permet de les isoler, il s'agit du marquage

CD4⁺CD25⁺CD45RB^{low}. Le CD25 étant la sous-unité α du récepteur à l'IL-2. L'expression du CD25 à la surface des Tregs a été décrite pour la première fois par Sakaguchi et al. (Sakaguchi et al. 1995) chez la souris où ils ont montré que la déplétion des cellules CD4⁺CD25⁺ induisait des désordres auto-immuns. Par contre, chez l'homme, une forte expression du CD25 n'est pas uniquement caractéristique des Tregs car il est également augmenté dans les lymphocytes T suite à une activation (Fontenot, Rasmussen, L. M. Williams, et al. 2005). L'identification du facteur de transcription FoxP3 a ensuite eu un impact considérable sur l'identification des Tregs. Chez la souris, il constitue un marqueur de plus afin d'affiner la sélection des Tregs. Cependant, chez l'homme, bien que le FoxP3 ait permis de mieux cibler la population des Tregs, il a également été montré que ce marqueur était exprimé de manière transitoire par des cellules T activées non – régulatrices (Allan et al. 2007; Morgan et al. 2005). De plus, FoxP3 est un marqueur intracellulaire, ce qui pose problème quant à l'isolation de ces cellules pour des études fonctionnelles. Plus récemment, le CD127 a également été proposé afin de cibler cette population chez l'homme. En effet, il semblerait que l'expression du CD127, chaîne α du récepteur à l'IL-7, soit sous-réglée dans les Tregs. De plus, il a été montré qu'il existe une forte corrélation entre les cellules T CD4⁺CD25⁺CD127⁻ et l'expression de FoxP3 (Seddiki et al. 2006; W. Liu et al. 2006). Malgré cela, une autre étude a montré que chez les patients avec de l'arthrite rhumatoïde, il y a une diminution de l'expression du CD127 dans les cellules T activées (Aerts et al. 2008). De nombreux autres marqueurs ont également été proposés dont le CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4) un régulateur de l'activation T mais qui est sur-réglé dans les CD4⁺ et les CD8⁺ après activation (Read et al. 2000), le GITR (Glucocorticoid-induce tumor necrosis factor family-related gene) (McHugh et al. 2002) et LAG-3 (lymphocyte activation gene-3) (C.-T. Huang et al. 2004) également sur-réglé dans les lymphocytes T après activation. Ainsi, la plupart des marqueurs décrits pour identifier les Tregs ont le même profil que des lymphocytes T activés. Il n'y a donc toujours pas de profil fiable afin d'isoler les Tregs avec une pureté de 100%, cependant le profil CD4⁺CD25⁺CD127FoxP3⁺ semble tout de même le plus approprié afin d'étudier les Tregs.

b. Le facteur de transcription FoxP3

FoxP3 est un membre de la famille des régulateurs transcriptionnels forhead/winged-helix et est codé par un gène situé sur le chromosome X. Ce gène comporte un promoteur qui est le

site de fixation d'un grand nombre de molécules telles que c-Rel, NFAT, AP-1, RUNX (Figure 14)... La fixation de ces molécules sur le promoteur de FoxP3 influence sa transcription (Mantel et al. 2006). Le gène FoxP3 possède également 3 séquences non-codantes très conservées qui sont aussi le site de fixation de plusieurs facteurs de transcription ayant un rôle soit activateur soit inhibiteur sur la transcription (Zheng et al. 2010). La séquence non-codante 1, en coopération avec la séquence non-codante 3, est responsable de l'induction de FoxP3 dans les T CD4⁺ périphériques sous l'influence du TGF- β (Figure 14). Par contre, la séquence non-codante 2 est, quant à elle, responsable de la stabilisation de l'expression de FoxP3.

Chez l'homme, 2 isoformes ont été décrites, FoxP3A et FoxP3B, la deuxième étant dépourvue de l'exon 2, riche en proline et site de fixation de ROR α (J. Du et al. 2008). Cette deuxième isoforme a également perdu le site de fixation de NFAT situé au niveau de résidus amino-terminals (Bettelli et al. 2005).

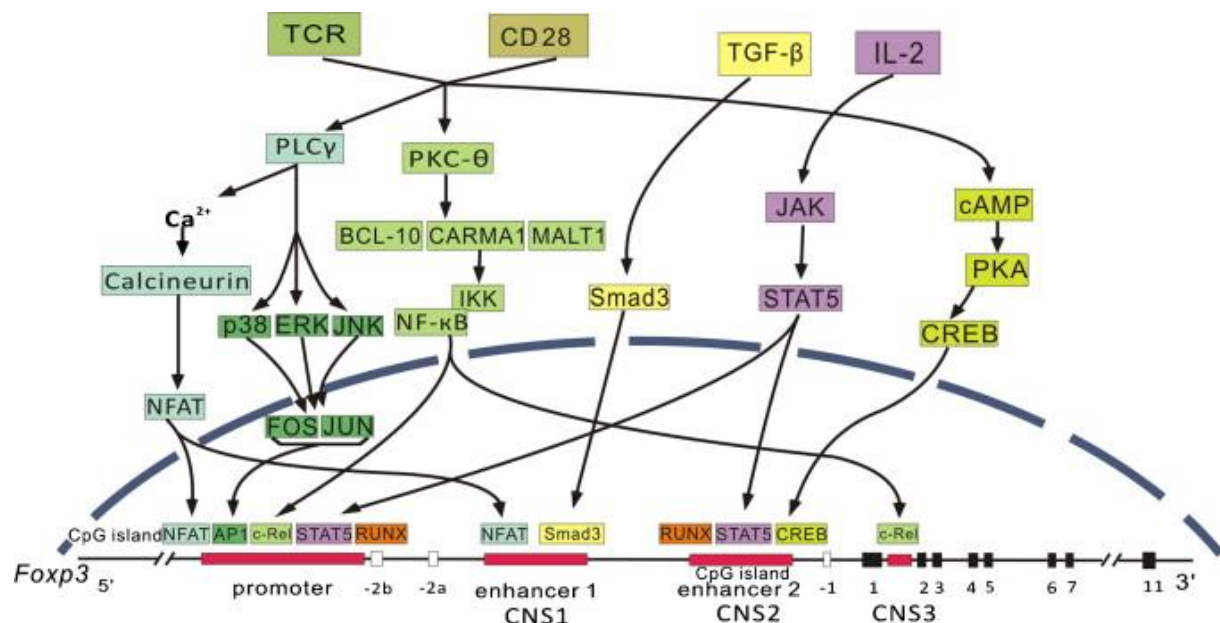


Figure 14: Structure du gène FoxP3 chez la souris ainsi que les voies de signalisation et les facteurs de transcription impliqués dans la transcription de FoxP3.
CNS = conserved non-coding sequences. D'après (Haiqi et al. 2011)

D'après une étude de Fontenot et al. (Fontenot, Rasmussen, L. M. Williams, et al. 2005), il apparaît que l'expression de FoxP3 soit limitée aux lymphocytes T $\alpha\beta$ et principalement les T CD4⁺ bien qu'il y ait certains T CD8⁺, TCD4⁺CD8⁺ et T CD4⁺CD8⁻ qui l'expriment aussi. Toujours d'après cette même étude, il semblerait que FoxP3 agisse en induisant un profil

d'expression de diverses molécules bien spécifiques des Tregs. En effet, les cellules FoxP3⁺ expriment plus de GITR et de CTLA-4 (marqueurs de Tregs) et sous-exprime FasL, IL-4... En revanche, le CD25 seul n'engendre pas de phénotype régulateur mais plutôt un profil caractéristique des T activés/effecteurs.

Etant donné l'importance de FoxP3, ils ont ensuite cherché à comprendre comment était induite l'expression de cette molécule. Pour cela ils ont utilisés des souris déficientes en CMH de classe 1 et/ou 2. A l'aide de ces modèles, il a été montré que l'induction de l'expression de FoxP3 était très largement dépendante de l'interaction TCR/CMH au sein du thymus.

Le facteur de transcription FoxP3 n'est pas ce que l'on peut appeler un marqueur parfaitement spécifique des Tregs naturels, malgré cela, il reste cependant une molécule ayant un rôle majeur au sein de cette population cellulaire. En effet, il a été montré que chez la souris (scurfy) mais également chez l'homme, lorsque le gène codant pour FoxP3 est défectueux ou absent, on observe d'importants désordres auto-immuns et inflammatoires. Chez l'homme, ces désordres sont appelés IPEX syndrome pour Immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy X-linked syndrome. En revanche, la transduction de cellules T CD4⁺CD25⁻ naïves avec des rétrovirus, permettant ainsi le transfert du gène FoxP3 fonctionnel, confère à ces cellules des capacités régulatrices au même titre que des Tregs naturels (Hori et al. 2003).

c. Le développement des Tregs

La plupart des études réalisées afin de comprendre le développement des Tregs ont été réalisées chez la souris. Cependant, on peut supposer que le processus qui intervient dans le développement des Treg humains est similaire.

Deux études successives ont permis de démontrer que les lymphocytes T régulateurs se développaient au sein du thymus. Pour cela, des souris chez lesquelles une thymectomie a été réalisée 3 jours après la naissance (Kojima & Prehn 1981) mais également des rats chez lesquels une thymectomie a été réalisée à l'âge adulte et associée à une irradiation (Penhale et al. 1973) ont été utilisés. Chez ces animaux, ils ont observé le développement de maladies auto-immunes. De plus, l'équipe de Sakaguchi a également démontré qu'une thymectomie chez une souris de trois jours engendrait l'absence de cellules CD4⁺CD25⁺ (S Sakaguchi et al. 1995). Dans le thymus, ces Tregs nécessitent la présence des cellules thymiques stromales du cortex et de la médulla c'est-à-dire des cellules épithéliales et des cellules dendritiques, afin

de pouvoir se différencier et subir la sélection. Le mécanisme majeur impliqué dans la sélection et le développement des Tregs est l'interaction de forte affinité entre le TCR de ces cellules avec le CMH des cellules stromales. Cette interaction va ainsi donner lieu à un signal de co-stimulation. En outre, comme le montrent des souris KO pour une molécule de co-stimulation cruciale, le CD28, l'absence de ce signal empêche le développement des cellules régulatrices (Salomon et al. 2000). De plus, la présence de certaines cytokines est également requise telle que l'IL-2 et l'IL-7 (Malek et al. 2008).

L'IL-2 est une cytokine ayant un rôle majeur dans l'homéostasie des Tregs. En effet, l'utilisation de souris déficientes en IL-2 ou en son récepteur (via l'absence de CD25) a montré que l'IL-2 n'intervenait pas dans le développement ou la fonction des Tregs. Par contre, la quantité moindre de Tregs et l'analyse de l'expression des gènes des souris déficientes en IL-2 par rapport à des souris wild-type a montré que cette cytokine intervenait probablement dans leur homéostasie en périphérie (Fontenot, Rasmussen, Gavin, et al. 2005).

d. Les mécanismes d'action des Tregs

Après le développement des Tregs dans le thymus, ces cellules vont intégrer le compartiment sanguin afin de rejoindre les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions) mais également des organes non lymphoïdes tels que la peau ou le foie mais aussi les sites d'inflammation grâce à des molécules d'adhésion et des récepteurs aux chemokines présents à leur surface (Campbell & M. A. Koch 2011). Les Tregs utilisent quatre mécanismes d'action différents afin d'induire une suppression : 1 - l'utilisation de cytokines inhibitrices, 2 - la cytolyse, 3 - la perturbation du métabolisme et enfin 4 - l'inhibition de la maturation ou de la fonction des cellules dendritiques, principales CPA. La figure 15 présente schématiquement ces 4 mécanismes. Les Tregs ont de nombreuses cibles parmi lesquelles on trouve les lymphocytes T CD4⁺ et les T CD8⁺, les cellules dendritiques, les cellules B, les macrophages, les ostéoblastes, les mastocytes, les cellules NK et NKT.

i. Suppression par les cytokines inhibitrices

Il existe deux principales cytokines inhibitrices dont l'activité suppressive ne fait aucun doute. Il s'agit de l'interleukine-10 (IL-10) et du TGF- β (Tumor growth factor- β) (Bogdan et al. 1992). Cependant, le rôle de ces cytokines dans les fonctions suppressives des Tregs est actuellement toujours sujet à controverse. En effet, des études *in vitro* semblent indiquer que

les fonctions des Tregs sont contact-dépendantes étant donné que la séparation des cellules effectrices et des Tregs par une membrane semi-perméable, empêche des Tregs d'avoir une activité suppressive (Thornton & Shevach 1998; Shimon Sakaguchi 2004). De plus, les signaux de co-stimulation semblent également nécessaires à l'activité suppressive des Tregs via l'interaction de CTLA-4 et LAG3 porté par les Tregs et les CD80 et CD86 à la surface des CPA (Shimon Sakaguchi 2004). Cependant, des données obtenues *in vivo*, indiquent plutôt que les cytokines sécrétées sont nécessaires à leurs fonctions. Ainsi, les souris KO pour l'IL-10, développent des colites mais présentent également une prolifération anormale des cellules CD4⁺. Il a aussi été observé qu'une greffe de peau allogénique est rejetée plus rapidement chez une souris lorsqu'elle a reçu un anticorps bloquant le récepteur à l'IL-10 (Annacker et al. 2001; Kingsley et al. 2002).

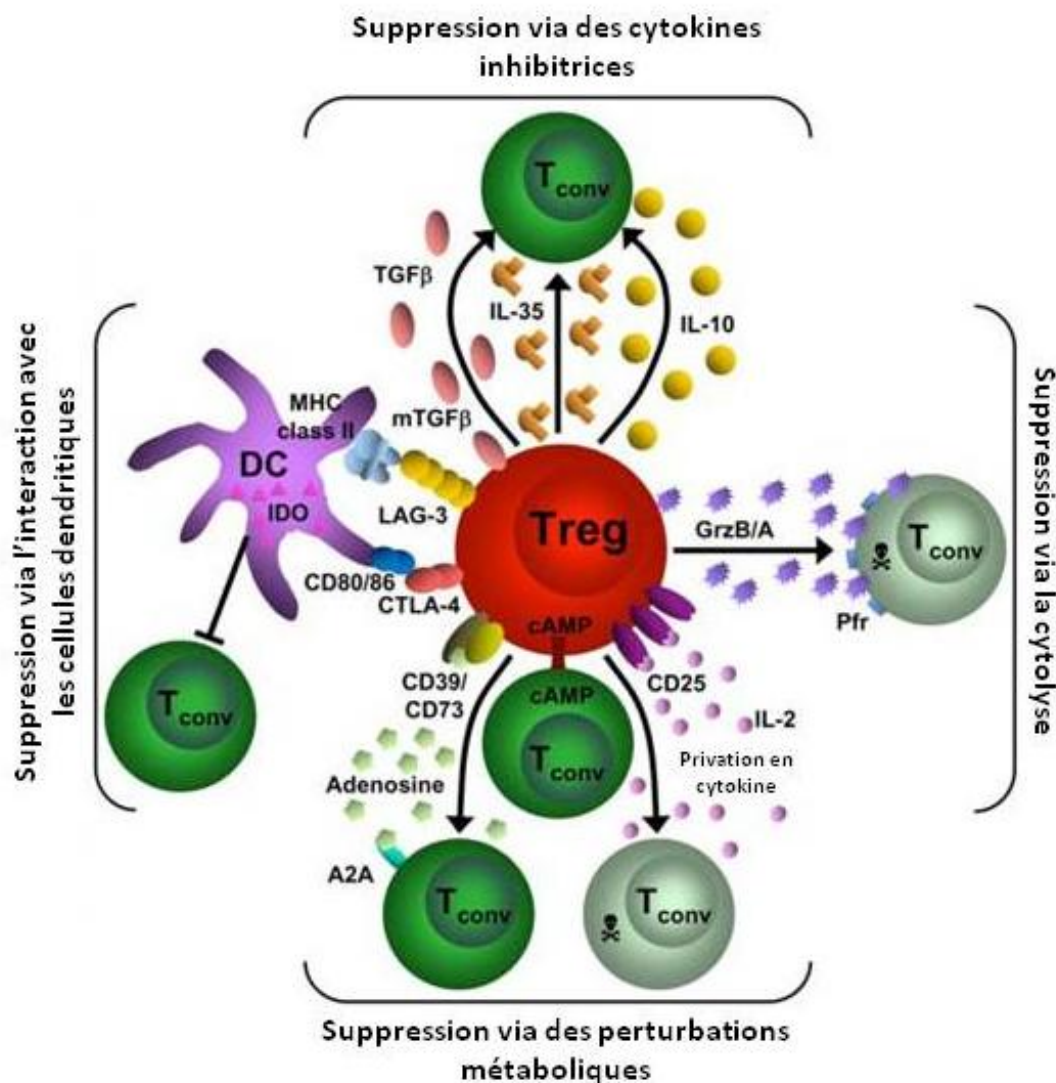


Figure 15: Représentation schématique des 4 principaux mécanismes d'action des lymphocytes T régulateurs. D'après (Workman et al. 2009)). (mTGFβ : TGFβ membranaire ; GrzB/A : Granzyme B et A ; Pfr : perforine ; T conv : T conventionnel = T effecteur.)

En ce qui concerne le TGF- β , il a été démontré qu'il existait une forme membranaire à la surface des Tregs qui permet ainsi d'expliquer l'implication de la cytokine dans la suppression de manière contact-dépendante (K. Nakamura et al. 2004). De plus, l'inhibition via le TGF- β joue, entre autre, sur les cellules NK comme l'a décrit Ghiringhelli dans un modèle de tumeur (Ghiringhelli et al. 2005) mais également sur les CD8⁺ (Green et al. 2003) comme l'a montré Green en utilisant des souris avec un diabète de type 1 causé par les CD8. En effet, chez ces souris, une expression de TGF- β sur les Tregs permettait de retarder la progression du diabète. En 2007, une nouvelle cytokine est apparue comme actrice de la suppression via les Tregs, il s'agit de l'interleukine-35 (IL-35) (Collison et al. 2007). Chez la souris mais également chez l'homme, cette cytokine permet d'augmenter la suppression via les Tregs (Chaturvedi et al. 2011). Cependant certaines études se contredisent. En effet, deux études réalisées chez l'homme ont montré que contrairement à ce que l'on observe chez la souris, les Tregs humains ne produisent ni ne sécrètent d'IL-35 (Bardel et al. 2008; Allan et al. 2007).

ii. La suppression par la cytolyse

La cytolyse a été décrite en premier pour être un mécanisme de lyse des cellules cibles exercé par les cellules NK ainsi que les lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques. Plus tard, il s'est avéré que des lymphocytes T CD4⁺ utilisaient aussi ce mécanisme. En effet, plusieurs études ont montré que des Tregs exprimaient les protéines granzyme A (chez l'homme) ou granzyme B (chez la souris) qui sont des facteurs essentiels dans la lyse cellulaire (Grossman et al. 2004; Gondek et al. 2005). Cette suppression est contact dépendante et se fait à l'aide de molécules d'adhésion tel que le CD18. D'autre part, deux autres molécules ont également été décrites comme étant impliquées dans la lyse par les Tregs, il s'agit de TRAIL/DR5 (Tumor necrosis factor-Related Apoptosis Inducing Ligand/Death Receptor 5) et de la galectine-1. En effet, *in vitro* Ren et al. ont montré que le blocage de TRAIL/DR5 inhibait l'activité suppressive et les effets cytotoxiques des Tregs (Ren et al. 2007). L'équipe de Lechler a montré que le blocage de la galectine-1 réduisait les effets inhibiteurs des Tregs et que chez des souris n'exprimant pas de galectine-1, il y a une diminution de l'activité régulatrice (Garín et al. 2007). Enfin, la perforine a également été décrite dans la fonction suppressive des Tregs chez la souris en induisant l'apoptose des DC responsables de l'activation des T CD8⁺ dans des tumeurs situées au niveau de ganglions lymphatiques (Boissonnas et al. 2010).

iii. Suppression via des perturbations métaboliques

La perturbation du métabolisme des cellules effectrices induit soit leur apoptose soit l'inhibition de leur activation. Plusieurs mécanismes ont été décrits. Ainsi, la forte consommation de l'IL-2 par les Tregs engendre un appauvrissement de cette cytokine dans le milieu extracellulaire. Les T effecteurs n'ont donc plus assez d'IL-2 pour survivre et ils entrent alors en apoptose (Pandiyani et al. 2007). Un autre mécanisme concerne l'ATP. En effet, la présence d'ATP (Adénosine Triphosphate) extracellulaire est un signe informant de la destruction d'un organe et exerce ainsi un effet inflammatoire en activant les DC. Les Tregs CD39⁺ sont capables de réduire l'ATP en AMP (Adénosine Monophosphate) ce qui diminue l'activité des DC et a donc des propriétés anti-inflammatoires (Borsellino et al. 2007). Enfin, il apparaît que l'AMP sous forme cyclique (AMPc), qui a des effets suppresseurs au sein des Tregs, peut être transféré dans les T effecteurs via la jonction GAP qui existe entre les deux cellules. Ainsi, l'AMPc confère aux cellules effectrices des effets inhibiteurs (Bopp et al. 2007).

iv. Suppression via l'interaction avec les cellules dendritiques

Le quatrième système utilisé par les Tregs afin d'induire une suppression, est l'interaction avec les APC et principalement avec les cellules dendritiques (DC). Ce mécanisme se décompose en plusieurs phénomènes. Les Tregs qui portent à leur surface à molécules CTLA-4, vont interagir avec les DC via le CD80 ou le CD86 présent à leur surface et ces interactions vont réduire la capacité des DC à activer les lymphocytes T effecteurs. L'importance du CTLA-4 a en effet été démontrée par plusieurs études via le blocage du CTLA-4 par un anticorps ou l'utilisation de Tregs n'exprimant pas cette molécule. Dans les deux cas, il a été observée une diminution de la suppression des T effecteurs par les DC (Oderup et al. 2006; Serra et al. 2003). De la même manière, il a également été décrit que les Tregs interagissaient avec les DC via LAG-3 et le CMH classe II respectivement. Cette interaction empêche les DC de devenir mature et ainsi elles ne peuvent plus activer les lymphocytes T (Liang et al. 2008).

Une autre molécule a été décrite, la neuropilin-1 (Nrp-1) qui est aussi à la base d'un des mécanismes de suppression. En effet, cette molécule principalement exprimée par les cellules FoxP3⁺ favorise les interactions prolongées avec les CPA immatures ce qui empêche ainsi l'accès des lymphocytes T effecteurs qui ne peuvent alors pas être activés (Sarris et al. 2008).

Enfin, il a également été démontré que l'interaction entre les Tregs et les DC via le CTLA-4 et les CD80 et/ou CD86 pouvait engendrer la synthèse par les DC d'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO). Or l'IDO est une molécule possédant des propriétés régulatrices et qui est connue pour avoir des effets pro-apoptotiques en induisant le catabolisme du tryptophane. Ce mécanisme est responsable de l'apoptose de T effecteurs potentiel (Fallarino et al. 2003).

Ainsi, de nombreux mécanismes s'offrent aux Tregs afin d'induire une suppression directement sur les lymphocytes effecteurs mais également sur les APC. Cette suppression joue un rôle capital dans le maintien de l'homéostasie cellulaire, mais également contre l'apparition de maladies auto-immunes telles que le diabète de type 1, l'asthme, les maladies inflammatoires des intestins. Ces cellules jouent, en revanche, également un grand rôle dans le développement des tumeurs en limitant l'immunité anti-tumorale.

2. Les lymphocytes T CD4⁺ induits

Il existe deux principaux types de cellules régulatrices induites (iTregs). Il s'agit des lymphocytes Tr1 et des lymphocytes Th3 qui sont issus de lymphocytes T CD4⁺ situés en périphérie. La différenciation en Tr1 ou en Th3 dépend des cytokines présentes dans le microenvironnement. En effet, les Tr1 sont induits à partir des CD4⁺ en présence d'IL-10 alors que les Th3 sont induits à partir des CD4⁺ en présence de TGF- β (Vieira et al. 2004; Weiner 2001). En ce qui concerne les Tr1, ces cellules n'expriment jamais le facteur de transcription FoxP3, en revanche, les Th3 l'expriment suite à leur induction par le TGF- β (W. Chen et al. 2003). Malgré l'absence de FoxP3 dans les Tr1, les deux catégories d'iTreg permettent de prévenir l'apparition de maladies auto-immunes dans plusieurs modèles mais également d'induire une tolérance suite à une transplantation (Kohm et al. 2002; Roncarolo et al. 2006). Bien que le mode d'action des iTregs soit similaire à celui des Tregs naturels (nTregs), les mécanismes intervenant dans leur développement diffèrent. En effet, tandis que les nTregs sont sélectionnés dans le thymus en réponse à un antigène du Soi, les iTregs sont quant à eux sélectionnés suite à une réponse par un antigène exogène (Kretschmer et al. 2005). L'activité régulatrice des Tr1 ainsi que des Th3 a été démontrée via l'utilisation de souris déficientes en IL-10 ou en TGF- β . Ces deux types de souris ont développé des maladies auto-immunes qui leurs ont été fatales (Madsen 2001; M. O. Li et al. 2007). Les cellules Tr1 exercent leur activité régulatrice en sécrétant principalement de l'IL-10 mais elles sécrètent

également en plus faible quantité du TGF- β (Groux et al. 1997). Les cellules Th3 quant à elles produisent principalement du TGF- β mais aussi des cytokines inhibitrices comme l'IL-10 et l'IL-4 (Y. Chen et al. 1995).

	Phénotype	Développement	Mécanismes de suppressions
Lymphocytes T régulateurs naturels	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ GITR ⁺ CTLA-4 ⁺	Dans le thymus, en réponse à des auto-antigènes	Sécrétion de cytokines inhibitrices: IL-10 et TGF β Sécrétion d'enzyme lytique Granzyme A et B pour lyser les cellules cibles Consommation d'IL-2 induisant l'apoptose ou l'inactivation des cellules cible Réduction de l'ATP réduisant l'activation des DC Interaction avec les CPA: inhibe les CPA; empêche l'accès des CPA pour les T effecteurs, induit la production d'IDO, molécules pro-apoptotique, par les DC
Lymphocytes T régulateurs induits par l'IL-10: Tr1	CD4 ⁺ CD25 ⁺ GITR ⁺ CTLA-4 ⁺	En périphérie, en réponse à des antigènes étrangers	Sécrétion de cytokines anti-inflammatoires: IL-10 et TGF β
Lymphocytes T régulateurs induits par le TGF β : Th3	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺ GITR ⁺ CTLA-4 ⁺	En périphérie, en réponse à des antigènes étrangers	Sécrétion de TGF β et induction de l'expression de FoxP3 dans les T CD4 ⁺ CD25 ⁻ et donc de nouveau Tregs

Tableau n°2 : Récapitulatif sur les Tregs naturels et induits CD4⁺CD25⁺

3. Les autres cellules régulatrices

De nombreuses autres cellules régulatrices ont été décrites dans la littérature.

Les lymphocytes T CD8⁺ régulateurs ont été décrits en premier lieu en 1970, mais caractérisés que beaucoup plus tard comme étant des T CD8⁺CD28⁻. Ces cellules sont spécifiques de l'antigène et peuvent être générées *in vitro* par des cellules sanguines stimulées de façon répétées par des CPA. Elles exercent leur activité principalement via des contacts avec les CPA (Z. Liu et al. 1998)

Les cellules CD3⁺CD4⁻CD8⁻ (DN) ont également une activité suppressive. Bien qu'elle n'expriment pas le CD4 ou le CD8, elles expriment en revanche des molécules d'activation comme le CD25 et FoxP3 et sécrètent de l'IFN- γ et du TNF- α (Z. X. Zhang et al. 2000).

L'activité de ces cellules est contact-dépendante, spécifique de l'antigène et nécessite la présence de cytokine comme l'IL-2 et l'IL-4.

En plus des lymphocytes $T\alpha\beta$, il existe également des cellules $T\gamma\delta$ qui reconnaissent directement les antigènes à la surface des CPA (Brenner et al. 1986). L'utilisation de souris déficientes en $T\gamma\delta$ a permis de démontrer que ces cellules avaient des fonctions régulatrices en limitant les infections ou le développement de GVHD via la lyse des T effecteurs par la voie Fas/FasL. Ces cellules exercent aussi leurs activités par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires comme l'IL-10 et le TGF- β (Mombaerts et al. 1993; Raulet 1994; Maeda et al. 2005).

Les cellules NKT sont des cellules qui possèdent des récepteurs de cellules NK mais également les $TCR\alpha\beta$. Ces cellules possèdent une fonction cytotoxique et sécrètent des cytokines dont l'IL-4, le TGF- β , l'IFN- γ et l'IL-10 (Bendelac et al. 1997). Une activité suppressives de ces cellules a été mise en évidence dans des maladies auto-immunes comme le diabète (Frey & Rao 1999).

4. Les Tregs en transplantation

Comme je l'ai décrit précédemment, les cellules régulatrices interviennent afin de limiter l'agression de nos propres cellules par notre système immunitaire c'est-à-dire dans l'inhibition des pathologies auto-immunes. Dans un autre domaine, la transplantation, les Tregs semblent également avoir une importance capitale. En effet, chez la souris, de nombreux modèles d'induction ou de maintien de tolérance ont montré l'importance des Tregs (Akl et al. 2005; Karim et al. 2002; Sánchez-Fueyo et al. 2002; Taylor et al. 2001; Wood & Shimon Sakaguchi 2003). A l'inverse, il a été montré que l'absence des Tregs, induit un rejet de manière plus précoce. Les mécanismes par lesquels ces Tregs interviennent utilisent les voies de présentation directe ou indirecte (Joffre et al. 2008).

Dans le domaine de la transplantation clinique chez l'homme, des études sont réalisées afin de mieux comprendre le rôle des Tregs. Ainsi, des études portant sur les profils immunitaires des patients opérationnellement tolérants suite à une transplantation de rein ou de foie ont été réalisées et ont montré que ces patients possédaient un plus grand nombre de Tregs $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ dans le sang périphérique que des patients en rejet chronique ou des patients stables sous immunosuppression (Louis et al. 2006; Martínez-Llordella et al. 2007).

A l'inverse, notre équipe a montré que chez les patients en rejet chronique, il y a une diminution des Tregs en comparaison aux patients stables (Braudeau et al. 2007). Très récemment, une équipe a également montré que le profil d'expression de gènes de patients opérationnellement tolérants est très tourné vers un profil Tregs en comparaison à des patients transplantés non tolérants (Moraes-Vieira et al. 2012) et que ce profil permet de discriminer les patients tolérants des autres.

Lorsque l'on étudie les profils des patients sous traitements immunosuppresseurs, une partie des patients stables possèdent des Tregs spécifiques de l'antigène, capable de supprimer *ex vivo* la réponse après re-stimulation par l'allo-antigène (Salama et al. 2003). Par contre, chez des patients ayant une dysfonction chronique du greffon, cette activité régulatrice n'est pas observable (Akl et al. 2008). Chez une partie des patients opérationnellement tolérants, il n'y a pas d'augmentation du nombre de Tregs dans le sang périphérique. Cependant il a pu être observé qu'il avait une accumulation de ces cellules au niveau du greffon (Bestard et al. 2007; Y. Li et al. 2008).

Notre équipe a également montré que chez des patients souffrant d'un rejet chronique, il y a une diminution de la concentration plasmatique en TGF- β , cytokine nécessaire à l'induction de Tregs, versus des patients stables ou tolérants. Cette même étude a montré que 27% des gènes différentiellement exprimés entre les patients avec un rejet chronique et les patients stables sont régulés par les TGF- β (Brouard, Mansfield, Braud, Li Li, Giral, S. Hsieh, Baeten, M. Zhang, Ashton-Chess, Braudeau, F. Hsieh, et al. 2007).

On peut ajouter qu'il semblerait que les Tregs ne soient pas les seules cellules à entrer en jeu dans la tolérance. En effet, des études récentes montrent qu'il existe des cellules B qui ont également un phénotype régulateur et qui sont présentes en plus grand nombre chez les patients tolérants (Pallier et al. 2010; Danger et al. 2012).

Ainsi, le rôle des Tregs en transplantation nécessite encore d'être étudié afin de mieux le définir et de pouvoir éventuellement utiliser les Tregs à des fins thérapeutiques. En effet, l'étude des Tregs sur de plus grandes cohortes pourrait nous informer de manière plus fiable sur la réelle implication de ces cellules dans la tolérance. De plus, étant donné que plusieurs études n'ont pas montré d'augmentation des Tregs en périphérie chez des patients tolérants mais en revanche ont observé une augmentation de ces cellules dans le greffon, il serait alors intéressant de cibler la recherche sur le greffon. Malheureusement, l'accès au greffon pour les patients tolérants s'avère compliqué. En effet, de manière raisonnable, on ne peut pas réaliser

une biopsie du transplant chez un patient dont toutes les fonctions de l'organe transplanté sont apparemment correctes.

La plupart des études montrent donc un effet bénéfique des Tregs en transplantation. Ainsi, tout l'enjeu des traitements anti-rejet est de ne pas léser cette population cellulaire si précieuse. Malheureusement, les inhibiteurs de la calcineurine, immunosuppresseur essentiel, ont des effets délétères sur cette population (Fourtounas et al. 2010). En revanche, *in vitro*, la rapamycine, inhibiteur de la voie IL-2, n'a pas d'impact sur les capacités suppressives des Tregs et semblerait même renforcer les Tregs face à l'apoptose (Zeiser et al. 2006; Battaglia, Stabilini, Migliavacca, et al. 2006). De même, *in vivo*, la rapamycine semble également avoir des effets bénéfiques sur les Tregs (Battaglia, Stabilini, Draghici, et al. 2006). Enfin, les corticostéroïdes semblent également avoir un effet plutôt bénéfique sur les Tregs en favorisant leur expansion et l'expression de FoxP3 (Polanczyk et al. 2004; Karagiannidis et al. 2004).

L'utilisation de traitements en transplantation semble donc jouer un rôle important sur les populations T régulatrices. Il est donc nécessaire de bien comprendre tous les paramètres mis en jeu en transplantation afin d'atteindre peut-être un jour, la tolérance pour tous...

V. Objectifs

1. Projet n°1 : Biomarqueurs

Au cours de mon introduction, j'ai évoqué le thème des biomarqueurs en précisant que de nombreuses recherches avaient permis de définir des biomarqueurs du rejet aigu. En revanche, la tâche s'avère plus ardue lorsque l'on s'intéresse aux biomarqueurs du rejet chronique humoral actif. En effet, actuellement peu de biomarqueurs spécifiques et fiables ont été définis.

L'objectif de l'étude de biomarqueurs en transplantation est donc de définir de nouveaux biomarqueurs fiables, non-invasifs et bien sûr spécifiques du rejet chronique humoral actif. Pour cela, nous souhaitons comparer les profils d'expression de plusieurs molécules dans le greffon mais également dans le sang et éventuellement dans les urines.

Cette étude a donc commencée par le recrutement de patients transplantés ayant différents diagnostiques, tels qu'une fonction stable, un état de tolérance, un rejet aigu, des dysfonctions chroniques d'origine non-immunes ainsi que des dysfonctions chroniques d'origine immune c'est-à-dire un RCHA, mais également des volontaires sains non transplantés. Le recrutement de ces patients et de ces volontaires doit nous permettre de créer une biocollection d'échantillons provenant de biopsies mais aussi du sang et des urines nécessaires à notre étude.

Par la suite deux approches différentes ont été utilisées pour ce projet :

Une première approche, appelée « bottom-up », consiste à étudier le profil d'expression de molécules connues en transplantation et déjà décrit dans la littérature. Ainsi, en utilisant cette approche, nous avons étudié l'expression de trois molécules FoxP3, GrzB et T-bet. En effet, la molécule FoxP3 a déjà été identifiée dans les urines de patients en rejet aigu où elle est sur-exprimée par rapport à des patients avec une néphropathie chronique d'allogreffe ou ceux avec une fonction stable (Muthukumar et al. 2005). L'analyse de cette molécule a pour objectif de nous informer sur l'infiltration ou la circulation des Tregs après transplantation. Il a également été montré précédemment que le taux de Granzyme B est augmenté chez les patients en rejet aigu (Simon et al. 2003). L'étude de l'expression de cette molécule lytique a pour objectif de nous informer sur l'infiltrat de cellules cytotoxiques ou bien sur la circulation de ces cellules dans le sang. Enfin, la molécule T-bet est un facteur de transcription des Th1,

l'analyse de son expression pourra nous informer sur l'état d'activation des cellules effectrices de type Th1.

Ainsi, l'analyse de l'expression de ces trois molécules dans le greffon de patients avec une toxicité due aux inhibiteurs de la calcineurine, avec une glomérulopathie du transplant ou avec un RCHA ou bien l'analyse de l'expression de ces trois molécules dans le sang de patients avec une fonction stable, avec une glomérulopathie du transplant ou avec un RCHA en plus des volontaires sains non transplantés, doit nous permettre de mieux comprendre les causes qui entrent en jeu dans ces divers lésions chroniques du transplant. De plus, ces analyses ont-elles-même été associées à une étude des facteurs qui peuvent influencer leurs valeurs et donc cette étude doit nous informer sur les facteurs à prendre en compte lors de l'analyse de toutes les données que l'on peut obtenir sur ces trois molécules. En conséquence, l'objectif de cette étude est donc d'évaluer le potentiel de trois molécules à être des biomarqueurs du rejet chronique humoral en tenant compte de divers facteurs pouvant influencer ces valeurs et en même temps donner une idée des mécanismes intervenant dans ce type de rejet.

Une deuxième approche, appelée « top-down », consiste à étudier le profil d'expression d'une molécule qui n'a encore jamais été décrite en transplantation et pour laquelle aucune hypothèse n'est établie. Dans notre cas, cette approche a été utilisée pour l'étude de l'expression de la molécule Tribbles-1.

Cette molécule, Tribbles-1, est issue de l'analyse de plusieurs listes de gènes provenant de quatre études différentes (Hotchkiss et al. 2006; Flechner et al. 2004; Scherer et al. 2003; Donauer et al. 2003). En effet, en comparant ces listes de gènes, la molécule Tribbles-1 a été retrouvée à plusieurs reprises. Notre objectif a donc été d'étudier le potentiel de TRIB1 à être un biomarqueur en transplantation. Pour cela, nous avons analysé les profils d'expression de Tribbles-1 dans le greffon mais également dans le sang de patients avec un rejet chronique humoral actif en comparaison avec des patients transplantés avec une histologie normale du greffon, avec des signes de toxicité des inhibiteurs de la calcineurine, avec une fibrose interstitielle et une atrophie tubulaire d'étiologie inconnue, ou avec une glomérulopathie du transplant en absence de C4d et de DSA. L'étude a également été réalisée dans un modèle de greffe de cœur chez le rat en comparant les taux de TRIB1 dans le greffon ou dans les cellules mononucléées du sang périphérique entre des rats montrant des signes de vasculopathie chronique du transplant et des rats tolérants leur greffon. Enfin, cette étude a également

cherché à montrer les cellules responsables de cette augmentation de Tribbles-1 dans le rejet chronique en analysant l'expression de cette molécules dans divers compartiments et types cellulaires avec ou sans stimulation.

En analysant le profil d'expression de TRIB1 dans plusieurs sous-types cellulaires, nous avons observé que TRIB1 était exprimé de manière plus importante dans les Tregs de volontaires sains par rapport aux cellules non régulatrices CD4⁺CD25⁻. Or, comme je l'ai précisé dans mon introduction les Tregs semblent importants en transplantation. Ainsi, pour poursuivre l'étude de TRIB1 en transplantation, nous avons cherché à savoir quel rôle joue TRIB1. Pour cela, nous avons analysé l'expression de TRIB1 chez des volontaires sains, chez des patients stables et chez des patients en RCHA.

2. Projet n°2 : Etude de TRIB1

Le deuxième projet s'est intéressé à l'étude plus approfondie de TRIB1 molécule qui semblerait impliquée dans le rejet chronique humoral. En effet, au cours de la première étude, nous avons montré que la molécule TRIB1 pouvait être un biomarqueurs du RCHA. Lors de l'analyse de l'expression de TRIB1 dans différents sous-types cellulaires, nous avons constaté que cette molécule était fortement exprimée dans les lymphocytes T régulateurs chez des volontaires sains. De plus, il a déjà été décrit que les Tregs jouaient un rôle important en transplantation. Nous avons donc souhaité focaliser notre travail sur l'étude de la molécule TRIB1 au sein de cette population cellulaire afin de déterminer si elle joue un rôle dans la fonction des Tregs. Par ailleurs, il a été décrit que Foxp3 est une molécule indispensable à la fonction des Tregs. Nous avons donc souhaité analyser le lien qui pourrait exister entre TRIB1 et FoxP3, molécule centrale de la biologie des Tregs. Pour atteindre notre objectif, nous avons analysé les profils d'expression de FoxP3 ainsi que de TRIB1 dans les Tregs mais également dans les cellules T CD4⁺ CD25⁻ non régulatrices fraîchement isolées. Nous avons également voulu savoir s'il existait une corrélation entre ces deux molécules au sein des Tregs, mais également si elles étaient régulées de la même manière suite à une activation. Pour cela, nous avons observé les modifications d'expression de ces deux molécules suite à une activation polyclonale avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Et enfin, nous avons voulu voir si ces deux molécules pouvaient être liées entre elles. Ainsi, nous avons étudié l'interaction qui pouvait exister entre ces deux molécules dans un modèle non physiologique à

l'aide d'un test appelé Protein Complementation Assay dans des lignées cellulaires adhérentes, puis de manière physiologique dans les lymphocytes T régulateurs à l'aide d'un test de co-immunoprécipitation suivi d'une analyse par western Blot.

Pour ce projet nous avons également pour objectif d'étudier le rôle de TRIB1 dans les Tregs dans un modèle animal. Pour cela nous avons fait développer des souris TRIB1 cKO. Enfin nous avons voulu connaître d'autres partenaires d'interaction de TRIB1 afin de nous permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action de TRIB1, c'est pourquoi nous avons réalisé un screening à haut débit par le système de levure double –hybride.

Résultats

I. Etudes des biomarqueurs

1. Article n°1

Titre : Profils des cellules T régulatrices, effectrices et cytotoxiques chez les patients transplantés à long-terme.

Auteurs : Joanna Ashton-Chess, **Emilie Dugast**, Robert B. Colvin, Magali Giral, Yohann Foucher, Anne Moreau, Karine Renaudin, Christophe Braud, Anne Devys, Sophie Brouard et Jean-Paul Soulillou

Article publié dans : Journal of American Society of Nephrology, 2009 May;20(5):1113-22

Titre original: Regulatory, effector, and cytotoxic T cell profiles in long-term kidney transplant patients

Regulatory, Effector, and Cytotoxic T Cell Profiles in Long-Term Kidney Transplant Patients

Joanna Ashton-Chess,* Emilie Dugast,* Robert B. Colvin,[†]
Magali Giral,* Yohann Foucher,* Anne Moreau,[‡] Karine Renaudin,[‡]
Christophe Braud,* Anne Devys,[§] Sophie Brouard,* and Jean-Paul Souillou*

*INSERM, U643, Nantes, France; Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, France; Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France; [†]Department of Pathology, Massachusetts General Hospital, and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts; [‡]Service d'Anatomie Pathologique, Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, Nantes, France; and [§]Etablissement Français du Sang, Nantes, France

ABSTRACT

Animal studies have suggested a potential role for regulatory T cells (Tregs) in allograft tolerance, but these FOXP3+ cells seem to be an inherent component of acute rejection (AR) in human recipients of renal transplants. The balance between regulatory cells and effector/cytotoxic cells may determine graft outcome; this balance has not been described for chronic allograft injury. We investigated the expression of key regulatory, effector, and cytotoxic transcripts (*i.e.*, FOXP3, T-bet, and granzyme B, respectively) in the grafts and peripheral blood of long-term-surviving renal transplant patients. We found that, whereas neither intragraft nor peripheral blood FOXP3 or T-bet mRNA could distinguish between rejection and nonrejection status, granzyme B (GrzB) mRNA could: It was significantly increased in the graft and significantly decreased in the peripheral blood of patients with chronic antibody-mediated rejection (CAMR). Quantifying peripheral blood GrzB mRNA demonstrated potential to aid in the noninvasive diagnosis of CAMR. In summary, these data affirm GrzB as a marker not only for AR but also for CAMR. In addition, we identified several previously unreported clinical or demographic factors influencing regulatory/effector/cytotoxic profiles in the peripheral blood, highlighting the necessity to consider confounding variables when considering the use of potential biomarkers, such as FOXP3, for diagnosis or prognosis in kidney transplantation.

J Am Soc Nephrol 20: 1113–1122, 2009. doi: 10.1681/ASN.2008050450

Achieving clinical transplant tolerance has been a major goal and the subject of intense research in transplantation for more than 50 yr.^{1,2} In rodents, allograft tolerance is frequently associated with a specialized population of suppressor T cells, the so-called regulatory T cells, or Tregs.³ CD4+CD25++ Tregs can be distinguished from other cell types by their constitutive expression of the forkhead-winged helix transcription factor FOXP3.^{4,5} The detection of FOXP3 in the allografts and immune compartments of tolerant animals has drawn attention to the potential role of these cells in allograft tolerance in rodent models.^{6,7} However, there is now compelling evidence from studies in humans that FOXP3+ cells are also an in-

herent component of acute allograft rejection (AR), with increased FOXP3 reported in both the urine⁸ and the graft.^{9–11} Thus, it has become apparent that the

Received April 23, 2008. Accepted November 21, 2008.

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

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

Correspondence: Sophie Brouard or Jean-Paul Souillou, IRT/INSERM U643, CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, Cedex 1, France. Phone: +33 240 08 74 10; Fax: +33 240 08 74 11; E-mail: sophie.brouard@university-nantes.fr; jean-paul.souillou@university-nantes.fr

Copyright © 2009 by the American Society of Nephrology

presence of FOXP3 or Tregs may not dictate graft outcome but rather their abundance relative to their effector/cytotoxic counterparts. Indeed, several groups have also clearly established the cytotoxic molecule granzyme B (GrzB) as a reliable intragraft, urine, and peripheral blood marker of acute kidney graft rejection.^{12–18}

Thus, although the implication of regulatory and effector responses has been addressed for AR, so far there have been no reports on the subject relative to later times posttransplant in cases of stable graft function or late renal allograft injury, such as calcineurin inhibitor (CNI) toxicity or chronic antibody-mediated rejection (CAMR). Therefore, the potential involvement of FOXP3+ cells and any relationship to clinical and pathological correlates at later times posttransplant remain unknown. This prompted us to investigate the regulatory, effector, and cytotoxic profiles in the graft and peripheral blood of long-term-surviving renal transplant patients with stable graft function or different types of chronic graft injury. For this purpose, the Treg master transcription factor FOXP3, the Th1 cell transcription factor T-bet,¹⁹ and the cytotoxic molecule GrzB²⁰ were analyzed in the graft and peripheral blood mononuclear cells of long-term-surviving kidney transplant recipients experiencing stable graft function or loss of graft function through injury or rejection.

Here, we show that, whereas FOXP3, T-bet, and GrzB can all distinguish acute rejection from nonrejection, only GrzB can distinguish chronic rejection from other forms of late graft injury, including idiopathic transplant glomerulopathy. In fact, GrzB was significantly increased in biopsies but significantly decreased in the peripheral blood of patients presenting CAMR. Moreover, quantifying peripheral blood GrzB mRNA shows potential as a decision-making tool for CAMR. Finally, we found that the expression of each of these three molecules can be influenced by different clinical covariates. These data highlight the importance of future studies of gene expression in transplantation to be performed on large cohorts such that potential confounding factors can be taken into account when evaluating the diagnostic or prognostic capacity of these genes or when establishing a mechanistic basis for graft outcome.

RESULTS

Intragraft Regulatory, Effector and Cytotoxic Profiles

Intragraft FOXP3 mRNA Cannot Distinguish Rejection from Nonrejection in Chronic Graft Injury. We first sought to analyze the expression of FOXP3 in different types of chronic graft injury, including nonrejection (chronic CNI toxicity; $n = 7$), rejection (CAMR; $n = 14$),²¹ and the relatively rare diagnosis of idiopathic transplant glomerulopathy (TG; C4d

and anti-HLA negative; $n = 11$). A comparison between biopsies with normal histology ($n = 7$) and with acute cellular rejection ($n = 9$) served as a positive control (Supplementary Figure 1). As expected, FOXP3 was significantly increased in acute cellular rejection (ACR) compared with biopsies with normal histology ($P < 0.001$; Supplementary Figure 1Ai). However, despite being detectable in all three types of chronic graft injury analyzed, FOXP3 transcripts here were detected in equivalent quantities (Figure 1A).

These data were confirmed at the protein level by quantifying the number of graft-infiltrating FOXP3+ cells by immunohistochemistry. Like FOXP3 mRNA, FOXP3+ cells significantly accumulated in ACR ($P < 0.001$; Supplementary Figure 1Bi) but were present at much lower levels in late injury with no significant differences (Figure 1B). Overall, the number of FOXP3+ cells per square millimeter within the graft correlated tightly with the quantity of FOXP3 mRNA (Spearman $r = 0.71$, $P < 0.0001$). FOXP3+ lymphoid cells were detected in the interstitium and in tubules in ACR (data not shown) but were present only in the interstitium in the case of chronic injury

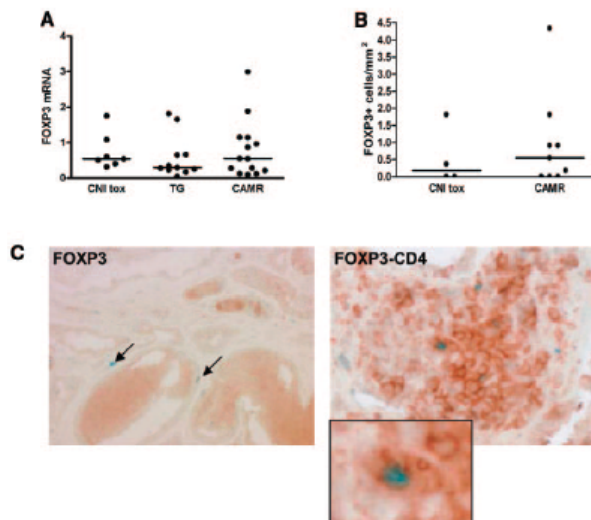


Figure 1. Quantification of intragraft FOXP3 mRNA and FOXP3+ cells in chronic injury of kidney allografts. (A) Quantitative PCR measurement of FOXP3 mRNA accumulation in kidney graft biopsies displaying signs of chronic injury (chronic calcineurin inhibitor toxicity, CNI tox, $n = 7$; idiopathic transplant glomerulopathy, TG, $n = 11$; or chronic antibody-mediated rejection, CAMR, $n = 14$). Expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method after normalization to the housekeeping gene HPRT with results expressed in arbitrary units (see Concise Methods for details). (B) Quantification of the number of FOXP3+ infiltrating cells per square millimeter in graft biopsies displaying chronic graft injury (CNI tox, $n = 4$, or CAMR, $n = 9$). (C) Staining of FOXP3 (rare blue cells indicated with arrows; $\times 40$ magnification) or costaining of FOXP3 (blue) and CD4 (brown) in chronic antibody-mediated rejection ($\times 40$ magnification + enlarged image).

and absent from tubules, glomeruli, and vascular lesions (Figure 1C, left-hand panel). In the CAMR samples, costaining revealed that all FOXP3+ cells were CD4+ (Figure 1C, right-hand panel). Thus, FOXP3+CD4+ cells are present in the chronic graft injury but cannot distinguish between nonrejection and rejection.

Intragraft T-bet mRNA Cannot Distinguish Rejection from Nonrejection in Chronic Graft Injury.

To gain insight into the level of potentially counteracting T effectors in the different forms of graft injury, mRNA for the Th1 transcription factor T-bet was measured. As previously reported,²² we confirmed T-bet as being significantly increased in ACR compared with grafts with normal histology ($P < 0.001$; Supplementary Figure 1Aii). However, there were no significant differences in chronic graft injury regardless of the rejection or nonrejection diagnosis (Figure 2A). T-bet+ cells significantly infiltrated the grafts with ACR compared with normal histology ($P < 0.05$; Supplementary Figure 1Bii), being detected occasionally in tubules and in the arterial intima (data not shown). Coexpression of T-bet and FOXP3 was not observed (data not shown). In late injury, T-bet+ cells were also detectable, with a significant increase in CAMR ($P < 0.01$; Figure 2B). In fact, CAMR cases often had quite prominent glomerular T-bet+ cells (Figure 2C, upper left-hand panel). In the CAMR samples, T-bet was expressed in >50% of CD4+ cells (Figure 2C, right-hand panel), in >50% of GrzB+ cells (Figure 2C, lower left-hand panel), and in rare B cells (<5%; data not shown). Thus, although there was a discordance between mRNA and protein in late injury; the number of T-bet+ cells infiltrating the grafts correlated significantly with T-bet mRNA levels (Figure 2C; Spearman $r = 0.61$, $P < 0.01$). These data indicate that the presence of T-bet mRNA cannot distinguish between nonrejection and rejection late after transplantation, but T-bet+ cells may do so, displaying a distinctive anatomical localization.

Intragraft GrzB mRNA Can Distinguish Rejection from Nonrejection in Chronic Graft Injury.

We next explored the contribution of cytotoxicity to the different forms of graft injury. First, we confirmed previous data showing a significant accumulation of GrzB transcripts in acute rejection ($P < 0.001$; Supplementary Figure 1Aiii). In addition, GrzB was significantly increased in CAMR versus CNI toxicity and TG ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively; Figure 3A). A similar trend of GrzB expression was observed after immunostaining for GrzB+ cells infiltrating the grafts with an increase in ACR (Supplementary Figure 1B) and a trend toward an increase in CAMR ($P = 0.07$; Figure 3B). In

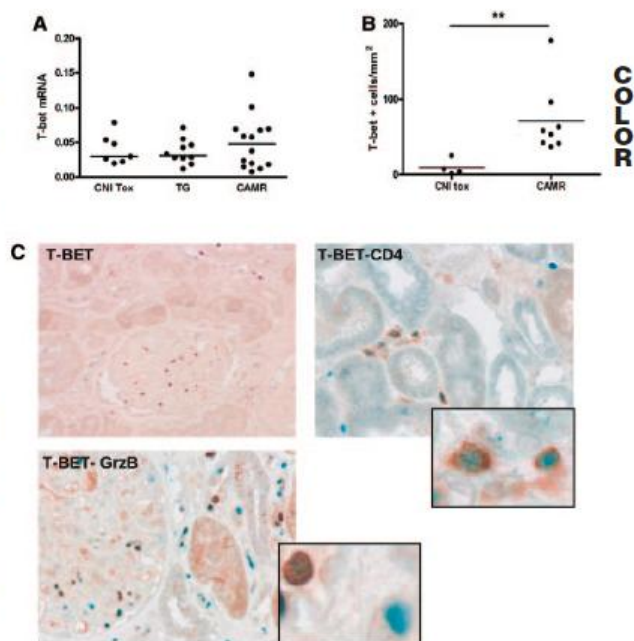


Figure 2. Quantification of intragraft T-bet mRNA and costaining of T-bet+ FOXP3+ cells in chronic injury of kidney allografts. (A) Quantitative PCR measurement of T-bet mRNA accumulation in kidney graft biopsies displaying signs of chronic injury (chronic calcineurin inhibitor toxicity, CNI tox, $n = 7$; idiopathic transplant glomerulopathy, TG, $n = 11$; or chronic antibody-mediated rejection, CAMR, $n = 14$). Expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method after normalization to the housekeeping gene HPRT with results expressed in arbitrary units (see Concise Methods for details). (B) Quantification of the number of T-bet+ infiltrating cells per square millimeter in graft biopsies displaying chronic graft injury (CNI tox, $n = 2$, or CAMR, $n = 8$). Significant differences are indicated by ** ($P < 0.01$). (C) Staining of T-bet alone (brown; $\times 40$ magnification) or costaining of T-bet (blue) and CD4 (brown) or costaining of T-bet (blue) and GrzB (brown), in chronic graft injury ($\times 40$ magnification+ enlarged images). Glomerular T-bet is particularly prominent in CAMR.

CAMR, GrzB expression was almost exclusively confined to CD8+ cells (>95%; Figure 3C, left-hand panel), whereas none coexpressed FOXP3 (Figure 3C, right-hand panel). For this molecule, no statistically significant correlation was detected between mRNA and protein (Spearman $r = 0.15$; NS). Thus, GrzB mRNA can distinguish late rejection from nonrejection.

Peripheral Blood Regulatory, Effector, and Cytotoxic Profiles

Peripheral Blood FOXP3 mRNA Correlates with Time Posttransplant But Not with Rejection or Nonrejection Status in Long-Term-Surviving Recipients.

To determine whether the regulatory, effector, and cytotoxic profiles were similar between the graft and the periph-

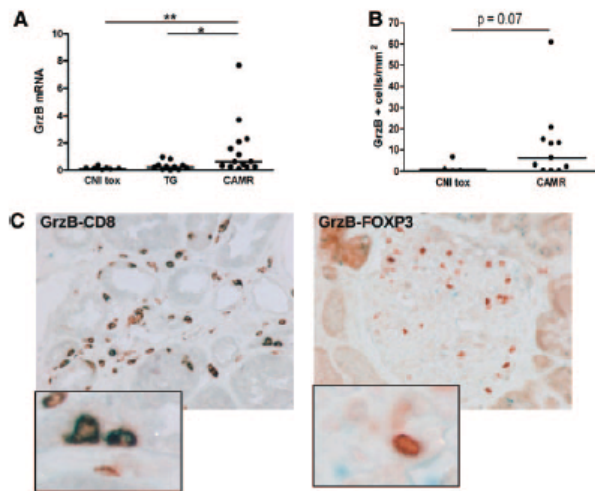


Figure 3. Quantification of intragraft GrzB mRNA and GrzB+ cells in chronic injury of kidney allografts. (A) Quantitative PCR measurement of GrzB mRNA accumulation in kidney graft biopsies displaying signs of chronic injury (chronic calcineurin inhibitor toxicity, CNI tox, $n = 7$; idiopathic transplant glomerulopathy, TG, $n = 11$; or chronic antibody-mediated rejection, CAMR, $n = 14$). Expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method after normalization to the housekeeping gene HPRT with results expressed in arbitrary units (see Concise Methods for details). (B) Quantification of the number of GrzB+ infiltrating cells per square millimeter in graft biopsies displaying chronic graft injury (CNI tox, $n = 4$, or CAMR, $n = 9$). (C) Costaining of GrzB (blue) and CD8 (dark brown) or costaining of GrzB (brown) and FOXP3 (blue) in chronic graft injury ($\times 40$ magnification + enlarged images for each costain).

eral blood in long-term patients, we next analyzed PBMC from a largely independent group of patients with stable graft function with undetermined biopsy status ($n = 164$), idiopathic transplant glomerulopathy ($n = 7$), or CAMR ($n = 15$) and healthy volunteers ($n = 15$). As shown in Figure 4Ai, the blood FOXP3 mRNA followed the same pattern as that observed in the graft in that there were no significant differences between patients with or without rejection (Figure 4Ai). Of note, stable (STA) patients had significantly lower FOXP3 mRNA levels than healthy volunteers ($P < 0.01$). Moreover, as determined in 6 patients with CAMR, FOXP3 levels in the PBMC were stable over time (Supplementary Figure 2). Finally, no differences were observed in peripheral blood FOXP3 mRNA between patients with stable graft function or acute cellular rejection early posttransplant (Supplementary Figure 1Ci).

Given the large number of STA patients included for analysis ($n = 164$), we explored the potential confounding factors for FOXP3 mRNA expression in peripheral blood by multivariate linear regression analysis in these patients. Among the different covariates analyzed (Table 1 and Sup-

plementary Table 3), the only significant association was between FOXP3 and time posttransplant, with a second-order polynomial relationship (increasing then decreasing) as illustrated in Figure 4Aii. Thus, FOXP3 mRNA levels in the peripheral blood of long-term-surviving renal transplant patients do not correlate with rejection or nonrejection status but vary with time posttransplant. This potential confounding factor merits further investigation in future studies of the relationship between FOXP3 and transplant rejection.

Peripheral Blood T-bet Correlates with Time Posttransplant, Recipient Age, and Immunosuppressive Treatment but not with Rejection or Nonrejection Status in Long-Term-Surviving Recipients.

As shown in Figure 4Bi, like graft T-bet mRNA, there were no significant differences in blood T-bet mRNA between long-term patients with or without rejection. Likewise, no differences were observed in peripheral blood T-bet mRNA between patients with stable graft function or acute cellular rejection early posttransplant (Supplementary Figure 1Cii). As illustrated in Figure 4Bii, multivariate linear regression analysis of the STA patients (Table 1 and Supplementary Table 3) revealed that T-bet mRNA levels decreased significantly with time posttransplant ($P < 0.0001$), increased significantly with recipient age ($P < 0.01$), and were significantly lower in patients treated with FK-506 compared with those receiving cyclosporine A (CsA) ($P < 0.05$). Thus, T-bet mRNA levels in the peripheral blood of long-term-surviving renal transplant patients do not correlate with rejection or nonrejection status but are influenced by certain confounding factors. Like FOXP3, T-bet mRNA levels were also stable over time (Supplementary Figure 2).

Peripheral Blood GrzB Can Distinguish between Rejection and Nonrejection Status in Long-Term-Surviving Recipients Despite Also Being Influenced by Donor Age and Type of Immunosuppressive Treatment.

In contrast to its significant increase in biopsies with CAMR, GrzB was significantly reduced in the PBMC of patients with CAMR compared with those with long-term stable graft function (Figure 4Ci). However, no differences were observed between patients with stable graft function or acute cellular rejection early posttransplant (Supplementary Figure 1Ciii). As illustrated in Figure 4Cii, multivariate generalized modeling of the STA patients (Table 1 and Supplementary Table 3) showed that the quantity of GrzB mRNA in the peripheral blood increased significantly with donor age ($P < 0.01$) and was significantly lower in patients treated with FK-506 compared with those receiving CsA ($P < 0.01$), whereas the presence or absence of steroids did not significantly influence GrzB mRNA

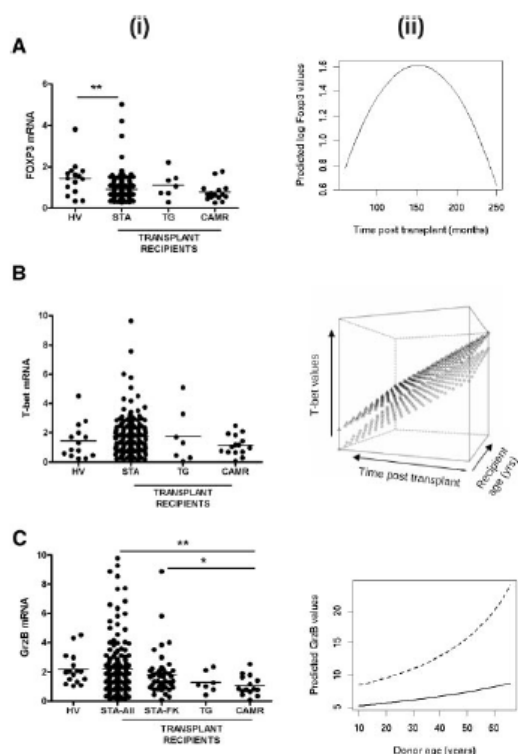


Figure 4. Quantification of regulatory (FOXP3), effector (T-bet), and cytotoxic (GrzB) mRNA in the peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers and renal transplant patients. (i) Quantification of mRNA for FOXP3 (A), T-bet (B), and GrzB (C) in the peripheral blood mononuclear cells of healthy volunteers (HV; $n = 15$) and kidney transplant patients with stable graft function (STA; $n = 164$), deteriorating graft function, and biopsy-proven idiopathic transplant glomerulopathy ($n = 7$) or chronic antibody-mediated rejection (CAMR; $n = 15$). Expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method after normalization to the housekeeping gene HPRT with results expressed in arbitrary units (see Concise Methods for details). The nonparametric Kruskal-Wallis test was used to compare the three groups of kidney transplant recipients. Significant differences are indicated by *** ($P < 0.001$), ** ($P < 0.01$), or * ($P < 0.05$). (ii) Results of statistical analyses for confounding factors influencing regulatory, effector, and cytotoxic profiles in the 164 STA patients: a multivariate linear regression analysis on log-transformed FOXP3 and T-bet mRNA values and a multivariate generalized model performed on GrzB mRNA values. (Aii) Statistical modeling of the relationship between FOXP3 mRNA values and time posttransplant. (Bii) Statistical modeling of the relationship between T-bet mRNA values and time posttransplant, recipient age, and type of CNI in the maintenance regimen (triangles, CsA; circles, FK-506). (Cii) Statistical modeling of the relationship between GrzB mRNA levels and donor age and type of CNI in the maintenance regimen (dotted line, CsA; continuous line, FK-506).

levels. Given that the CAMR patients were for the majority treated with FK-506, an additional analysis was performed to compare CAMR with STA patients treated only with FK-506. This revealed that the decrease in GrzB in CAMR was not due to their treatment with FK-506, because the significant decrease in CAMR was still observed ($P < 0.001$; Figure 4Ci). Like the other two molecules, GrzB levels in PBMC were stable over time (Supplementary Figure 2).

Next, we set out to determine whether measuring GrzB in PBMC could potentially be applied to decision making in clinical practice. For this purpose, we performed a receiver operating characteristic (ROC) curve analysis for GrzB to discriminate between STA and CAMR (Figure 5). The analysis showed a good discrimination with an area under the curve of 0.73 (95% confidence interval of 0.60 to 0.84). An optimal cutoff was also calculated at 1.23, representing an equivalent specificity and sensitivity of 0.67.

Thus, peripheral blood GrzB-expressing cells decrease during CAMR. Moreover, GrzB mRNA levels tend to be higher in the blood of patients with grafts from older donors and are controlled to a greater extent by the CNI FK-506. Finally, measuring GrzB in the peripheral blood shows potential as a decision-making tool in clinical practice and may be combined with other molecules to help diagnose CAMR based on a blood sample.

DISCUSSION

Although the implication of regulation and effector/cytotoxic pathways has been investigated in the context of acute rejection, to date, there have been no reports relative to this subject in the context of chronic injury. For this reason, we investigated the expression of key regulatory, effector, and cytotoxic marker transcripts (FOXP3, T-bet, and GrzB) in the grafts and peripheral blood of long-term-surviving renal transplant patients, with special focus on nonrejection (stable graft function, CNI toxicity, and idiopathic TG) and rejection (CAMR) and with ACR as a reference. The association of these three molecules with various clinical, demographic, and pathological parameters was additionally analyzed. Overall, our results show that the mRNA of GrzB, but not that of FOXP3 or T-bet, can distinguish between chronic rejection (CAMR) and nonrejection (CNI toxicity and idiopathic TG) late after transplantation. IL-17a was also analyzed but was not expressed at detectable levels in any of the samples (data not shown). Moreover, each of these molecules is influenced by specific clinical or demographic parameters.

Here, we provide the first evidence that, in contrast to ACR, FOXP3 is not significantly increased in “alloimmune” chronic rejection (CAMR) compared with “nonalloimmune” chronic lesions such as CNI toxicity or idiopathic TG. This was true for both mRNA and protein. Relatively sparse infiltration of intra-graft FOXP3+ cells coexpressing CD4 characterizes both acute and chronic forms of anti-

Table 1. Summary of the results of a multivariate linear regression (FOXP3 and T-bet) and a multivariate generalized model (GrzB) applied to only the STA patients ($n = 164$) included in the PBMC analysis^a

Multivariate Analysis—PBMC (STA Patients Only: $n = 164$)			
		Association	P Value
FOXP3	Time posttransplant (months)	Nonlinear	<0.0001
T-BET	Time posttransplant (months)	Negative linear	<0.0001
	Recipient age (years)	Positive linear	<0.01
	Treatment (CsA versus FK-506)	Positive	<0.05
	Donor age (years)	Positive nonlinear	<0.01
GrzB	Treatment (CsA versus FK-506)	Positive	<0.01

^aCovariates analyzed included donor and recipient age and gender, time posttransplant, creatinine clearance, proteinuria, number of HLA incompatibilities (A + B + DR), presence or absence of anti-HLA, and maintenance immunosuppression (presence or absence of steroids and high versus low trough level CsA (<125 versus ≥ 125 ng/ml) versus high and low trough level FK-506 (<5 versus ≥ 5 ng/ml). Only significant associations are indicated. More detailed results can be found in Supplementary Table 1.

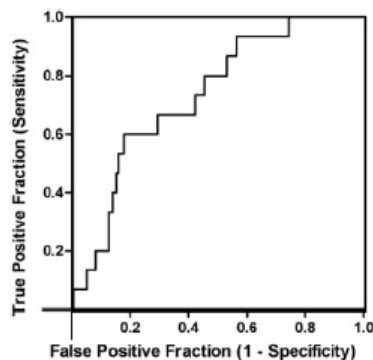


Figure 5. Receiver operating characteristic curve analysis of GrzB mRNA in the STA and CAMR PBMC samples. The ROC curve measures the ability of GrzB mRNA quantity to correctly classify patients with and without CAMR. The ROC is represented as a graphical plot of the sensitivity versus (1 – specificity) for a binary classifier system as its discrimination threshold is varied. The sensitivity (also referred to as the “true positive fraction”) is how good the test is at picking out patients with CAMR. Specificity is the ability of the test to pick out patients who do not have CAMR. Thus, (1 – specificity) is also referred to as the “false positive fraction”. The accuracy of the test (*i.e.*, how well the test separates patients with and without CAMR) is measured by the area under the ROC curve where an area of 1.0 represents a perfect test.

body-mediated rejection, in contrast to cell-mediated acute rejection.⁹ Of course, it is possible that some of the FOXP3 that we measured derived in part from non-Tregs (T cell receptor ligation in non-Tregs has been shown to transiently induce low levels of FOXP3²³). However, at least in the graft, the lack of FOXP3 and T-bet or FOXP3 and GrzB coexisting together with the almost mutually exclusive distribution of FOXP3+ and T-bet+ cells within the graft biopsies suggests that the FOXP3+ cells that we observed within the grafts were more likely to be Tregs than activated T cells. In the peripheral blood, our finding of significantly reduced FOXP3 mRNA levels in transplant recipients in

general *versus* healthy volunteers is supported by previous data showing that CNI in the maintenance regimen reduces peripheral blood Treg numbers in renal transplant recipients.²⁴ We go further by showing that, unlike urine FOXP3 mRNA levels that are associated with renal function and predict outcome in the context of acute rejection,⁸ peripheral blood FOXP3 mRNA levels are not linked to renal function and cannot distinguish between patients who are rejecting their grafts chronically with deterioration of graft function and those that are enjoying good graft function. Thus, in contrast to urine, it seems unlikely that measuring FOXP3 in the blood will be useful for long-term monitoring of renal transplant recipients. The data that we present here also demonstrate a novel and atypical binomial time-dependent effect on peripheral blood FOXP3 mRNA levels, with FOXP3 initially increasing, reaching a maximum at around 12 yr posttransplant, and decreasing thereafter. This time-dependent effect could act as a confounding factor when samples associated with different clinical statuses are compared at different intervals after transplantation.

With regard to the effector transcription factor T-bet, our data confirm a previous report that this molecule is an intra-graft marker of acute rejection.²² We extend these findings by showing that, like FOXP3, T-bet mRNA is not a specific marker of chronic antibody-mediated rejection. Nevertheless, glomerular T-bet+ cells accumulated most prominently in CAMR, a novel finding that deserves further study. This discrepancy between mRNA and protein could be due to the smaller sample sizes used for immunohistochemistry or due to a small number of cells expressing a high number of transcripts in biopsies with CNI toxicity. Our finding that T-bet was lower in patients treated with FK-506 compared with those treated with CsA indicates that FK-506 may hold an advantage over CsA in terms of its ability to control the effector response. This could partly explain why FK-506 is more effective than CsA at inhibiting acute rejection in renal transplant patients.²⁵ The gradual decline in T-bet with time posttransplant could possibly be due to chronic exposure to CNI. Peripheral blood T-bet mRNA levels additionally tended to be higher in older recipients, possibly the result of an age-related change in composition of T-bet-expressing peripheral blood cells. However, pe-

peripheral blood T-bet could not distinguish rejection from stable function. Thus, like FOXP3, T-bet would probably be of no use for long-term monitoring of kidney transplant recipients.

Regarding the cytotoxic molecule GrzB, we present novel data showing that the mRNA of this molecule is not only increased in acute rejection as reported previously^{12–14} but also in CAMR. This increase was absent in other forms of late graft injury that are not due to alloimmune mechanisms such as chronic CNI toxicity or idiopathic TG. It is currently unclear as to whether idiopathic TG is CAMR sampled at an inactive time or is due to other causes. According to our results, the two can be distinguished by GrzB mRNA (Mann–Whitney test; $P < 0.05$ for both the biopsy and the PBMC), suggesting CAMR may be the active phase of the same glomerular disease or that idiopathic TG is caused by a GrzB-independent mechanism. For this molecule, measuring the mRNA appeared more sensitive than measuring the protein. We additionally show for the first time that, in contrast to acute rejection where GrzB is increased in the PBMC,^{16,17,26} during CAMR GrzB is significantly decreased. Furthermore, ROC analysis revealed that measuring GrzB mRNA may have potential as a decision-making tool in clinical practice to diagnose CAMR in a minimally invasive manner. Given that GrzB transcripts were significantly reduced in peripheral blood but significantly accumulated in biopsies of patients with CAMR, it is tempting to speculate that cytotoxic cells migrate from the blood to the graft during this form of rejection. However, because our blood and biopsies were from largely independent patients, this “mirror image” hypothesis would need confirmation on simultaneous blood and biopsy samples.

We also show here that other factors also influence GrzB in the peripheral blood, notably donor age and type of CNI. The positive association with donor age may be related to the fact that older kidneys are thought to be more immunogenic.²⁷ The significant reduction in GrzB in patients treated with FK-506 versus CsA again points toward the former drug as being more powerful than the latter in controlling effector responses, as mentioned above.

Thus, overall, we show distinct profiles of expression of regulatory, effector, and cytotoxic molecules in the grafts and blood of long-term-surviving renal transplant patients, each molecule being influenced by different clinical and demographic parameters. In fact, whereas neither intragraft nor peripheral blood FOXP3 or T-bet mRNA can distinguish between rejection and nonrejection status in long-term-surviving renal transplant patients, GrzB can indeed do so, with a possible migration of GrzB-expressing cells from the blood to the graft during CAMR. These data affirm GrzB as an important marker not only for acute rejection but also for chronic antibody-mediated rejection. Moreover, our study has identified several previously unreported clinical and demographic factors influencing regulatory/effector/cytotoxic profiles in the peripheral blood. These data also underline how important it will be for future studies of gene expression in transplantation to be

performed on large cohorts allowing for potential confounding factors to be taken into account when evaluating diagnostic, predictive, or mechanistic biomarkers. Analyzing other markers of CAMR, such as Tribbles-1²⁸ or TLR4,²⁹ markers of acute rejection, such as the cytotoxic molecules Perforin and Fas-L,^{12,30} or other regulatory T cell-associated markers, such as GITR,³¹ could help to better understand the pathogenesis of CAMR and contribute to its diagnosis.

CONCISE METHODS

Patients

The study was approved by the University Hospital Ethical Committee and the Committee for the Protection of Patients from Biologic Risks. The study was organized into two parts; the first based on graft biopsies and the second on peripheral blood.

Part 1: Comparison of Intragraft Regulatory, Effector, and Cytotoxic Profiles in Nonrejection versus Rejection.

Forty-eight biopsies from 48 patients were included for analysis and were selected according to their diagnosis based on the Banff classification criteria.³² Three groups of biopsies with late graft injury were included: lesions of calcineurin inhibitor toxicity (CNI tox; $n = 7$, all negative for C4d and DSA), idiopathic transplant glomerulopathy (TG; $n = 11$, all negative for C4d and DSA antibodies), and chronic antibody-mediated rejection (CAMR; $n = 14$, all had transplant glomerulopathy associated with C4d staining and circulating DSA). The demographic and clinical data for all of these individuals are provided in Table 2. Controls included a group of protocol biopsies with normal histology and stable graft function taken at 1 yr posttransplant (STA; $n = 7$, all negative for C4d and DSA) and a group of biopsies for cause with acute cellular rejection (ACR; $n = 9$, all negative for C4d and DSA). Clinical data for these control groups are provided in Supplementary Table 1.

Part 2: Comparison of Peripheral Blood Regulatory, Effector and Cytotoxic Profiles in Nonrejection versus Rejection.

One-hundred ninety-nine blood samples from 15 healthy volunteers (HV) and 184 kidney transplant patients were included for the analysis of PBMC. The first group of transplant patients had, at the time of sampling, stable graft function at least 5 yr posttransplant with undetermined biopsy status (STA; $n = 164$). Other groups included patients with deteriorating graft function with biopsy-proven idiopathic TG all negative for C4d and DSA (TG; $n = 7$) or deteriorating graft function with biopsy-proven transplant glomerulopathy together with C4d and circulating anti-HLA (CAMR; $n = 15$, all had transplant glomerulopathy associated with C4d staining and circulating DSA). The demographic and clinical data for all of these individuals are provided in Table 3. Controls included a group of patients with stable graft function (STA; $n = 10$) and a group of patients with acute cellular rejection (ACR; $n = 9$, all negative for C4d and DSA) early posttransplant. Clinical data for these two groups are provided in Supplementary Table 2.

Table 2. Clinical data for patients included in analysis of graft biopsies^a

	CNI tox	TG	CAMR	P
n	7	11	14	
Recipient age in yrs: median (range)	47 (29–56)	62 (45–75)	48 (24–71)	P < 0.05 (TG versus CAMR)
Gender ratio (M:F)	4:3	4:7	7:6	NP ^b
Donor age in yrs: median (range)	40 (16–48)	57 (8–65)	34 (14–75)	P < 0.05 (TG versus CAMR)
Time posttransplant yrs: median (range)	5 (1–11)	4 (1–14)	11 (1–18)	P = NS ^c
HLA mismatch: mean ± SD	2.7 ± 1.9	4.3 ± 1.4	3.5 ± 1.4	P = NS ^c
% First transplant	57	91	92	NP ^b
Cockcroft creatinine clearance (ml/mn): mean ± SD	57.1 ± 31.9	28.2 ± 17.3	25.8 ± 16.71	P = NS ^c
Proteinuria (g/24 h): median (range)	1.22 (0.14–4.47)	1.00 (0.89–5.92)	1.94 (0.80–3.17)	P = NS ^c
Banff Ci score: median (range)	1 (1–3)	1.5 (1–3)	2.0 (1–3)	P = NS ^c
IS protocol	Antimetabolite: 85% CNI: 100% Rapa: 0% Steroids: 43%	Antimetabolite: 100% CNI: 91% Rapa: 9% Steroids: 18%	Antimetabolite: 62% CNI: 92% Rapa: 0% Steroids: 23%	NP ^b

^aFor statistical comparison between the three groups (CNI tox, TG, and CAMR), a nonparametric Kruskal–Wallis test was performed followed by a Dunn's multiple comparison. Where the Kruskal–Wallis test revealed an overall statistical significance, the results of the Dunn's multiple comparison are also indicated.

^bNot possible because of insufficient numbers for analysis of categorical variables.

^cNot significant.

Table 3. Clinical data for patients included in analysis of PBMC^a

	HV	Renal Transplant Recipients			P
		STA	TG	CAMR	
n	15	164	7	15	
Recipient age in yrs: median (range)	48 (30–57)	53 (20–85)	60 (52–70)	51 (33–76)	NS ^b
Gender ratio (M:F)	6:9	101:63	3:4	7:8	NP ^c
Donor age in yrs: median (range)	NA ^d	36 (8–69)	59 (42–72)	41 (14–74)	P < 0.01 (TG versus STA TG versus CAMR)
Time posttransplant yrs: median (range)	NA ^d	8 (5–22)	5 (2–7)	8 (1–25)	P < 0.01 (TG versus STA)
HLA mismatch: mean ± SD	NA ^d	3.4 ± 1.3	4.4 ± 1.7	3.3 ± 1.8	NS ^b
% First transplant	NA ^d	100	86	73	NP ^c
Cockcroft Creatinine Clearance (ml/mn): mean ± SD	NA ^d	119 ± 30	21 ± 8	34 ± 18.9	P < 0.001 (TA versus TG STA versus CAMR)
Proteinuria (g/24 h): median (range)	NA ^d	0.15 (0.01–1.01)	1.30 (0.42–1.86)	2.41 (0.22–11.5)	P < 0.0001 (STA versus TG STA versus CAMR)
IS protocol	None	Antimetabolite: 78% CNI: 100% Steroids: 14%	Antimetabolite: 43% CNI: 86% Steroids: 43%	Antimetabolite: 67% CNI: 100% Steroids: 33%	P < 0.0001 (CsA versus FK-506) P < 0.05 (± steroids) ^e

^aFor statistical comparison between the three groups of interest (STA, TG, and CAMR), a nonparametric Kruskal–Wallis test was performed followed by a Dunn's multiple comparison. Where the Kruskal–Wallis test revealed an overall statistical significance, the results of the Dunn's multiple comparison are also indicated.

^bNot significant.

^cNot possible because of insufficient numbers for analysis of categorical variables.

^dNot applicable.

^eA chi-square test was performed to compare the STA and CAMR groups for type of CNI and the presence or absence of steroids.

RNA Extraction, Preparation of cDNA, and Real-Time Quantitative PCR

Biopsies (16 to 18 gauges) were homogenized with a PT 3100 Polytron Rotor-Stator (Kinematica, AG, Luzern, Switzerland). RNA was extracted using the QIAgen RNA microextraction kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France), and quality and quantity were determined using an Agilent 2100 BioAnalyzer (Palo Alto, CA). PBMC were sepa-

rated by density centrifugation using Lymphosep, lymphocyte separation media (Bio West, Nuaille, France), and RNA was extracted using the TRIzol method (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. For STA and ACR patients only, blood was collected in PAXgene tubes (Becton Dickinson, Le Pont Claix, France) and processed according to the manufacturer's instructions. RNA was reverse transcribed into cDNA using an RT-

Omniscript kit (QIAGEN). Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed in an Applied Biosystems GenAmp 7700 or 7900 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) using commercially available primer and probe sets (Applied Biosystems: FOXP3, Hs00203958_m1; GrzB, Hs00188051_m1; T-bet, Hs00203436_m1; IL-17a, Hs00174383). Hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT human, Hs99999909_m1) was used as an endogenous control to normalize RNA starting quantity. Relative expression between a given sample and a reference sample was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method,³³ where the reference represents one-fold expression, as described previously.³⁴ Here, the reference used was a pool of PBMC from three healthy volunteers. No differences in raw HPRT values were observed between groups in both the biopsy and the blood cohorts.

Quantification of Infiltrating Cells

Immunohistochemistry for FOXP3 was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue as described,⁹ using a rabbit polyclonal anti-FOXP3 antibody (ab10563, Abcam, Cambridge, MA), a mouse monoclonal antibody to T-bet (4B10, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), and mouse monoclonal anti-GrzB (MAB3070, Chemicon, Temecula, CA). Sections were scored for positive cells in coded slides by one observer (RBC), according to previously published methods,⁹ and the results were expressed as the number of positive cells in the cortex per square millimeter. Double immunohistochemistry stains were performed to determine the phenotype of the cells expressing FOXP3, T-bet, and GrzB,⁹ using FOXP3 versus CD4 or versus T-bet, T-bet versus FOXP3, versus GrzB, versus CD4 (1F6, Biocare Medical, Concord, CA), or versus CD20 (L26, Dako, Carpinteria, CA), and GrzB versus CD8 (SP16, Biocare Medical) versus FOXP3 or versus T-bet. Each of these double stains was done on 3 samples of CAMR.

Statistical Analysis

Nonparametric methods were used for all of the comparisons between the groups with small sample sizes (CNI tox, TG, and CAMR). In particular, the nonparametric Mann-Whitney test was used to compare differences in FOXP3, T-bet, and GrzB expression between two groups. The nonparametric Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison was used to compare differences in expression between three groups. A chi-square test was used to analyze differences in immunosuppression in the PBMC cohort. Values of $P < 0.05$ were considered as significant. ROC curve analysis was performed on the STA and CAMR PBMC samples to determine the cut-off point of GrzB mRNA that yielded the highest combined sensitivity and specificity in diagnosing CAMR (see Figure 5 legend for explanation).

Given the sufficiently large sample size, multivariate analyses were performed to determine the influence of different clinical and demographic parameters on the expression of FOXP3, T-bet, and GrzB in the 164 STA patients. Note that the other groups were not included in this analysis due to their small sample size. Either a multivariate linear regression analysis was performed following log transformation of the data (FOXP3 and T-bet) or a multivariate generalized linear model was performed when log transformation did not succeed in normalizing the data (GrzB displayed a gamma distribution). If the hypoth-

esis of linearity was not respected, then a polynomial function was used to model the relationship between the expression of the molecule measured and the clinical/demographic covariate.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank TcLand Expression, Nantes, France, for technical assistance and Dr. Baogui Li and Dr. Darshana Dadhania (Cornell University, New York) for providing samples and clinical data. The Fondation Progreffe and Reprogramming the Immune System in Transplantation (QLRT-2002-02127) are thanked for financial support. This work is also part of a French Transplantation Research Network (RTRS) supported by the Fondation de Coopération Scientifique CENTAURE.

This study was presented as an abstract at the American Transplant Congress; May 31 through June 4, 2008; Toronto, Canada.

DISCLOSURES

None.

REFERENCES

- Girlanda R, Kirk AD: Frontiers in nephrology: immune tolerance to allografts in humans. *J Am Soc Nephrol* 18: 2242-2251, 2007
- Ashton-Chess J, Brouard S, Souillou JP: Is clinical tolerance realistic in the next decade? *Transpl Int* 19: 539-548, 2006
- Wood KJ, Sakaguchi S: Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 3: 199-210, 2003
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY: Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 4: 330-336, 2003
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S: Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299: 1057-1061, 2003
- Yong Z, Chang L, Mei YX, Yi L: Role and mechanisms of CD4+CD25+ regulatory T cells in the induction and maintenance of transplantation tolerance. *Transpl Immunol* 17: 120-129, 2007
- Kang SM, Tang Q, Bluestone JA: CD4+CD25+ regulatory T cells in transplantation: Progress, challenges and prospects. *Am J Transplant* 7: 1457-1463, 2007
- Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, Hartono C, Li B, Sharma VK, Seshan SV, Kapur S, Hancock WW, Schwartz JE, Suthanthiran M: Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 353: 2342-2351, 2005
- Veronese F, Rotman S, Smith RN, Pelle TD, Farrell ML, Kawai T, Benedict Cosimi A, Colvin RB: Pathological and clinical correlates of FOXP3+ cells in renal allografts during acute rejection. *Am J Transplant* 7: 914-922, 2007
- Dijke IE, Velthuis JH, Caliskan K, Korevaar SS, Maat AP, Zondervan PE, Balk AH, Weimar W, Baan CC: Intragraft FOXP3 mRNA expression reflects antidonator immune reactivity in cardiac allograft patients. *Transplantation* 83: 1477-1484, 2007
- Yang H, Ding R, Sharma VK, Hilaire FS, Lagman M, Li B, Thomas DA, Luo X, Song P, Stauffer C, August P, Suthanthiran M: Hyperexpression of Foxp3 and IDO during acute rejection of islet allografts. *Transplantation* 83: 1643-1647, 2007

CLINICAL RESEARCH www.jasn.org

12. Lipman ML, Stevens AC, Strom TB: Heightened intragraft CTL gene expression in acutely rejecting renal allografts. *J Immunol* 152: 5120–5127, 1994
13. Strehlau J, Pavlakis M, Lipman M, Shapiro M, Vasconcellos L, Harmon W, Strom TB: Quantitative detection of immune activation transcripts as a diagnostic tool in kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 695–700, 1997
14. Sharma VK, Bologa RM, Li B, Xu GP, Lagman M, Hiscock W, Mouradian J, Wang J, Serur D, Rao VK, Suthanthiran M: Molecular executors of cell death—differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B, and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation* 62: 1860–1866, 1996
15. 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
16. Sabek O, Dorak MT, Kotb M, Gaber AO, Gaber L: Quantitative detection of T-cell activation markers by real-time PCR in renal transplant rejection and correlation with histopathologic evaluation. *Transplantation* 74: 701–707, 2002
17. 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
18. Grimbert P, Mansour H, Desvaux D, Roudot-Thoraval F, Audard V, Dahan K, Berrehar F, Dehouille-Poillet C, Farcet JP, Lang P, Le Gouvello S: The regulatory/cytotoxic graft-infiltrating T cells differentiate renal allograft borderline change from acute rejection. *Transplantation* 83: 341–346, 2007
19. Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH: A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100: 655–669, 2000
20. Smyth MJ, Trapani JA: Granzymes: Exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. *Immunol Today* 16: 202–206, 1995
21. Colvin RB: Antibody-mediated renal allograft rejection: Diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* 18: 1046–1056, 2007
22. Hoffmann SC, Hale DA, Kleiner DE, Mannon RB, Kampen RL, Jacobson LM, Cendales LC, Swanson SJ, Becker BN, Kirk AD: Functionally significant renal allograft rejection is defined by transcriptional criteria. *Am J Transplant* 5: 573–581, 2005
23. Mantel PY, Ouaked N, Ruckert B, Karagiannis C, Welz R, Blaser K, Schmidt-Weber CB: Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *J Immunol* 176: 3593–3602, 2006
24. Segundo DS, Ruiz JC, Izquierdo M, Fernandez-Fresnedo G, Gomez-Alamillo C, Merino R, Benito MJ, Cacho E, Rodrigo E, Palomar R, Lopez-Hoyos M, Arias M: Calcineurin inhibitors, but not rapamycin, reduce percentages of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 82: 550–557, 2006
25. Knoll GA, Bell RC: Tacrolimus versus cyclosporin for immunosuppression in renal transplantation: meta-analysis of randomised trials. *BMJ* 318: 1104–1107, 1999
26. Veale JL, Liang LW, Zhang Q, Gjertson DW, Du Z, Bloomquist EW, Jia J, Qian L, Wilkinson AH, Danovitch GM, Pham PT, Rosenthal JT, Lassman CR, Braun J, Reed EF, Gritsch HA: Noninvasive diagnosis of cellular and antibody-mediated rejection by perforin and granzyme B in renal allografts. *Hum Immunol* 67: 777–786, 2006
27. de Fijter JW, Mallat MJ, Doxiadis II, Ringers J, Rosendaal FR, Claas FH, Paul LC: Increased immunogenicity and cause of graft loss of old donor kidneys. *J Am Soc Nephrol* 12: 1538–1546, 2001
28. Ashton-Chess J, Giral M, Mengel M, Renaudin K, Foucher Y, Gwinner W, Braud C, Dugast E, Quillard T, Thebaud P, Chiffolleau E, Braudeau C, Charreau B, Souillou JP, Brouard S: Tribbles-1 as a novel biomarker of chronic antibody-mediated rejection. *J Am Soc Nephrol* 19: 1116–1127, 2008
29. Braudeau C, Ashton-Chess J, Giral M, Dugast E, Louis S, Pallier A, Braud C, Moreau A, Renaudin K, Souillou JP, Brouard S: Contrasted blood and intragraft toll-like receptor 4 mRNA profiles in operational tolerance versus chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 86: 130–136, 2008
30. Vasconcellos LM, Schachter AD, Zheng XX, Vasconcellos LH, Shapiro M, Harmon WE, Strom TB: Cytotoxic lymphocyte gene expression in peripheral blood leukocytes correlates with rejecting renal allografts. *Transplantation* 66: 562–566, 1998
31. Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S: Stimulation of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 3: 135–142, 2002
32. 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: Banff'05 Meeting Report: Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 7: 518–526, 2007
33. PE Applied Biosystems, FC: *ABI PRISM 7900 User Bulletin* 2:11–24, 1997
34. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{−ΔΔCT} method. *Methods* 25: 402–408, 2001

Supplemental information for this article is available online at <http://www.jasn.org/>.

2. Article n°2

Titre : Tribbles-1, un nouveau biomarqueur du rejet chronique humoral.

Auteurs : Joanna Ashton-Chess, Magali Giral, Michael Mengel, Karine Renaudin, Yohann Foucher, Wilfried Gwinner, Christophe Braud, **Emilie Dugast**, Thibaut Quillard, Pamela Thebault, Elise Chiffolleau, Cécile Braudeau, Béatrice Charreau, Jean-Paul Soulillou et Sophie Brouard

Article publié dans : Journal of American Society of Nephrology, 2008 Jun;19(6):1116-27

Titre original: Tribbles-1 as a novel biomarker of chronic antibody-mediated rejection

Tribbles-1 as a Novel Biomarker of Chronic Antibody-Mediated Rejection

Joanna Ashton-Chess,* Magali Giral,* Michael Mengel,[†] Karine Renaudin,[‡] Yohann Foucher,^{*§} Wilfried Gwinner,^{||} Christophe Braud,* Emilie Dugast,* Thibaut Quillard,* Pamela Thebault,* Elise Chiffolleau,* Cécile Braudeau,* Béatrice Charreau,* Jean-Paul Souillou,* and Sophie Brouard*

*INSERM, U643, and Centre Hospitalier Universitaire Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, Nantes, France; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France; [†]Institut für Pathologie and ^{||}Abteilung für Nephrologie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Germany; [‡]CHU Nantes, Service d'Anatomie Pathologique, Nantes, France; and [§]University of Montpellier I, Clinical Research Institute, Department of Biostatistics, Montpellier, France

ABSTRACT

Diagnosis of the specific cause of late allograft injury is necessary if more personalized and efficient immunosuppressive regimens are to be introduced. This study sought previously unrecognized biomarkers for specific histologic diagnoses of late graft scarring by comparison of gene sets from published microarray studies. Tribbles-1 (TRIB1), a human homolog of *Drosophila* tribbles, was identified to be a potentially informative biomarker. For testing this, mRNA expression in 76 graft biopsies, 71 blood samples, and 11 urine samples were profiled from independent cohorts of renal transplant patients with different histologic diagnoses recruited at two European centers. TRIB1 but not TRIB2 or TRIB3 was found to be a potential blood and tissue biomarker of chronic antibody-mediated rejection, an active immune-mediated form of chronic allograft failure associated with a poor prognosis. TRIB1 mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells discriminated patients with chronic antibody-mediated rejection from those with other types of late allograft injury with high sensitivity and specificity. TRIB1 was also upregulated in a rodent model of chronic cardiac vasculopathy, suggesting that this biomarker may be useful in other solid-organ transplants and across species. It was determined that TRIB1 is expressed primarily by antigen-presenting cells and activated endothelial cells. Overall, these data support the potential use of TRIB1 as a biomarker of chronic antibody-mediated allograft failure.

J Am Soc Nephrol 19: 1116–1127, 2008. doi: 10.1681/ASN.2007101056

Chronic allograft injury severely impedes successful kidney transplantation.^{1,2} Deciphering the mechanisms of such late graft loss would enable more personalized treatment strategies but is hindered by the difficulty in assigning specific diagnoses. Recently, chronic allograft nephropathy (CAN), the nonspecific term used to describe all manners of late graft scarring, was ousted for the term “interstitial fibrosis and tubular atrophy” (IF/TA), to be used in cases in which no underlying cause can be identified.³ IF/TA can be the result of mechanisms that are of unknown cause, non-immune mediated (e.g., as a result of function overload⁴ or calcineurin inhibitor toxicity (CNI tox)⁵) or immune mediated (e.g., chronic antibody-mediated rejection [AMR]⁶).

Distinguishing these different causes currently requires an invasive biopsy procedure. The discovery of novel and less invasive surrogate biomarkers of these different causes of late graft failure would facilitate the introduction of more targeted immu-

Received October 1, 2007. Accepted January 2, 2008.

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

Correspondence: Pr. Jean-Paul Souillou, IRT/INSERM U643, CHU Hôtel Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes, France, Cedex 1. Phone: +33-240-08-74-10; Fax: +33-240-08-74-11; E-mail: Jean-paul.souillou@university-nantes.fr, sophie.brouard@university-nantes.fr

Copyright © 2008 by the American Society of Nephrology

Table 1. Studies used to identify common biomarkers of late graft injury^a

Study	Subject	Sample	Gene List
Hotchkiss <i>et al.</i> , ¹³ 2006	CAN	Biopsies, Affymetrix	Selected upregulated genes in CAN (gene list published)
Flechner <i>et al.</i> , ¹² 2004	Banff grade 3 versus Banff 1	Biopsies, Affymetrix	Genes up in Banff 3 versus Banff 01 (gene list available on the authors' website)
Scherer <i>et al.</i> , ¹¹ 2003	CR	Biopsies, Affymetrix	Genes upregulated in biopsies at 6 mo that went on to develop CR at 1 yr versus biopsies at 6 mo with no CR at 1 yr (exhaustive gene list provided by the authors).
Donauer <i>et al.</i> , ¹⁰ 2003	CR	Biopsies, "homemade" according to Stanford protocol	Up in CR versus normal and polycystic kidneys (gene list published)

^aCR, chronic rejection.

nosuppression and thereby improve long-term outcome. Such an approach has proved successful in the case of acute cellular rejection, for which urine levels of Granzyme B and FOXP3 transcripts have been shown to have diagnostic and prognostic value.^{7–9} In the case of late graft injury, attention has been paid to genome-wide profiling in the search for biomarkers.^{10–14} Although such studies have thrown light onto the gene pathways concerned, the analyses were performed on graft biopsies, meaning that the genes identified might not be applicable to a noninvasive approach. Moreover, differences in sample preparation, amplification, microarray type, and data analysis can lead to different pathologic signatures, which could undermine the relevance of the identified biomarkers to a wider context.

As a means to identify potentially robust and less invasive biomarkers of specific causes of late graft injury, we used a literature gene-set comparison approach followed by screening of genes of interest on biopsies and peripheral blood from patients with various diagnoses of late graft failure. Here we describe the exploration of one such gene of interest. The gene encodes tribbles homolog 1 (TRIB1; also known as C8FW, GIG2, and SKIP1), an intracellular human homolog of *Drosophila* tribbles, a family with three members. In the *Drosophila*, TRIB coordinate mitosis and

morphogenesis.^{15–17} In mammals, some evidence suggests TRIB1 to be a potent regulator of mitogen-activated protein kinase signaling¹⁸ and to control the proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells¹⁹ as well as to modulate NF-IL-6–dependent gene expression after Toll-like receptor signaling.²⁰ The expression and role of endogenous TRIB1 in primary cells *in vivo* and thus its biologic relevance remain unknown.

Here we show that TRIB1 (but not TRIB2 or TRIB3) is significantly increased in both the blood and the graft but not the urine of kidney transplant patients who have chronic AMR versus other histologic and clinical diagnoses. These findings were reproduced in a rodent transplant model. TRIB1 is expressed primarily by antigen-presenting cells (APC) and, as such, is the first molecule of this type to be reported as a potential minimally invasive surrogate biomarker of chronic AMR.

RESULTS

Identification of TRIB1 mRNA as a Potential Biomarker of Chronic Graft Injury in Kidney Transplants

Comparison of the gene sets upregulated in late graft injury in four published studies concerning kidney transplantation

Table 2. Patients included in analysis of 6-mo protocol biopsies (Hanover Center)^a

Parameter	Group		
	Normal	CNI Tox	IF/TA
n	6	7	7
Recipient age (yr; median [range])	60 (19 to 69)	56 (38 to 65)	48 (30 to 65)
Gender ratio (M:F)	3:3	4:3	5:2
Donor age (yr; median [range])	39 (25 to 69)	43 (31 to 56)	52 (49 to 77)
Time after transplantation (mo)	6	6	6
HLA incompatibilities (mean ± SD)	2.0 ± 1.6	2.1 ± 1.8	2.3 ± 1.4
% First transplantations	83	100	100
Cockcroft creatinine clearance (ml/min; mean ± SD)	73 ± 33	48 ± 14	41 ± 14
Proteinuria (g/24 h; mean ± SD)	0.06 ± 0.03	0.04 ± 0.02	0.07 ± 0.04
Banff c grade (mean ± SD)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.14 ± 0.38
Immunosuppression protocol	Antimetabolite: MMF (4/6) CNI: CsA (3/6), FK 506 (2/6) Rapamycin (0/6) Steroids (6/6)	Antimetabolite: MMF (5/7) CNI: CsA (6/7), FK 506 (1/7) Rapamycin (1/7) Steroids (5/7)	Antimetabolite: MMF (4/7) CNI: CsA (1/7), FK 506 (6/7) Rapamycin (0/7) Steroids (7/7)

^aCsA, cyclosporin A; FK 506, Prograf; MMF, mycophenolate mofetil.

Table 3. Patients included in analysis of biopsies at ≥ 1 yr (Nantes Center)^a

Parameter	Group				
	Normal	CNI Tox	IF/TA	TG (C4d ⁺ , Anti-HLA ⁺)	TG (C4d ⁺ , Anti-HLA ⁺ ; Chronic AMR)
<i>n</i>	7	7	9	11	18
Recipient age (yr; median [range])	35 (18 to 61)	47 (29 to 56)	53 (24 to 56)	62 (45 to 75)	47 (24 to 71)
Gender ratio (M:F)	6:1	4:3	4:5	4:7	10:9
Donor age (yr; median [range])	34 (12 to 74)	40 (16 to 48)	48 (23 to 64)	57 (8 to 65)	35 (14 to 75)
Time after transplantation (yr; median [range])	1 (1-yr protocol biopsies)	5 (1 to 11)	2 (1 to 22)	4 (1 to 14)	9 (1 to 18)
HLA incompatibilities (mean $\pm$ SD)	2.8 $\pm$ 1.7	2.7 $\pm$ 1.9	2.8 $\pm$ 1.2	4.3 $\pm$ 1.4	3.0 $\pm$ 1.6
% First transplantations ^b	100	57	100	91	68
Cockcroft creatinine clearance (ml/min; mean $\pm$ SD)	75.6 $\pm$ 17.6	57.1 $\pm$ 31.9	56.8 $\pm$ 16.3	28.2 $\pm$ 17.3	29.1 $\pm$ 16.6
Proteinuria (g/24 h; median [range])	0.12 (0.05 to 0.43)	1.22 (0.14 to 4.47) ^c	0.14 (0.01 to 6.37)	1.00 (0.89 to 5.92)	1.88 (0.80 to 3.17)
C4d ⁺ biopsy	0/7	0/7	0/9	0/11	18/18
Banff c grade (mean $\pm$ SD)	0.0 $\pm$ 0.0	1.7 $\pm$ 0.8	1.3 $\pm$ 0.7	1.4 $\pm$ 0.7	2.1 $\pm$ 0.9
Immunosuppression protocol	Antimetabolite: Aza (0/7), MMF (6/7) CNI: CsA (0/7), FK 506 (6/7) Rapamycin (0/7) Steroids (1/7)	Antimetabolite: Aza (2/7), MMF (4/7) CNI: CsA (4/7), FK 506 (3/7) Rapamycin (0/7) Steroids (3/7)	Antimetabolite: Aza (2/9), MMF (6/9) CNI: CsA (1/9), FK 506 (4/9) Rapamycin (3/9) Steroids (4/9)	Antimetabolite: Aza (0/11), MMF (11/11) CNI: CsA (2/11), FK 506 (8/11) Rapamycin (1/11) Steroids (2/11)	Antimetabolite: Aza (2/18), MMF (9/18) CNI: CsA (8/18), FK 506 (6/18) Rapamycin (0/18) Steroids (4/18)

^aAza, azathioprine.

^bAll but one were from deceased donors.

^cOne patient had a proteinuria of 4.47 g/24 h at the time of biopsy, probably because of hyperfiltration (as a result of obesity [BMI >40]).

(Table 1) led to the identification of TRIB1 as a potential biomarker, being present in two of four of the gene sets. TRIB1 mRNA was upregulated in biopsies classified as displaying Banff grade 3 *versus* grade 0 in a study by Fleschner *et al.*¹² and was among the genes upregulated in 6-mo biopsies from kidneys that displayed CAN at 1 yr compared with 6-mo biopsies from kidneys that remained healthy at 1 yr, in a study by Scherer *et al.*¹¹ (exhaustive gene list provided by the authors).

Identification of TRIB1 mRNA as a Specific Intragraft Biomarker of Chronic AMR

Given the finding of TRIB1 mRNA upregulation in graft biopsies in two studies of the literature, differential TRIB1 expression was analyzed in biopsies with normal histology or different diagnoses of late injury (IF/TA of unknown etiology, CNI tox, transplant glomerulopathy [TG], and chronic AMR) from two independent cohorts of graft biopsies, one taken at an early time point (6-mo protocol biopsies) and the other at later time points (≥ 1 yr), from two European transplant centers (see the Concise Methods section and Tables 2 and 3 for definitions and clinical data). The rarity of biopsies diagnosed as chronic active cell-me-

diated rejection (C4d⁺ chronic transplant arteriopathy) precluded their inclusion in the study. No differences were observed between the two cohorts; therefore, the data were pooled. As shown in Figure 1A, the quantity of TRIB1 mRNA was significantly higher in biopsies with chronic AMR *versus* normal histology ($P < 0.001$; Kruskal-Wallis test followed by a Dunn multiple comparison test) as well as *versus* other histologic diagnoses ($P < 0.0001$ to $P < 0.05$; nonparametric Mann-Whitney test). This was specific to TRIB1 because the other family members TRIB2 and TRIB3 showed no significant regulation (Supplemental Figure 1A). TRIB1 levels in “nontransplant” kidneys and transplant kidneys with normal histology were identical ($P = 0.95$; data not shown), indicating that TRIB1 is not upregulated as a result of the immunosuppressive regimen.

TRIB1 levels were independent of recipient age ($r = -0.06$; NS), donor age ($r = -0.21$; NS), and number of donor-recipient HLA incompatibilities ($r = -0.12$; NS). Determination of the capacity of TRIB1 mRNA levels in graft biopsies to diagnose chronic AMR by receiver operating characteristic (ROC) curve analysis (Figure 1B) revealed a good discriminative power (area under the curve [AUC] of 0.7; 95% confidence

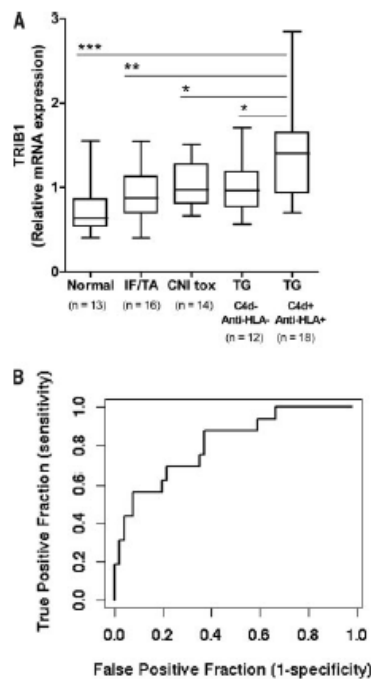


Figure 1. Differential TRIB1 mRNA expression in renal transplant biopsies and its capacity to diagnose chronic AMR. (A) TRIB1 mRNA transcription in biopsies displaying normal histology (Normal), IF/TA of unknown etiology, lesions evocative of CNI tox, TG (negative for C4d and anti-HLA), or chronic AMR (TG; positive for C4d and circulating anti-HLA). Results represent pooled data for 6-mo protocol biopsies and biopsies taken at ≥ 1 yr after transplantation (similar results were found for the two cohorts). Significantly higher levels of TRIB1 mRNA are present in chronic AMR than in normal histology ($P < 0.001$; Kruskal-Wallis test followed by a Dunn multiple comparison test) as well as versus other histologic diagnoses ($P < 0.0001$ to $P < 0.05$; nonparametric Mann-Whitney test). Statistical differences according to nonparametric Mann-Whitney tests are shown: *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$. TRIB1 mRNA was measured by quantitative RT-PCR, and expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method after normalization to the housekeeping gene hypoxanthine phosphoribosyl transferase (HPRT) with results expressed in arbitrary units (see the Concise Methods section for details). (B) ROC curve analysis of TRIB1 mRNA in the combined 6-mo and ≥ 1 yr biopsy cohorts. The ROC curve measures the ability of TRIB1 mRNA quantity to classify correctly patients with and without chronic AMR. The ROC is represented as a graphical plot of the sensitivity versus (1 – specificity) for a binary classifier system because its discrimination threshold is varied. The sensitivity (also referred to as the “true-positive fraction”) is how good the test is at picking out patients with chronic AMR. Specificity is the ability of the test to pick out patients who do not have chronic AMR. Thus, (1 – specificity) is also referred to as the “false-positive fraction.” The accuracy of the test (i.e., how well the test

interval 0.64 to 0.89) with a low sensitivity of 56% but a high specificity of 92% at a cutoff value of TRIB1 mRNA quantity of 1.31.

TRIB1 mRNA Is a Specific Peripheral Blood but not a Urine Biomarker of Chronic AMR

With the aim of less invasive detection, TRIB1 mRNA expression was next analyzed in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of healthy volunteers and patients under standard immunosuppression with either stable graft function or deteriorating graft function with biopsy-proven TG or chronic AMR (see Table 4 for clinical data). As shown in Figure 2A, the results paralleled those of the biopsies inasmuch as TRIB1 mRNA was significantly increased in the PBMC of patients with chronic AMR *versus* the healthy volunteers ($P < 0.0001$) as well as *versus* patients with stable graft function ($P < 0.01$) and patients with deteriorating graft function with biopsy-proven TG ($P < 0.05$). Again, this was specific to TRIB1 because TRIB2 and TRIB3 showed no regulation (Supplemental Figure 1B). TRIB1 levels were independent of recipient age ($r = -0.08$; NS), donor age ($r = -0.02$; NS), number of donor–recipient HLA incompatibilities ($r = -0.04$; NS), and time after transplantation ($r = -0.05$; NS). Moreover, TRIB1 levels were independent of cytomegalovirus status (data not shown). ROC curve analysis (Figure 2B) showed that measuring TRIB1 mRNA in the blood is a good discriminator of chronic AMR, with an AUC of 0.8 (95% confidence interval 0.67 to 0.91), a specificity of 88%, and a sensitivity of 75% (much higher than for the biopsies) at a cutoff value of 1.57. Thus, measuring TRIB1 in blood appears more informative than measuring TRIB1 in biopsies.

Finally, to determine whether TRIB1 mRNA could serve as a totally noninvasive biomarker, we analyzed its expression in urine pellets. Preliminary analyses in urine samples from patients with normal graft histology ($n = 4$) and patients with chronic AMR ($n = 7$) showed that this was not the case, with no significant differences between the two groups (Figure 2C).

TRIB1 Is a Blood and Intragraft Biomarker of Chronic AMR in the Rat

To determine the relevance of TRIB1 to chronic AMR in general (not limited to kidney transplantation and humans), we analyzed TRIB1 mRNA at day 100 after transplantation in the allografts and PBMC of rat recipients of MHC-mismatched cardiac allografts that were either tolerant (grafts displaying no histologic signs of rejection) or presenting a graft histology similar to that of chronic AMR in humans (grafts displaying

separates patients with and without chronic AMR) is measured by the area under the ROC curve, where an area of 1.0 represents a perfect test. Thus, the ROC curve should climb rapidly toward the upper left hand corner of the graph, meaning that the false-negative rate is high and the false-positive rate is low.

Table 4. Patients included in analysis of PBMC^a

Parameter	Group			
	Healthy Volunteers	Stable	TG (C4d ⁻ , Anti-HLA ⁻)	TG (C4d ⁺ , Anti-HLA ⁺ ; Chronic AMR)
n	17	27	7	20
Recipient age (yr; median [range])	48 (24 to 58)	54 (24 to 79)	63 (52 to 70)	50 (27 to 76)
Gender ratio (M:F)	8:9	16:11	4:3	9:11
Donor age (yr; median [range])	NA	27 (14 to 68)	62 (42 to 68)	37 (14 to 75)
Time after transplantation (yr; median [range])	NA	8 (3 to 22)	5 (2 to 7)	8 (1 to 25)
HLA incompatibilities (mean $\pm$ SD)	NA	3.3 $\pm$ 1.1	4.1 $\pm$ 1.6	3.0 $\pm$ 1.9
% First transplantations ^b	NA	100	86	60
Cockcroft creatinine clearance (ml/min; mean $\pm$ SD)	NA	69.4 $\pm$ 31.4	19.4 $\pm$ 8.7	30.7 $\pm$ 15.6
Proteinuria (g/24 h; median [range])	NA	0.14 (0.00 to 1.17) ^b	1.39 (0.42 to 2.98)	3.22 (0.13 to 11.52)
C4d ⁺ biopsy	NA	NA (biopsy not available)	No	Yes
Banff c grade (mean $\pm$ SD)	NA	NA (biopsy not available)	2.3 $\pm$ 0.6	1.7 $\pm$ 1.2
Immunosuppression protocol	None	Antimetabolite: Aza (6/27), MMF (17/27) CNI: CsA (22/27), FK 506 (5/27) Steroids (4/27)	Antimetabolite: Aza (0/7), MMF (3/7) CNI: CsA (0/7), FK 506 (7/7) Steroids (3/7)	Antimetabolite: Aza (1/20), MMF (12/20) CNI: CsA (4/20), FK 506 (13/20) Steroids (11/20)

^aNA, not applicable.

^bOne STA patient had a proteinuria >1 g/24 h (1.17), which was likely due to hyperfiltration as a result of obesity (BMI 46.6); she had excellent clearance (106 ml/min).

histologic signs typical of chronic rejection including patches of mononuclear infiltrates within the myocardium, myocardial fibrosis, and varying degrees of chronic transplant vasculopathy, as well as presence of circulating and intra-graft alloantibodies).²¹ In accordance with the observations made in the human kidney transplant patients, TRIB1 mRNA was significantly increased in both the heart allograft and the PBMC of the rat recipients whose grafts displayed signs of chronic transplant vasculopathy *versus* those that showed no signs of rejection 100 d after transplantation ($P < 0.05$; Figure 3), further confirming the relevance of TRIB1 to chronic AMR in a rodent model and, additionally, in cardiac allotransplantation.

TRIB1 mRNA Is Primarily a Marker of APC and Endothelial Cells

Given the specific regulation of TRIB1 described in the previous section and the lack of knowledge concerning endogenous tribbles expression even under normal conditions, we next analyzed TRIB1, 2, and 3 mRNA in various immune compartments and peripheral blood cell subtypes of healthy volunteers. The results presented in Figure 4 show that each family member has specific tissue- and cell type-specific expression with TRIB1 displaying a profile distinct from that of TRIB2 and 3, which themselves display relatively similar expression profiles. In particular, within the immune system (Figure 4A), TRIB1 is expressed to the greatest extent in peripheral blood lymphocytes, whereas TRIB2 and

TRIB3 are expressed predominantly in the spleen. Within the PBMC, TRIB1 is expressed primarily by monocytes and B cells (Figure 4B), whereas TRIB2 and 3 are expressed almost exclusively by lymphocytes: T and B cells in the case of TRIB2 and B cells only in the case of TRIB3. Analysis of peripheral blood monocytes and monocyte-derived dendritic cells (DC) showed that TRIB1 is a marker of activated monocytes and certain types of mature DC (Figure 4C), whereas TRIB2 is expressed only by immature DC, and TRIB3 shows little if any regulation in these cell types. Finally, given that the increased TRIB1 mRNA levels in biopsies with chronic AMR could be the result of chronic endothelial cell (EC) activation by anti-HLA antibodies, complement, and proinflammatory mediators, we studied TRIB1 transcription in resting *versus* activated human renal artery-derived EC.

The data in Figure 4D show that TRIB1 is indeed a marker of activated EC, being upregulated upon activation with the proinflammatory cytokine TNF- α . This was not the case for TRIB2, which is downregulated upon activation and TRIB3, which showed no regulation under these conditions. Basal TRIB1 levels were approximately five-fold lower in EC than in monocytes (data not shown). Taken together, these data show that TRIB1 is primarily a marker of APC and EC, where it is regulated differentially according to cell type and activation status as well as with respect to its fellow family members.

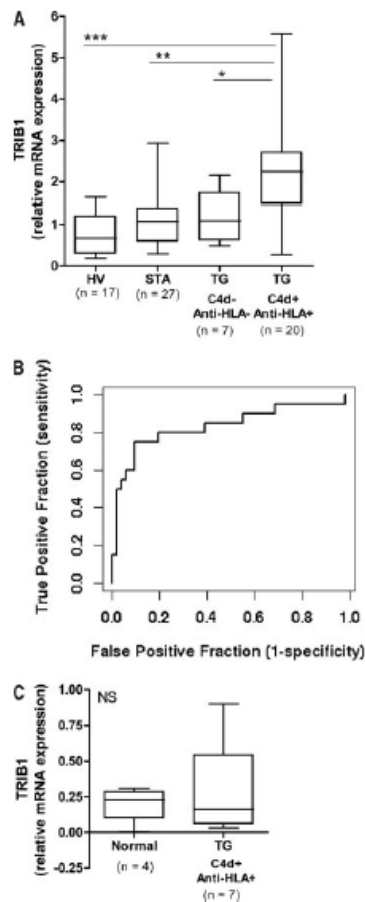


Figure 2. Differential TRIB1 mRNA profiles in the PBMC of renal transplant patients. (A) TRIB1 mRNA transcription in PBMC from healthy volunteers (HV), patients with stable graft function under standard immunosuppression (STA), deteriorating graft function under standard immunosuppression with biopsy-proven TG (negative for C4d and anti-HLA), and deteriorating graft function under standard immunosuppression with biopsy-proven chronic AMR (TG, positive for C4d and anti-HLA). Statistical differences according to nonparametric Mann-Whitney tests are shown; *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$; * $P < 0.05$. TRIB1 mRNA was measured by quantitative RT-PCR, and expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method after normalization to the housekeeping gene HPRT with results expressed in arbitrary units (see the Concise Methods section for details). (B) ROC curve analysis of TRIB1 mRNA in the PBMC (see Figure 1 legend for explanation). (C) TRIB1 mRNA quantification in urine from renal transplant patients with normal graft histology and biopsy-proven chronic AMR. Expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method after normalization to the housekeeping gene 18S, with results expressed in arbitrary units (see the Concise Methods section for details).

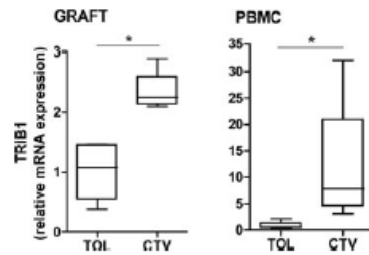


Figure 3. Differential TRIB1 mRNA profiles in the PBMC and allografts of rat recipients of MHC-mismatched heart grafts. TRIB1 mRNA transcription at day 100 after transplantation in the allografts and PBMC of rat recipients of MHC-mismatched cardiac transplants displaying normal histology after a 20-d course of the deoxyspergualin analogue LF015-095 (TOL) or displaying signs of chronic transplant vasculopathy (CTV) after pretransplantation DST as described previously.²¹ Note that the results are expressed in arbitrary units and the y axes of the two graphs are not comparable because different reference samples were used for each sample type. Rat *Trb1* mRNA was measured by quantitative RT-PCR using custom-made primers and probes, and expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method after normalization to the housekeeping gene HPRT (see the Concise Methods section for details).

DISCUSSION

In this study, we set out to discover novel minimally invasive biomarkers of more precise histologic diagnoses of late graft scarring. Using a literature gene-set comparison approach for late graft injury, we identified TRIB1, a human homolog of *Drosophila* tribbles,^{15–17} as a potentially informative biomarker. TRIB1 is a scarcely characterized member of the tribbles family (see references^{22,23} for review) that has been shown to be a potent regulator of cell signaling¹⁸ in various cells lines. We thus explored the potential of TRIB1 as a tissue, peripheral blood, and urine biomarker by measuring its mRNA profiles in graft biopsies, blood, and urine from healthy volunteers and kidney transplant recipients with different histologic and/or clinical diagnoses. We also used a bedside-to-bench approach by analyzing its expression in a rodent model of chronic transplant vasculopathy with alloantibodies and complement activation.

Overall, we found that TRIB1 mRNA but not that of its fellow family members was specifically increased in graft biopsies and blood but not urine from patients with chronic AMR, a state of active, immunologically driven, late graft injury that was recently individualized as a specific entity.³ Moreover, TRIB1 mRNA in the blood was more specific and sensitive for diagnosing chronic AMR than TRIB1 mRNA in biopsies. These results were reproduced in a rodent cardiac transplant model, where, again, TRIB1 mRNA was specifically increased in both the blood and grafts of rats with chronic transplant vasculopathy, suggesting that this biomarker could potentially be informative in heart transplantation and that this rodent model may be useful for further analyses of TRIB1 in trans-

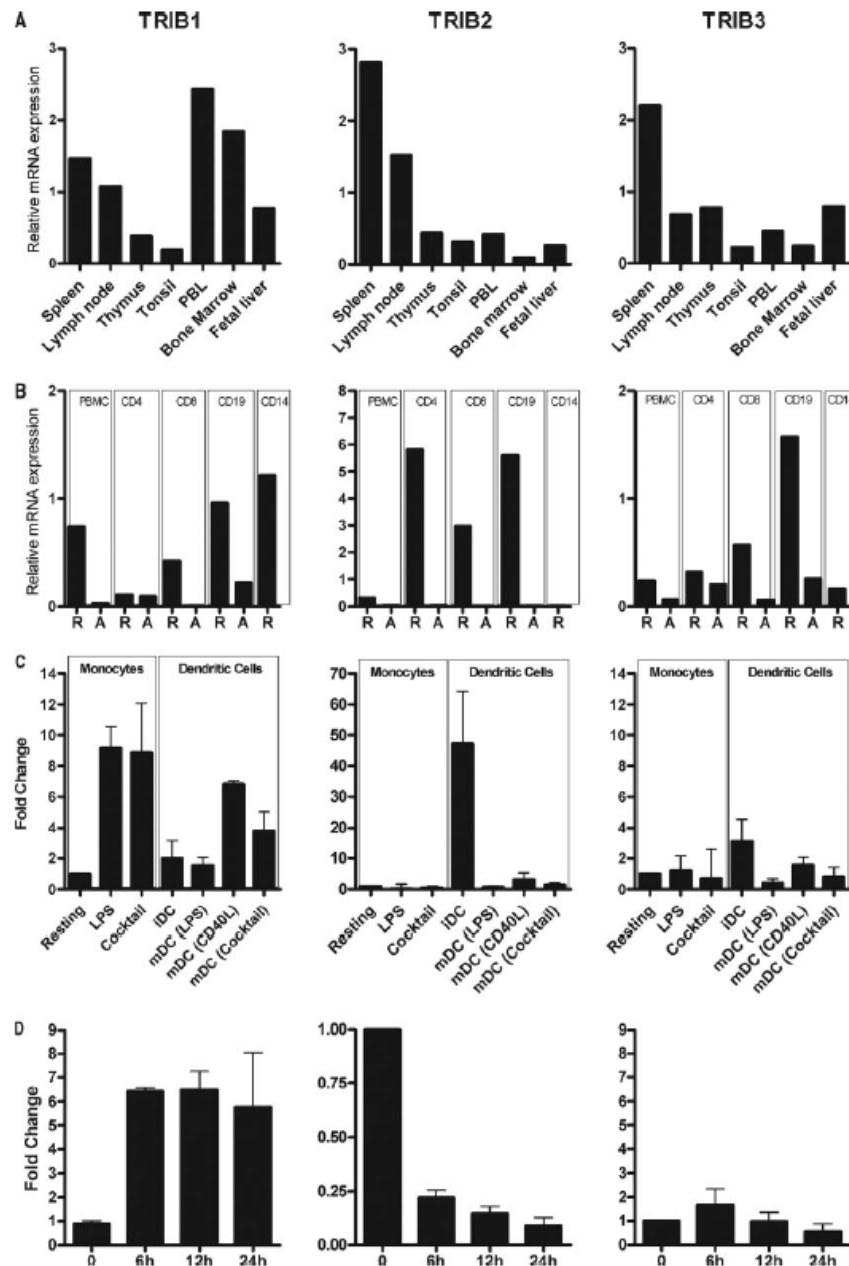


Figure 4. Human tribbles mRNA expression within the immune system and various cell subtypes of healthy individuals. (A and B) TRIB1 (left), TRIB2 (middle), and TRIB3 (right) mRNA in various immune compartments (A) and resting (R) and activated (A) peripheral blood cell (PBL) subtypes of healthy volunteers (B; commercially available cDNA sets derived from a pool of healthy human donors [see the Concise Methods section]; note that activated monocytes were not provided with the set). Results are expressed in arbitrary units. (C)

plantation. Although currently limited by a lack of available tools, functional analyses of TRIB1 in this rodent transplant model would be very informative because they could help to determine whether TRIB1 is a potential therapeutic target. Along these lines, we are developing TRIB1 knockout mice so as to address these issues. Moreover, examining TRIB1 in various cell types in rat allografts or blood samples and any differences in mitogen-activated protein kinase signaling pathways downstream of TRIB1 could provide mechanistic insights of relevance in chronic AMR.

The finding that TRIB1 transcript accumulation was significantly higher in chronic AMR than all of the other diagnoses studied, including in C4d⁺ and anti-HLA⁺ TG, suggests TRIB1 to be a marker of an active immune response. Although TG is thought to be closely associated with AMR,^{24,25} the exact pathogenesis of C4d⁺ and anti-HLA⁺ TG is unclear. Several explanations were put forward at the 2005 Banff meeting,³ including residual injury from previous episodes of AMR, T cell-mediated responses, or nonalloimmune causes. Our results suggest this pathology to be indeed different from the C4d⁺, anti-HLA⁺ equivalent. The expression of TRIB1 mRNA in APC and, in particular, activated monocytes and DC lend further credence to its implication in an active immune response. Moreover, we found TRIB1 to be upregulated in the blood of patients with ANCA-associated vasculitis (J.A.-C., unpublished observations), further supporting TRIB1 as a biomarker of ongoing immune activation and an antibody response.

Several hypotheses could explain the increase in TRIB1 in the graft. First, our finding of TRIB1 expression by activated EC suggests that this increase could be the result of intragraft EC activation through antibody deposition and complement activation in chronic AMR *versus* other types of late graft injury. The increase could also arise from an increase in TRIB1-expressing infiltrating APC within the grafts displaying chronic AMR. Although a specific increase in infiltrating APC in chronic AMR has not been formally reported to date, this is likely given that an increased monocyte infiltrate has been reported in C4d⁺ cases of acute rejection,²⁶ and a recent report showed that C4d⁺ biopsies have a higher monocyte/T cell ratio than C4d[−] ones.²⁷ Although an increase in B cell infiltration has been reported in chronic AMR, resulting from a phenomenon known as lymphoid neogenesis,²⁸ it is unlikely that TRIB1 is increased as a result of this because TRIB3, which is expressed primarily by B cells, was not increased and activated B cells downregulate their TRIB1 mRNA.

In the PBMC, despite being expressed primarily in monocytes and B cells, it is unlikely that the increase in

TRIB1 in the blood stems from an increase in either of these cell types because TRIB1 mRNA did not correlate tightly with blood monocyte numbers (Spearman $r = 0.37$); TRIB1 is downregulated by activated B cells; TRIB3 was not increased in chronic AMR despite its exclusive expression by B cells; and we previously reported no significant differences in B cell numbers between patients with chronic AMR, patients with stable graft function, and healthy volunteers.²⁹ It is possible, therefore, that the value of TRIB1 in PBMC is related to the level of activation of monocyte or DC subsets, reflecting rather an increase in the proportion of activated monocytes or DC. Another possibility is that TRIB1 is increased as a result of an increase in circulating TRIB1-expressing EC or their progenitors. It indeed was reported previously that patients with vascular rejection have increased numbers of circulating EC.³⁰ Confirmation of these hypotheses would require an adequate antibody to detect endogenous TRIB1, which is currently unavailable.

In the rat model used, in which the results reflected those in the renal transplant patients, the lumens of the blood vessels within hearts displaying chronic transplant vasculopathy (CTV) were obstructed by numerous CD68⁺ monocyte/macrophage infiltrates, which was not the case in the tolerant animals in which the phenomenon of EC accommodation was observed.²¹ As for the renal transplant patients, no significant differences were found in the blood cell numbers of the two groups of rats (unpublished), suggesting rather an increase in activated *versus* resting monocytes or an increase in circulating TRIB1-expressing EC.

In conclusion, we have identified TRIB1 mRNA as a potential minimally invasive biomarker of chronic AMR because it is upregulated in the peripheral blood, where it displays high sensitivity and specificity. Although it is unlikely that TRIB1 is a stand-alone biomarker for chronic AMR, so far we have been unable to identify other molecules that show the same expression profile, even among well-characterized markers such as Granzyme B (data not shown); however, in the event of other biomarkers' being identified, TRIB1 could form part of a panel of genes, as in the case of the Cardiac Allograft Rejection Gene Expression Observation (CARGO) study.³¹ Moreover, this study focused on chronic injury, but TRIB1 could also be increased in acute rejection. TRIB1 differs from the other minimally invasive biomarkers of transplant rejection described to date that are of T/NK cell origin,^{7–9,32} in that it is expressed primarily by APC as well as EC. As such, our findings point toward a possible but as yet unconfirmed role for APC in this pathology. These data now need to be confirmed in longitudinal and multicenter analyses. Such analyses could

Fold change in TRIB1, TRIB2, and TRIB3 mRNA in resting and activated monocytes (24 h with LPS or a proinflammatory cocktail [see the Concise Methods section for details]) and in immature DC (iDC) and mature DC (mDC) after 48 h of activation with LPS, CD40L, or the same proinflammatory cocktail ($n = 3$). D. Fold change in TRIB1, TRIB2, and TRIB3 mRNA in resting *versus* activated (TNF- α for 6, 12, and 24 h) human renal aorta-derived EC ($n \geq 3$). TRIB1 mRNA was measured by quantitative RT-PCR, and expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method after normalization to a housekeeping gene HPRT (see the Concise Methods section for details).

contribute to the development of a blood test to diagnose chronic AMR without the need for C4d staining on invasive biopsies or to identify patients who may be experiencing chronic AMR and require a biopsy. This would facilitate a more rapid introduction of targeted immunosuppressive regimens to improve long-term graft outcomes.

CONCISE METHODS

Gene-Set Comparison

With the aim of identifying robust biomarkers of late graft injury, we compared the gene sets from four different published microarray studies of late graft injury in kidney transplant biopsies using different platform technologies^{10–13} (see Table 1). All genes (>3000 in total) were converted into a single identifier, the “gene ID,” using the gene ID conversion tool available on the DAVID Bioinformatic Resources 2006 website (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) and repeats of the same ID identified by sorting in Microsoft Excel.

Patients

The study was performed on 76 biopsies, 71 blood samples, and 11 urine samples. All patients and healthy volunteers who participated in this study gave informed consent, and the study was approved by the University Hospital Ethical Committee and the Committee for the Protection of Patients from Biologic Risks at both participating centers (Nantes, France, and Hannover, Germany).

6-Mo Protocol Biopsies. Six-month protocol biopsies (Protocol Biopsy Program, Hannover, Germany^{33,34}) were classified according to the updated Banff classification criteria^{3,35} as showing normal histology ($n = 6$), lesions of IF/TA of unknown etiology ($n = 7$), or CNI tox ($n = 7$). The demographic and clinical data for these patients are provided in Table 2.

Biopsies at ≥ 1 Yr. Biopsies at ≥ 1 yr (Nantes CHU) were classified according to the updated Banff classification criteria^{3,35} as displaying normal histology ($n = 7$), lesions of IF/TA of unknown etiology ($n = 9$), lesions of CNI tox ($n = 7$), TG (C4d⁺ and anti-HLA⁺; $n = 11$), or chronic AMR (defined by the diagnostic triad of circulating anti-HLA antibody^{36,37} associated with TG and deposition of the complement split product C4d in graft biopsies^{36,38} (see also reference³; $n = 18$). None of the chronic AMR biopsies displayed signs of acute AMR such as vascular necrosis, thrombosis, or edema. The biopsies showed a variable degree of capillaritis and glomerulitis with lymphocyte and macrophage elements. The demographic and clinical data for all of these patients are provided in Table 3.

PBMC. PBMC (Nantes CHU) were prepared from the blood of healthy volunteers ($n = 17$) and 54 kidney transplant patients whose statuses were defined on a histologic and/or clinical basis (see next). The demographic and clinical data for these patients are provided in Table 4.

• Standard Immunosuppression with Stable Graft Function: Patients under standard immunosuppression with stable graft function

($n = 27$; creatinemia $<150 \mu\text{mol/L}$ and proteinuria $<1 \text{ g/24 h}$ for at least 3 yr including over the two previous follow-up appointments with $<20\%$ change between the two time points [6 mo]) and no circulating anti-HLA antibodies at the time of the blood sample. No biopsies were available for these patients because they presented no deterioration of graft function (certain cDNA samples were prepared by TcLand S.A., Nantes, France).

• TG: Patients under standard immunosuppression with biopsy-proven TG ($n = 7$; basement membrane duplication negative for both C4d and circulating anti-HLA).

• Chronic AMR: Patients under standard immunosuppression with biopsy-proven chronic AMR ($n = 20$) according to the already described definition. Both TG and chronic AMR were diagnosed on biopsies performed in the context of a progressive deterioration of renal function (blood creatinemia $\geq 150 \mu\text{mol/L}$ and/or proteinuria $\geq 1 \text{ g/24 h}$). Sixteen patients overlapped between the PBMC and the Nantes biopsy cohorts (blood samples were unavailable for certain patients included in the biopsy cohort and *vice versa*).

Urine. Urine (Nantes CHU) consisted of kidney transplant patients with normal histology ($n = 4$) or chronic AMR ($n = 7$), all of whom were included in the Nantes biopsy cohort.

Rat Heart Transplant Model of Chronic Rejection

The rat transplantation model used has been described previously.^{21,39,40} Briefly, the model used was that of heart allotransplantation from LEW.1W donors to MHC-mismatched LEW.1A recipients receiving either a donor-specific blood transfusion (DST) 7 and 14 d before transplantation or a 20-d course of the deoxyspergualin analogue LF015-095. In this model, at day 100 after transplantation, the grafts of DST-treated animals showed clear-cut histologic signs of chronic transplant vasculopathy,^{21,41} whereas those of LF015-095-treated animals did not and thus were tolerant.^{21,40} As previously reported,^{21,40} this tolerance was donor specific. Analyses were performed on DST-treated ($n = 4$) and LF-treated recipients ($n = 4$) at day 100 after transplantation.

Biopsies, PBMC, and Urine

Human kidney transplant biopsies were taken with a 16- or 18-G needle and either stored in RNAlater (QIAGEN, Courtaboeuf, France) or embedded in Tissue Tek (Miles, Elkhart, IN), snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C . Rat heart transplant tissue was processed as described previously.²¹ Peripheral blood from healthy volunteers, patients, and rats was collected in EDTA Vacutainers, and PBMC were separated by density centrifugation using Lymphoprep, lymphocyte separation media (Bio West, Nuaille, France). PBMC were stored in TRIzol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) at -80°C until use. Human urine samples ($\geq 50 \text{ ml}$) were collected in sterile containers and treated within 2 h.

Preparation and Activation of Human PBMC and DC and Human Renal Artery-Derived EC

Monocytes were prepared by positive selection using MACS anti-CD14 antibody-conjugated magnetic microbeads (Miltenyi Biotec,

Paris, France; purity >97%). For monocyte-derived DC differentiation, CD14⁺ cells were cultured as described previously⁴² except that at day 5, cells were washed and cultured for an additional 48 h in medium alone; 1 μ g/ml LPS; 1 μ g/ml shCD40L (Amgen, Thousand Oaks, CA); or a proinflammatory cocktail consisting of 10 ng/ml recombinant human TNF- α , 20 ng/ml recombinant human IL-6, 10 ng/ml recombinant human IL-1 α (all from R&D Systems, Abingdon, UK), and 1 μ g/ml PGE2 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). For monocyte activation tests, CD14⁺ cells were cultured (1×10^6 cells/ml) as previously for 24 h alone or in the presence of 1 μ g/ml LPS or the previous proinflammatory cocktail. Human renal artery-derived EC were cultured and activated with recombinant human TNF- α as described previously⁴³ for 6, 12, and 24 h. At least 10^6 monocytes, DC, and EC were washed and resuspended in the appropriate volume of TRIzol reagent and stored at -80°C until use.

RNA Extraction and Preparation of cDNA

RNA extraction from all biopsies was performed using the QIAGEN RNA microextraction kit (QIAGEN) with on-column DNase treatment according to the manufacturer's instructions. In the case of Tissue Tek-embedded biopsies, the biopsies were recovered before homogenization by a rapid passage in ice-cold RNase-free water. Homogenization was performed with a PT 3100 Polytron Rotor-Stator (Kinematica, AG, Luzern, Switzerland). RNA quality and quantity were determined using an Agilent 2100 BioAnalyzer (Palo Alto, CA). The total quantity of RNA extracted per biopsy ranged from approximately 50 ng to 2 μ g. RNA was reverse-transcribed into cDNA using an RT-Omniscrypt kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions. RNA was extracted from cardiac allografts as described previously.²¹ RNA was extracted from human and rat PBMC, human monocytes, DC, and EC using the TRIzol method (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA was removed by DNase treatment (Roche, Indianapolis, IN). RNA concentration was calculated using a Nanodrop ND1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE), and RNA quality was determined by running 1 μ g on an agarose gel. RNA was reverse-transcribed into cDNA using polydT oligonucleotide and Maloney leukemia virus reverse transcription (Invitrogen). RNA was extracted from human urine samples as described previously³² and reverse-transcribed into cDNA using an RT-Omniscrypt kit (QIAGEN) according to the manufacturer's instructions.

Human Immune System and Blood Fractions cDNA

Human Immune System and Blood Fraction MTC panels containing cDNA from a pool of donors together with a positive and negative control were purchased from Ozyme (Saint-Quentin en Yvelines, France). The Immune System panel included cDNA from human peripheral blood leukocytes, bone marrow, spleen, lymph node, fetal liver, thymus, and tonsil. The Blood Fractions panel included cDNA from resting and activated human PBMC, CD4, CD8, and CD19 cells as well as resting CD14 cells (activated CD14 cells not provided).

Real-Time Quantitative PCR

Real-time quantitative PCR was performed in an Applied Biosystems GenAmp 7700 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) using a commercially available primer and probe set for human TRIB1, TRIB2, and TRIB3 (Applied Biosystems; Hs00179769_m1, Hs00222224_m1, and Hs01082394_m1). For measurement of rat Trib1, Applied Biosystems File Builder software was used to design a primer and probe set to cover the interexonic regions of the homologous sections of the rat and mouse mRNA sequences (NM_144549.2 and XM_343250.3; forward primer sequence GC-CCACTGCCACCAGT, reverse primer sequence GGGCAGCCAT-GTTTATCTGACA, probe sequence ACCCAGCTTAGACTG-GAAAG). Specificity was checked using BLAST on the National Center for Biotechnology Information website (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Hypoxanthine phosphoribosyl transferase (human Hs99999909_m1; rat Rn01527838_g1) or 18S (Hs99999901_s1; for urine samples only) were used as endogenous controls to normalize RNA starting quantity. Relative expression between a given sample and a reference sample was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method,⁴⁴ where the reference represents one-fold expression, as described previously.⁴⁵

Statistical Analyses

The nonparametric Mann-Whitney test was used for comparison between two groups, and the nonparametric Kruskal-Wallis test was performed for comparison of more than two groups. The nonparametric Spearman test was used for correlations. Values of $P < 0.05$ were considered as significant. ROC curve analysis was performed to determine the cutoff point of TRIB1 mRNA in biopsies and blood that yielded the highest combined sensitivity and specificity in diagnosing chronic AMR (see Figure 1 legend for explanation).

ACKNOWLEDGMENTS

M.M. is a recipient of research grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (ME 2097/3-1) and the Dr. Werner Jackstadt Kidney Foundation.

Part of this study was presented as an abstract at the World Transplant Congress (Boston, MA; July 22–27, 2006) and at the American Transplant Congress (San Francisco, CA; May 5–9, 2007).

We thank the authors of the published microarray studies of CAN in human renal allotransplantation for making their data publicly available and Dr. A. Scherer, Dr. F. Raulf, and colleagues at Novartis (Basel, Switzerland) for providing the exhaustive gene list from their published microarray study. We also thank TcLand S.A. (Nantes, France) for technical assistance. Finally, we thank the Fondation Progreffe and the Agence de la Biomédecine for financial support, Hermann Haller, and Régis Josien for critically reading the manuscript.

DISCLOSURES

J.A.C., M.G., C.B., S.B., and J.P.S. hold a patent concerning TRIB1 for the diagnosis of chronic rejection in transplantation.

REFERENCES

- Pascual M, Theruvath T, Kawai T, Tolkoff-Rubin N, Cosimi AB: Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 346: 580–590, 2002
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Allen RD, Chapman JR: The natural history of chronic allograft nephropathy. *N Engl J Med* 349: 2326–2333, 2003
- 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: Banff'05 meeting report: Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 7: 518–526, 2007
- Giral M, Nguyen JM, Karam G, Kessler M, Hurault de Ligny B, Buchler M, Bayle F, Meyer C, Foucher Y, Martin ML, Daguin P, Souillou JP: Impact of graft mass on the clinical outcome of kidney transplants. *J Am Soc Nephrol* 16: 261–268, 2005
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, O'Connell PJ, Chapman JR, Allen RD: Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: Longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* 78: 557–565, 2004
- Colvin RB: Antibody-mediated renal allograft rejection: Diagnosis and pathogenesis. *J Am Soc Nephrol* 18: 1046–1056, 2007
- Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, Hartono C, Li B, Sharma VK, Seshan SV, Kapur S, Hancock WW, Schwartz JE, Suthanthiran M: Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 353: 2342–2351, 2005
- Li B, Hartono C, Ding R, Sharma VK, Ramaswamy R, Qian B, Senur 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
- Veale JL, Liang LW, Zhang Q, Gjertson DW, Du Z, Bloomquist EW, Jia J, Qian L, Wilkinson AH, Danovitch GM, Pham PT, Rosenthal JT, Lassman CR, Braun J, Reed EF, Gritsch HA: Noninvasive diagnosis of cellular and antibody-mediated rejection by perforin and granzyme B in renal allografts. *Hum Immunol* 67: 777–786, 2006
- Donauer J, Rumberger B, Klein M, Faller D, Wilpert J, Spama T, Schieren G, Rohrbach R, Dem P, Timmer J, Pisarski P, Kirste G, Walz G: Expression profiling on chronically rejected transplant kidneys. *Transplantation* 76: 539–547, 2003
- Scherer A, Krause A, Walker JR, Korn A, Niese D, Raulf F: Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies. *Transplantation* 75: 1323–1330, 2003
- Flechner SM, Kurian SM, Solez K, Cook DJ, Burke JT, Rollin H, Hammond JA, Whisenant T, Lanigan CM, Head SR, Salomon DR: De novo kidney transplantation without use of calcineurin inhibitors preserves renal structure and function at two years. *Am J Transplant* 4: 1776–1785, 2004
- Hotchkiss H, Chu TT, Hancock WW, Schroppel B, Kretzler M, Schmid H, Liu Y, Dikman S, Akalin E: Differential expression of profibrotic and growth factors in chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 81: 342–349, 2006
- Mas V, Maluf D, Archer K, Yanek M, 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. *Transplantation* 83: 448–457, 2007
- Grosshans J, Wieschaus E: A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell* 101: 523–531, 2000
- Mata J, Curado S, Ephrussi A, Rorth P: Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell* 101: 511–522, 2000
- Seher TC, Leptin M: Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation. *Curr Biol* 10: 623–629, 2000
- Kiss-Toth E, Bagstaff SM, Sung HY, Jozsa V, Dempsey C, Caunt JC, Oxley KM, Wyllie DH, Polgar T, Harte M, O'Neill L, A, Qvarnstrom EE, Dower SK: Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 279: 42703–42708, 2004
- Sung HY, Guan H, Czibula A, King AR, Eder K, Heath E, Suvarna SK, Dower SK, Wilson AG, Francis SE, Crossman DC, Kiss-Toth E: Human Tribbles-1 controls proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells via MAPK signaling pathways. *J Biol Chem* 282: 18379–18387, 2007
- Yamamoto M, Uematsu S, Okamoto T, Matsuura Y, Sato S, Kumar H, Satoh T, Saitoh T, Takeda K, Ishii KJ, Takeuchi O, Kawai T, Akira S: Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J Exp Med* 204: 2233–2239, 2007
- Heslan JM, Renaudin K, Thebaud P, Josien R, Cuturi MC, Chiffolleau E: New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation* 82: 1185–1193, 2006
- Hegedus Z, Czibula A, Kiss-Toth E: Tribbles: Novel regulators of cell function; evolutionary aspects. *Cell Mol Life Sci* 63: 1632–1641, 2006
- Hegedus Z, Czibula A, Kiss-Toth E: Tribbles: A family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function. *Cell Signal* 19: 238–250, 2007
- Gloor JM, Sethi S, Stegall MD, Park WD, Moore SB, Degoe S, Griffin MD, Larson TS, Cosio FG: Transplant glomerulopathy: Subclinical incidence and association with alloantibody. *Am J Transplant* 7: 2124–2132, 2007
- Sis B, Campbell PM, Mueller T, Hunter C, Cockfield SM, Cruz J, Meng C, Wishart D, Solez K, Halloran PF: Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause. *Am J Transplant* 7: 1743–1752, 2007
- Magil AB, Tinkam K: Monocytes and peritubular capillary C4d deposition in acute renal allograft rejection. *Kidney Int* 63: 1888–1893, 2003
- Fahim T, Bohmig GA, Exner M, Huttary N, Kerschner H, Kandutsch S, Kerjaschki D, Brambeck A, Nagy-Bojarszky K, Regele H: The cellular lesion of humoral rejection: Predominant recruitment of monocytes to peritubular and glomerular capillaries. *Am J Transplant* 7: 385–393, 2007
- Baddoura FK, Nasr IW, Wrobel B, Li Q, Ruddle NH, Lakkis FG: Lymphoid neogenesis in murine cardiac allografts undergoing chronic rejection. *Am J Transplant* 5: 510–516, 2005
- Louis S, Braudeau C, Giral M, Dupont A, Moizant F, Robillard N, Moreau A, Souillou JP, Brouard S: Contrasting CD25hiCD4+ T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 81: 398–407, 2006
- Woywodt A, Schroeder M, Gwinner W, Mengel M, Jaeger M, Schwarz A, Haller H, Haubitz M: Elevated numbers of circulating endothelial cells in renal transplant recipients. *Transplantation* 76: 1–4, 2003
- Deng MC, Eisen HJ, Mehra MR, Billingham M, Marboe CC, Berry G, Kobashigawa J, Johnson FL, Starling RC, Murali S, Pauly DF, Baron H, Wohlgemuth JG, Woodward RN, Klingler TM, Walther D, Lal PG, Rosenberg S, Hunt S: Noninvasive discrimination of rejection in cardiac allograft recipients using gene expression profiling. *Am J Transplant* 6: 150–160, 2006
- Seiler M, Brabcova I, Vilkicky O, Hribova P, Rosenberger C, Pratschke J, Lodererova A, Matz M, Schonemann C, Reinke P, Volk HD, Kotsch K: Heightened expression of the cytotoxicity receptor NKG2D correlates with acute and chronic nephropathy after kidney transplantation. *Am J Transplant* 7: 423–433, 2007
- Schwarz A, Mengel M, Gwinner W, Rademacher J, Hiss M, Kreipe H, Haller H: Risk factors for chronic allograft nephropathy after renal transplantation: A protocol biopsy study. *Kidney Int* 67: 341–348, 2005

34. Schwarz A, Gwinner W, Hiss M, Radermacher J, Mengel M, Haller H: Safety and adequacy of renal transplant protocol biopsies. *Am J Transplant* 5: 1992–1996, 2005
35. Racusen LC, Colvin RB, Solez K, Mihatsch MJ, Halloran PF, Campbell PM, Cecka MJ, Cosyns JP, Demetris AJ, Fishbein MC, Fogo A, Furness P, Gibson IW, Glotz D, Hayry P, Hunsicker L, Kashgarian M, Kerman R, Magil AJ, Montgomery R, Morozumi K, Nickleleit V, Randhawa P, Regele H, Seron D, Seshan S, Sund S, Trpkov K: Antibody-mediated rejection criteria: An addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *Am J Transplant* 3: 708–714, 2003
36. Mauviyedi S, Pelle PD, Saidman S, Collins AB, Pascual M, Tolkoff-Rubin NE, Williams WW, Cosimi AA, Schneeberger EE, Colvin RB: Chronic humoral rejection: Identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 12: 574–582, 2001
37. Cardarelli F, Pascual M, Tolkoff-Rubin N, Delmonico FL, Wong W, Schoenfeld DA, Zhang H, Cosimi AB, Saidman SL: Prevalence and significance of anti-HLA and donor-specific antibodies long-term after renal transplantation. *Transpl Int* 18: 532–540, 2005
38. Regele H, Bohmig GA, Habicht A, Gollwitzer D, Schillinger M, Rockenschaub S, Watschinger B, Kerjaschki D, Exner M: Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: A contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 13: 2371–2380, 2002
39. Souillou JP, Blandin F, Gunther E, Lemoine V: Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation* 38: 63–67, 1984
40. Chiffolleau E, Beriou G, Dutarte P, Usal C, Souillou JP, Cuturi MC: Induction of donor-specific allograft tolerance by short-term treatment with LF15–0195 after transplantation: Evidence for a direct effect on T-cell differentiation. *Am J Transplant* 2: 745–757, 2002
41. Lair D, Degauque N, Miqueu P, Jovanovic V, Guillet M, Merieau E, Moreau A, Souillou JP, Brouard S: Functional compartmentalization following induction of long-term graft survival with pregraft donor-specific transfusion. *Am J Transplant* 7: 538–549, 2007
42. Ashton-Chess J, Blancho G: An in vitro evaluation of the potential suitability of peripheral blood CD14(+) and bone marrow CD34(+) derived dendritic cells for a tolerance inducing regimen in the primate. *J Immunol Methods* 297: 237–252, 2005
43. Fitau J, Boulday G, Coulon F, Quillard T, Charreau B: The adaptor molecule Lnk negatively regulates tumor necrosis factor- α -dependent VCAM-1 expression in endothelial cells through inhibition of the ERK1 and -2 pathways. *J Biol Chem* 281: 20148–20159, 2006
44. Applied Biosystems: ABI PRISM 7900 User Bulletin, PE Applied Biosystems, Foster City 2: 11–24, 1997
45. Livak KJ, Schmittgen TD: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402–408, 2001

Supplemental information for this article is available online at <http://www.jasn.org/>.

3. Etude complémentaire de TRIB1 en transplantation

a. Etude de TRIB1 dans les Tregs

Suite aux résultats présentés précédemment, nous avons souhaité déterminer d'où venait l'augmentation de TRIB1 au cours du rejet chronique humoral actif. De plus, l'analyse de l'expression de TRIB1 dans différents sous-types cellulaires, a montré que TRIB1 est fortement exprimé par les Tregs. Nous avons donc analysé l'expression de l'ARNm de TRIB1 et de FoxP3 au sein des Tregs mais également dans les lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ provenant du sang de volontaires sains ou bien de patients transplantés ayant une fonction stable du greffon ou ayant un rejet chronique humoral actif (Figure 16).

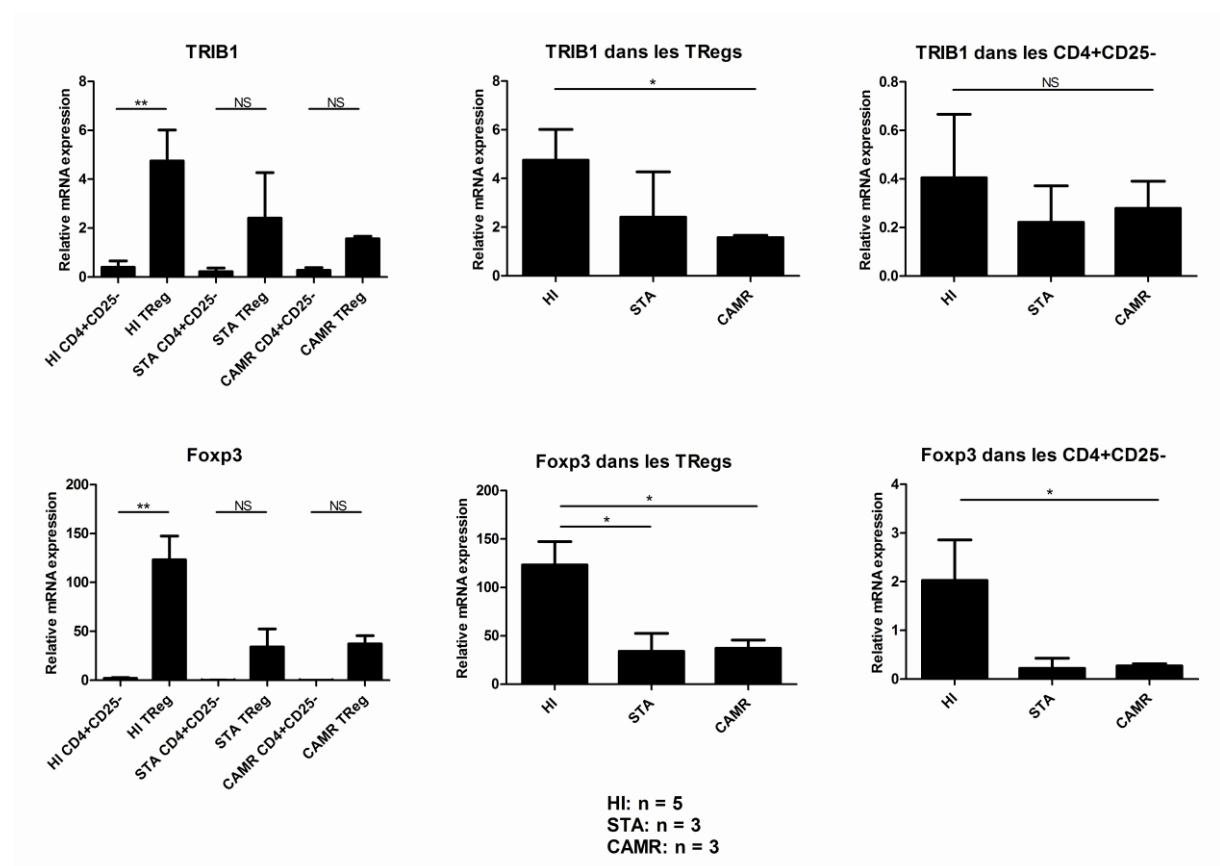


Figure 16: Expression relative d'ARNm de TRIB1 et de FoxP3 dans les lymphocytes T régulateurs CD4⁺CD25⁺CD127⁻ et dans les lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ chez des volontaires sains et chez des patients transplantés avec une fonction stable de leurs greffon ou avec un rejet chronique humoral actif.

Pour cette étude, nous avons isolé des cellules T CD4⁺CD25⁻ et des Tregs CD4⁺CD25⁺CD127⁻ à l'aide d'un cytomètre trieur de cellules puis nous avons directement

mis les cellules dans un tampon RLT 1% β -mercaptoéthanol. Nous avons ensuite extrait l'ARNm en utilisant des colonnes RNeasy micro kit (Qiagen) puis nous avons réalisé une retro-transcription avec l'enzyme Omniscript. Enfin nous avons réalisé une qPCR Taqman sur les ADNc.

Les résultats préliminaires obtenus montrent clairement une diminution du taux de TRIB1 dans les Tregs chez les patients en rejet chronique actif humoral en comparaison aux volontaires sains $p=0,0357$. En revanche, chez les patients stables, il n'y a pas de variation significative de TRIB1 en comparaison aux volontaires sains et aux patients en RCHA. On peut noter également que, chez les donneurs sains, les taux de TRIB1 et de FoxP3 sont plus élevés dans les Tregs par rapport aux T $CD4^+CD25^-$ ($p=0,0079$). En revanche, chez les patients stables ou en CAMR, on n'observe plus de différence des taux de FoxP3 et TRIB1 entre les Tregs et les T $CD4^+CD25^-$.

Enfin on constate également que FoxP3 est diminué dans les Treg chez les patients stables ou en RCHA par rapport aux volontaires sains. Cependant, le taux de FoxP3 chez les patients stables est similaire à celui des patients RCHA.

On peut préciser que la puissance statistique n'est pas très élevée étant donné que le nombre d'échantillons analysés est faible.

b. Etude de TRIB1 sur des coupes histologiques de rein

Nous avons également réalisée des marquages histologiques sur des coupes de reins normaux afin de définir les types cellulaires qui expriment TRIB1 dans le rein normal (Figure 17).

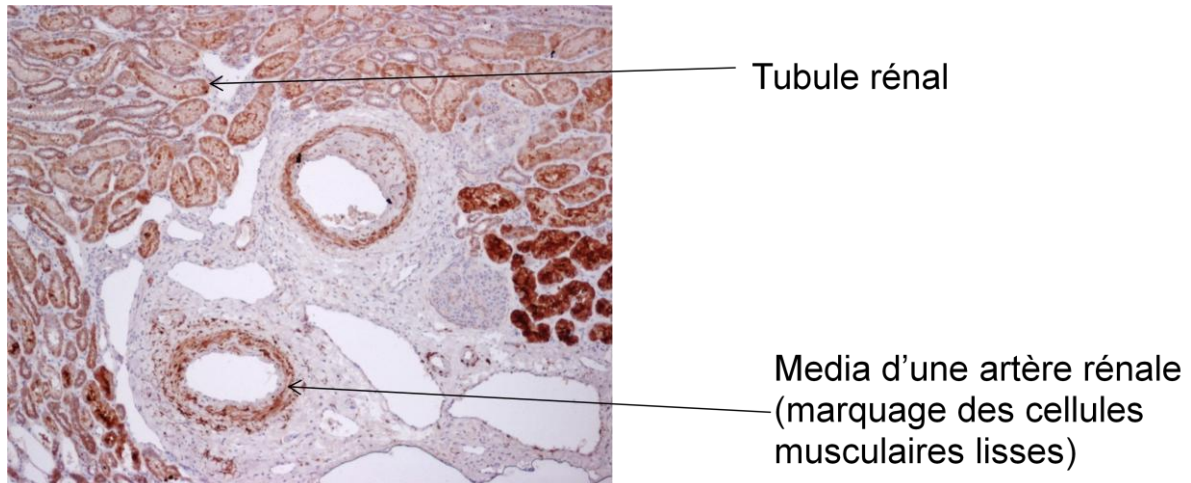


Figure 17 : Marquage histologique d'une coupe de rein normal en paraffine avec un anticorps anti-TRIB1. Déparaffinage en xylène puis éthanol absolu. Rehydratation en PBS. Démasquage par chauffage en tampon TRS bleu. Blocage de la peroxidase puis de la biotine. Saturation avec du sérum de cheval. Incubation avec l'anticorps Primaire puis l'anticorps secondaire biotinylé. Révélation avec le DAB. Contre-coloration à l'hématoxyline.

Nous avons ainsi mis en évidence un marquage des tubules renaux. Cependant, ce marquage est très probablement non-spécifique et est vraisemblablement dû à la biotine endogène fortement présente dans les tubules rénaux. Nous avons également observé un marquage des cellules musculaires lisses de la media des artères rénales. Ce marquage est similaire au marquage des cellules musculaires lisses d'artère réalisé par une autre équipe (Hye Youn Sung et al. 2007).

4. Autres études de biomarqueurs

IMMUNOBIOLOGY AND GENOMICS

Contrasted Blood and Intragraft Toll-Like Receptor 4 mRNA Profiles in Operational Tolerance Versus Chronic Rejection in Kidney Transplant Recipients

Cécile Braudeau,¹ Joanna Ashton-Chess,¹ Magali Giral,¹ Emilie Dugast,¹ Stephanie Louis,¹ Annaick Pallier,¹ Christophe Braud,¹ Anne Moreau,² Karine Renaudin,² Jean-Paul Souillou,^{1,3} and Sophie Brouard¹

Background. Deciphering the mechanisms of tolerance and chronic rejection (CR) remains a major goal in transplantation. Data in rodents suggest that Toll-like receptors (TLR), regulators of innate immune responses, play a role in determining graft outcome. However, few studies have focused on TLR expression in human kidney transplant recipients.

Methods. Here, we analyzed the expression of TLR4 in peripheral blood mononuclear cells from kidney recipients with contrasted clinical situations: operational tolerance and CR, compared with patients with stable graft function, non-transplant patients with renal failure and healthy volunteers.

Results. We report that myeloid differentiation factor 88 and TLR4 are significantly contrasted in the peripheral blood mononuclear cells, and in particular in monocytes, of patients with CR versus operational tolerance. Chronic rejection patients have significantly increased TLR4 and myeloid differentiation factor 88 compared with operationally tolerant patients, who resemble healthy volunteers and nontransplant patients with renal failure. Interestingly, analysis of TLR4 transcripts in graft biopsies from patients with normal histology or CR reflected the blood findings, with a significant increase of TLR4 in CR.

Conclusions. These data support a link between TLR4 expression and long-term graft outcome. Moreover, whereas absence of TLR signaling may be a feature of tolerance, increased TLR4 signaling may be implicated in CR.

Keywords: Chronic rejection, Kidney, Tolerance, Toll-like receptor.

(*Transplantation* 2008;86: 130–136)

Achieving “true” allograft tolerance is a major goal in the field of transplantation and is the subject of intense research in rodent models. This goal remains elusive in the clinical setting. In humans, the less stringent term “operational tolerance” is used to describe patients displaying well-functioning grafts for several years in the absence of any immunosuppressive medication (1). Operational tolerance has been observed in 20% of patients after immunosuppressive drug withdrawal in liver recipients (2) and to a much lesser extent in kidney graft recipients (1). This is probably a robust “model” of regulation because most of the kidney graft recipients who stop their immunosup-

pressive therapy reject their grafts. However, even patients who maintain their immunosuppression can experience late deterioration of graft function associated with histologic signs of graft scarring.

Graft scarring is frequently manifested as interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA) (3), a term that implies nonspecific graft injury (3, 4). However, when associated with particular histological features, IF/TA can contribute to specific diagnoses. For example, IF/TA can contribute to the diagnosis of nonimmune-mediated graft damage because of chronic calcineurin inhibitor toxicity (5) or functional overload (6). Interstitial fibrosis and tubular atrophy can also contribute to the diagnosis of alloimmune-mediated graft injury, that is, true chronic rejection (CR), such as when it is associated with capillary-endothelial deposition of the complement split product C4d in the graft together with circulating antidonor antibodies (Ab) (3, 4). This particular form of CR is referred to as “chronic active Ab-mediated rejection” (CAMR) (3). Other morphological features of CAMR include duplication or “double contours” in glomerular basement membranes, referred to as transplant glomerulopathy (TG). Transplant glomerulopathy must be associated with both C4d deposition and circulating antidonor antibodies for the

This work was supported in part by the Fondation Progreffe. The first two authors contributed equally.

¹ INSERM, U643; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France.

² CHU Nantes, Service d'Anatomie Pathologique, Nantes, France.

³ Address correspondence to: Jean-Paul Souillou, M.D., INSERM U643, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01 France.

E-mail: Jean-Paul.Souillou@univ-nantes.fr

Received 30 January 2008. Revision requested 15 February 2008. Accepted 1 April 2008.

Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/08/8601-130

DOI: 10.1097/TP.0b013e31817b8dc5

130

Transplantation • Volume 86, Number 1, July 15, 2008

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

Article intégral en annexe 1

Immunoproteasome beta subunit 10 is increased in chronic antibody-mediated rejection

Joanna Ashton-Chess^{1,2,3,8}, Hoa Le Mai^{1,2,3,8}, Vojislav Jovanovic^{1,2,3,8}, Karine Renaudin⁴,
Yohann Foucher^{1,2,3}, Magali Giral^{1,2,3}, Anne Moreau⁴, Emilie Dugast^{1,2,3}, Michael Mengel⁵,
Maud Racapé^{1,2,3}, Richard Danger^{1,2,3}, Claire Usal^{1,2,3}, Helga Smit^{1,2,3}, Marina Guillet⁶, Wilfried Gwinner⁷,
Ludmilla Le Berre^{1,2,3}, Jacques Dantal^{1,2,3}, Jean-Paul Souillou^{1,2,3,8} and Sophie Brouard^{1,2,3,8}

¹INSERM, U643, Nantes, France; ²CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITRT, Nantes, France; ³Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France; ⁴CHU Nantes, Service d'Anatomie Pathologique, Nantes, France; ⁵Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Alberta, Edmonton, Canada; ⁶TcLand Expression, Nantes, France and ⁷Abteilung für Nephrologie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Germany

Chronic active antibody-mediated rejection is a form of late rejection with a poor prognosis. To identify specific markers of this, we analyzed several microarray studies in the literature and performed mRNA profiling of 65 biopsies and 165 blood samples of a large cohort of renal transplant patients with precisely characterized pathologies. Immunoproteasome beta subunit 10 was found to be specifically increased in the graft and blood samples during chronic active antibody-mediated rejection and was also significantly increased in rat cardiac allografts undergoing acute rejection as well as chronic active antibody-mediated rejection. This syndrome is characterized by chronic transplant vasculopathy associated with diffuse C4d staining and circulating donor-specific antibodies. Using this animal model, we found that administration of the proteasome inhibitor, Bortezomib, delayed acute rejection and attenuated the humoral response in both the acute phase and established state of this syndrome in a dose-dependent manner. Following treatment with this reagent, donor-specific antibodies and C4d deposition were reduced. These studies highlight the role of the proteasome in chronic rejection and identify this molecule as a marker of this syndrome.

Kidney International (2010) **77**, 880–890; doi:10.1038/ki.2010.15; published online 24 February 2010

KEYWORDS: chronic allograft rejection; gene transcription; kidney transplantation

Long-term graft loss remains the bane of kidney transplantation. More recently, much attention has been paid to the 'humoral' theory of chronic allograft rejection.¹ Evidence for the involvement of a humoral arm of the immune response to allografts has come from studies analyzing the impact of anti-human leukocyte antigen (HLA) antibodies on graft outcome,^{2,3} and evidence of complement cascade activation within kidney grafts diagnosed by intragraft deposition of the complement split product C4d.^{4,5} These data were recently reinforced when the definition of *chronic active antibody-mediated rejection* (CAMR) was introduced into the Banff classification of kidney graft injury as an association of specific histological lesions associated with diffuse C4d deposition in peritubular capillaries and circulating donor-specific anti-HLA (DSA) antibodies.⁶

Current therapies to combat the acute form of antibody-mediated rejection aim to reduce antibody titers through the use of intravenous immunoglobulin,⁷ plasmapheresis,⁸ or B-cell-targeting antibodies such as Rituximab,⁹ but these have not gained notoriety in the chronic form. Moreover, these strategies do not seem to have an effect on plasma cells, the source of antibodies. Thus, the development of more effective strategies would benefit patients suffering from this type of late graft rejection with such a poor prognosis.¹⁰ The identification of molecular markers associated with CAMR would not only facilitate its diagnosis, but could also help to understand the pathophysiology of CAMR and thus aid in the design of new therapeutic strategies. Currently, CAMR diagnosis depends on the triad of graft lesions together with intragraft C4d and DSA mentioned above. Neither one of these alone can diagnose CAMR; DSA are predictive of graft loss but have not yet been shown to tightly correlate with intragraft lesions, and C4d has recently been shown to be absent in up to 50% of CAMR cases.¹¹ Here, using a gene-set comparison approach, we describe the identification of a well-known molecule, the immunoproteasome- β subunit 10 (PSMB10, also known as MECL-1) as a potential marker of CAMR in humans.

Correspondence: Jean-Paul Souillou, INSERM U643, 30 Building Jean Monnet, Nantes Cedex 44093, France.
E-mail: Jean-Paul.Souillou@univ-nantes.fr

⁸These authors contributed equally to this work.

Received 19 July 2009; revised 12 November 2009; accepted 8 December 2009; published online 24 February 2010

5. Discussion

La recherche de biomarqueurs peu invasif voir non invasif en transplantation est un axe central de la recherche menée par notre équipe. En effet, l'intérêt de tels biomarqueurs doit nous permettre d'identifier, parmi les patients qui ont reçu une transplantation de rein, ceux qui ont, ou bien ceux qui sont susceptibles de développer un rejet chronique humoral actif ou au contraire de repérer les patients qui pourront diminuer, voir même arrêter leur traitement immunosuppresseur sans rejeter leur greffon. Ainsi, si de telles molécules sont identifiées, une médecine personnalisée pourrait être réalisée en fonction du statut de chaque patient.

a. Discussion article n°1

La première étude a consisté en l'analyse des profils d'expression de trois molécules caractéristiques d'une fonction des lymphocytes T, chez des patients transplantés à long-terme afin de voir si elles peuvent nous permettre de discriminer les dysfonctions chroniques d'origine immune, des non-immunes. En effet, nous avons examiné l'expression de FoxP3, T-bet et granzyme B chez des patients plus d'un an après transplantation. Les patients avaient une fonction stable de leur greffon, des lésions dues à une toxicité des inhibiteurs de la calcineurine, une glomérulopathie du transplant ou bien un RCHA. La présence de FoxP3 indique un phénomène plutôt régulateur étant donné que cette molécule est principalement exprimée par les Tregs. A l'inverse, la molécule T-bet est plutôt représentative d'un mécanisme effecteur des lymphocytes T. Enfin, granzyme B (GrzB) est représentatif des mécanismes cytotoxiques des lymphocytes T mais également des NK. Pour ces trois molécules, nous avons analysé le taux d'ARNm dans le greffon et dans le sang mais nous avons également réalisé des marquages immuno-histochimiques dans le greffon afin d'évaluer le nombre de cellules positives pour chaque molécule. De plus, nous avons aussi étudié l'impact de diverses variables cliniques ou démographiques (Age, genre, temps post-transplantation, traitement utilisé...) sur la variation des valeurs de ces trois molécules. Cette étude nous a ainsi montré que parmi les trois molécules étudiées, seule l'expression d'ARNm de GrzB permet de distinguer un rejet chronique humoral actif des dysfonctions chroniques d'origine non-immune. Par ailleurs, les analyses statistiques ont également mis en avant l'importance de divers paramètres sur l'expression des trois molécules.

En effet, cette étude met en avant l'absence de variation du taux d'ARNm de FoxP3 et du nombre de cellules FoxP3⁺ entre les dysfonctions chroniques d'origine immune ou non immune. En revanche, on observe une diminution d'ARNm de FoxP3 chez tous les patients transplantés par comparaison aux volontaires sains, ce qui peut être expliqué par l'utilisation d'inhibiteur de la calcineurine connu pour diminuer le taux de cellules T régulatrices (Zeiser et al. 2006). De plus, l'analyse par immunohistochimie révèle la présence d'un petit nombre de Tregs FoxP3⁺ et T-bet⁺, GrzB⁺ infiltrant le greffon. Contrairement à ce qui a été observé dans les urines de patients avec un rejet aigu, c'est-à-dire une augmentation d'ARNm de FoxP3 (Muthukumar et al. 2005) prédictive du devenir du greffon, au cours d'une dysfonction chronique, nous n'observons aucune augmentation d'ARNm de FoxP3 dans le sang par rapport aux patients stables. De la même manière, nous n'observons pas non plus de différence d'expression de FoxP3 entre les dysfonctions d'origine immune ou non-immune. Enfin, on a également montré que l'expression de FoxP3 dans le sang est liée au temps après transplantation. En effet, l'expression de FoxP3 augmente les 12 premières années après transplantation puis ce taux re-diminue. Lorsque l'on s'intéresse à la molécule T-bet, on n'observe pas de variation d'expression de T-bet dans les biopsies des patients avec des dysfonctions chroniques d'origines diverses, mais en revanche, on observe une augmentation de cellules T-bet⁺ chez les patients avec un RCHA comparé à des patients avec des lésions dues aux inhibiteurs de la calcineurine par immuno-histochimie. La différence entre l'ARNm et la protéine peut être expliquée par la petite taille des échantillons utilisés pour faire les immuno-marquage ou bien par la faible quantité de cellules exprimant beaucoup de T-bet dans les biopsies de patients présentant une toxicité due aux inhibiteurs de la calcineurine. De plus, en analysant l'expression de T-bet dans le sang, nous n'observons aucune différence du taux d'ARNm entre les volontaires sains et les patients stables. Cependant, nous avons montré que plusieurs facteurs influençaient le taux de T-bet. Nous avons ainsi mis en évidence que le régime immunosuppresseur impactait sur le taux de T-bet. En effet, le taux de T-bet est plus faible chez les patients utilisant du Mycophenolate Mofetil (MMF = FK-506) que chez ceux utilisant de la ciclosporine A, ce qui peut être donc en faveur de l'utilisation du MMF, qui cible les cellules effectrices. De plus, nous avons montré que le taux de T-bet est dépendant du temps après transplantation qui peut être du à l'utilisation prolongée du traitement immunosuppresseur. Enfin, il dépend aussi de l'âge du receveur en augmentant chez les receveurs âgés.

L'analyse de l'ARNm et de la protéine GrzB dans le greffon a montré que cette molécule est augmentée chez les patients avec un rejet chronique humoral actif en comparaison avec les patients présentant des dysfonctions chroniques d'origine non immune. Ce phénomène peut signifier que le RCHA est causé par une attaque du greffon par les cellules cytotoxiques majoritairement CD8⁺. En revanche l'expression de GrzB dans le sang est diminuée chez les patients avec un RCHA par rapport aux patients ayant une fonction stable du greffon ce qui est l'inverse de l'observation que l'on peut faire chez les patients avec un rejet aigu. Une analyse statistique nous a permis de préciser que l'ARNm de GrzB peut constituer un biomarqueur peu invasif du RCHA. Une hypothèse pour expliquer la différence entre l'observation réalisée dans le greffon et dans le sang peut être que les cellules cytotoxiques ont migré du sang vers le greffon ce qui expliquerait l'accumulation de ces cellules dans le greffon au cours du rejet chronique humoral. Cependant, étant donné que les échantillons issus des analyses dans le sang ou dans le greffon ne proviennent pas des mêmes patients, cette hypothèse est à confirmer sur des échantillons de sang et des biopsies prélevés au même moment et chez le même patient. Enfin, cette étude a également montré que l'expression de GrzB est également influencée par divers facteurs comme l'âge du donneur ainsi que le traitement immunosuppresseur. En effet, plus l'âge du donneur est élevé et plus le taux de GrzB est élevé. L'utilisation du MMF est associé à une diminution de GrzB ce qui permet encore une fois de dire que le MMF a un effet bénéfique sur les cellules effectrices.

Parallèlement, nous avons également analysé l'expression de ces trois molécules chez des patients en rejet aigu. Tous les résultats obtenus ont confirmé les données déjà observées par d'autres équipes, à savoir qu'il y a une importante augmentation des ARNm mais également des protéines FoxP3, T-bet et GrzB dans le rejet aigu (Veronese et al. 2007; Hoffmann et al. 2005; Sharma et al. 1996).

Ainsi, par cette étude, nous avons montré que FoxP3 et T-bet ne constituent pas des marqueurs du rejet chronique à médiation humorale car ils ne permettent pas de différencier des dysfonctions chroniques d'origine immune et non-immune et ils ne différencient pas non plus les dysfonctions chroniques de volontaires sains ou de patients transplantés stables. En revanche, nous avons montré que GrzB, quant à lui, permettait de distinguer les dysfonctions chroniques immunes et non-immunes avec une possible migration des cellules GrzB⁺ du sang vers le greffon.

Enfin, cette étude a aussi mis en avant l'importance des facteurs démographiques et cliniques sur les données car nous avons montré que plusieurs données avaient une influence sur les

valeurs analysées. Ainsi, il est nécessaire de prendre en compte tous ces facteurs lors d'analyses avant de conclure sur le potentiel de molécules à être des biomarqueurs.

b. Discussion article n°2 et de l'étude complémentaire sur TRIB1 en transplantation

Le but cette seconde étude a été d'analyser la potentialité de la molécule Tribbles-1 d'être un biomarqueur non invasif du rejet chronique humoral actif. Pour cette étude, nous avons comparé les profils d'expression de l'ARNm de TRIB1 dans les biopsies, le sang et les urines de patients transplantés d'une part, et de volontaires sains d'autre part. Les patients transplantés avaient une fonction stable de leurs greffons, une histologie normale, une fibrose interstitielle/atrophie tubulaire, une glomérulopathie du transplant en absence de C4d et d'anticorps anti-HLA ou encore une glomérulopathie du transplant avec du C4d et des anti-HLA. Cette étude a ainsi permis de montrer que l'expression d'ARNm de TRIB1 est augmentée de manière spécifique dans le greffon et le sang des patients en rejet chronique humoral actif mais pas dans les urines. De plus, des analyses statistiques ont également montré que la spécificité de TRIB1 pour le RCHA est plus importante dans le sang que dans le greffon. Un modèle de rat présentant une vasculopathie chronique du transplant présente également une expression plus élevée d'ARNm de TRIB1 en comparaison aux rats tolérants. L'augmentation d'ARNm de TRIB1 semble donc nous indiquer que cette molécule peut éventuellement être impliquée dans ce type de dysfonction chronique d'origine immune. Afin de mieux comprendre l'origine de l'augmentation de TRIB1 dans le RCHA, nous avons analysé l'expression d'ARNm de TRIB1 dans différents types cellulaires activés ou non. Cette analyse nous a montrée que TRIB1 est principalement exprimé par des cellules présentatrices d'antigène et des cellules endothéliales activées. Ainsi, on peut supposer que l'augmentation de TRIB1 dans le greffon peut être causée par l'activation de ces cellules endothéliales par l'intermédiaire de la fixation des anti-HLA et de l'activation consécutive du complément ou alors par l'infiltration du greffon par des APC activées. De la même manière, concernant l'augmentation de TRIB1 dans le sang, on peut penser que cette augmentation est due à l'activation des monocytes et des cellules dendritiques qui expriment plus de TRIB1 ou bien elle peut être due également aux de cellules endothéliales circulantes dont le nombre augmente en cas de rejet (Woywodt et al. 2003). Ainsi, cette étude a permis d'identifier TRIB1 comme un marqueur peu invasif du rejet chronique à médiation humorale. Malgré

cela, il faut rester prudent. Dans l'idéal, il faudrait associer TRIB1 à d'autres molécules afin d'augmenter la puissance du diagnostic. Malheureusement, actuellement, aucune autre molécule n'a montré un même profil en transplantation. Il est possible que l'expression de TRIB1 dans les APC et les cellules endothéliales soit la raison pour laquelle aucunes autres molécules connues ne montrent le même profil étant donné que la plupart des molécules décrites sont exprimées soit par des lymphocytes T soit par des cellules NK.

En plus de l'étude de l'expression de l'ARNm de TRIB1 et de FoxP3 chez les patients transplantés, nous avons également analysé l'expression de cette molécule dans les cellules T régulatrices $CD4^+CD25^+CD127^-$ et dans les cellules T non régulatrices $CD4^+CD25^-$, chez des volontaires sains, des patients stables mais également chez des patients en rejet chronique humoral actif. Par cette étude préliminaire, nous avons montré que, tout comme FoxP3, TRIB1 est plus exprimé dans les Tregs des volontaires sains en comparaison aux lymphocytes T non régulateurs. Chez les patients transplantés, les taux de TRIB1 et de Foxp3 ont tendance à être plus élevés dans les Tregs par rapport au non Tregs cependant la différence n'est pas significative. Il est possible que le faible nombre d'échantillons « fausse » les analyses statistiques et il est donc nécessaire d'augmenter le nombre d'échantillons. De plus, on observe que les expressions de TRIB1 et de FoxP3 sont diminuées dans les Tregs de patients en RCHA par rapport aux volontaires sains. Une diminution de FoxP3 dans les Tregs a déjà été décrite dans divers études chez l'homme et chez la souris (Zhou et al. 2009; Hansmann et al. 2012) et est associée à un changement de phénotype. En effet, il a été décrit chez la souris que ces Tregs qui perdaient l'expression de FoxP3 devenaient des cellules T effectrices mémoires sécrétant des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ (Zhou et al. 2009). Très récemment, chez l'homme, il a été décrit que la perte du FoxP3 dans les Treg mémoires orientait ces cellules vers un profil Th2. Or, l'orientation des LT vers un profil Th2 est typique d'une réponse humorale. Il est donc possible que la perte du FoxP3 soit en partie responsable de la réponse humorale au cours du RCHA. De plus, la conversion des Tregs en cellules effectrices pourrait expliquer la diminution de ces Tregs déjà décrite au cours du RCHA (Braudeau et al. 2007). Cependant, étant donné que Foxp3 diminu également chez les patients stables, on peut penser que les traitements immunosuppresseurs sont à l'origine de cette diminution.

Parallèlement, nous avons également montré qu'il y avait une diminution de TRIB1 dans les Tregs des patients en RCHA. Ces derniers résultats ne nous permettent pas d'expliquer

l'augmentation de TRIB1 au cours du RCHA. Cependant, on peut penser que cette diminution est due à la diminution de FoxP3 et donc à la conversion des cellules T régulatrices en cellules T effectrices. Une autre possibilité est que le contexte inflammatoire qui règne au cours d'un RCHA soit à l'origine de la diminution de TRIB1 qui, on le sait, est très fortement régulée en présence de molécules inflammatoires.

De plus, il a été décrit que TRIB1 est une molécule pro-prolifératrice dans diverses formes de cancer (Dedhia et al. 2010; Yokoyama et al. 2010). Ainsi, la diminution de TRIB1 dans ces Tregs pourrait engendrer une diminution de la prolifération des Tregs ce qui expliquerait la diminution de la proportion des Tregs au cours du RCHA.

Bien que l'on n'observe pas de diminution significative de TRIB1 dans les Tregs chez les patients stables, il y a tout de même une tendance à la diminution. Ainsi, l'expression de TRIB1 pourrait, tout comme FoxP3, être influencée par les traitements immunosuppresseurs, ce qui pourrait également expliquer la diminution de TRIB1 dans les Tregs des patients RCHA.

Enfin nous avons montré que TRIB1 est probablement exprimé par les cellules musculaires lisses de la média des artères rénales. Cette étude aurait dû être poursuivie par des marquages histologiques sur des biopsies rénales de patients en rejet chronique humoral actif afin de déterminer s'il y a des différences. On aurait ainsi pu voir si les cellules infiltrant le rein inflammé au cours du RCHA expriment la molécule TRIB1, et pourrait être à l'origine de l'augmentation de TRIB1 dans le greffon. Cependant, l'accès aux biopsies étant très limité, nous avons dû arrêter cette étude faute de matériel.

c. Discussion des autres études de biomarqueurs

J'ai participé également à plusieurs études sur les biomarqueurs du rejet chronique humoral actif en transplantation. Une première a porté sur l'étude de l'expression du récepteur TLR4 dans le sang et dans le greffon de patients en rejet chronique ou bien en état de tolérance (Braudeau et al. 2008). L'autre étude a porté sur l'expression d'une sous-unité de l'immunoprotéasome PSMB10 chez les patients en RCHA en comparaison à d'autres diagnostics post-transplantation (Ashton-Chess et al. 2010). Ces deux molécules sont augmentées dans le RCHA et pourraient être de bon biomarqueurs. Les résultats obtenus ont déjà été discutés au cours de mon introduction, dans la partie biomarqueurs.

II. Etude de TRIB1

1. Article sur TRIB1 dans les Tregs

Titre : Identification de Tribbles-1 un nouveau partenaire interagissant avec FoxP3 dans les lymphocytes T régulateurs.

Auteurs : **Emilie Dugast**, Louise Docherty, Endre Kiss-Toth, Richard Danger, Ségolène Pettré, Jean-Paul Soulillou, Sophie Brouard, Joanna Ashton-Chess

Article en soumission dans le Journal of Biological Chemistry

Titre original: Identification of Tribbles-1 as a novel binding partner of FoxP3 in regulatory T cells

Identification of Tribbles-1 as a novel binding partner of FoxP3 in regulatory T cells*

Emilie Dugast^{1,2,4}, Endre Kiss-Toth², Louise Docherty², Richard Danger¹, Ségolène Pettré^{1,2}, Jean-Paul Soulillou^{1,5,6}, Sophie Brouard^{1,5,6#}, Joanna Ashton-Chess^{4#}

1 UMR1064, INSERM, Nantes 44000 France

2 Faculté de Médecine Université de Nantes, Nantes 44000 France

3 Department of Cardiovascular Science, University of Sheffield, Sheffield, United Kingdom

4 TcLand Expression, 21 rue de la Noue Bras de Fer, 44200 Nantes, France

5 Institut de Recherche en Transplantation, ITUN, Nantes 44000, France

6 CHU de Nantes, Nantes 44000, France

*Running title: Tribbles-1 interacts with FoxP3 in regulatory T cells

#Authors contributed equally

Corresponding authors: J Ashton-Chess, TcLand Expression, 21 rue de la Noue Bras de Fer, 44200 Nantes, France, Tel : +33 (0) 2 40 35 35 65 ; Fax : +33(0) 2 40 35 67 20 ; Email: jashtonchess@tcland-expression.com. S Brouard, Institut de Recherche en Transplantation, ITUN, Nantes 44000, France. Tel : +33 (0) 2 40 08 74 10 ; Fax : +33(0) 2 40 08 74 11 ; Email: sophie.brouard@univ-nantes.fr.

Keywords: Tribbles-1, FoxP3, regulatory T cells, Interaction, mRNA

Capsule: In this paper, we focus on the role of TRIB1, a biomarker of chronic antibody-mediated rejection of human kidneys, in CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻FoxP3⁺ Regulatory T-cells

(Tregs). We report that TRIB1 and FoxP3 were expressed at significantly higher levels in CD4+CD25+CD127-Tregs versus their CD4+CD25- counterparts ($p < 0.001$). We demonstrated a direct relationship between TRIB1 and FOXP3 in terms of their expression and physical interaction and highlight Tribbles-1 as a novel binding partner of FoxP3 in regulatory T cells.

Abstract:

In a previous study, we identified TRIB1, a serine-threonine kinase-like molecule, as a biomarker of chronic antibody-mediated rejection of human kidneys when measured in peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Here we focused our analysis on a specific subset of PBMC that play a dominant role in regulating immune responses in health and disease, so-called CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Regulatory T-cells (Tregs).

We isolated both human and murine Tregs and non-Treg counterparts and analyzed TRIB1 and FoxP3 mRNA expression by quantitative PCR on the freshly isolated cells or following 24h activation. Physical interaction between the human TRIB1 and FoxP3 proteins was analyzed in live cells lines and primary freshly-isolated human CD4⁺CD25^{hi}CD127⁻ Tregs by the Protein Complementation Assay (PCA) using both flow cytometry and microscopy and confirmed by co-immunoprecipitation.

Both TRIB1 and FoxP3 were expressed at significantly higher levels in Tregs versus their CD4⁺CD25⁻ counterparts ($p < 0.001$). Moreover TRIB1 and FoxP3 mRNA levels correlated tightly in Tregs (Spearman $r = 1.0$; $p < 0.001$, $n = 7$), whereas no correlation was found in CD4⁺CD25⁻ T cells. The PCA revealed a direct physical interaction between TRIB1 and FoxP3 in live cells. This interaction was impaired upon deletion of the TRIB1 N-terminal but not the C-terminal domain, highly suggesting that interaction took place in the nucleus. This direct interaction in the nucleus was confirmed in primary human Tregs by co-immunoprecipitation.

These data show a direct relationship between TRIB1 and FoxP3 in terms of their expression and physical interaction and highlight Tribbles-1 as a novel binding partner of FoxP3 in Tregs.

Introduction

Biomarkers, as defined by the Biomarkers Definitions Working Group, are characteristics that are objectively measured and evaluated as an indicator of normal biological processes, pathogenic processes, or pharmacological responses to therapeutic intervention¹. Biomarkers have been the subject of intense interest over the past decade, with the hope of moving personalized medicine strategies into clinical practice. Our team previously identified Tribbles-1 (for Tribbles homolog 1, also called TRIB1) as a peripheral blood biomarker of chronic antibody-mediated rejection of human kidneys². TRIB1 is one of three Tribbles homologs first identified in the *Drosophila*³. In flies, Tribbles act as a mitotic inhibitor by blocking the G2 phase of mitosis and facilitating degradation by the proteasome of the String phosphatase, thus impacting the ventral furrow formation⁴⁻⁶. Tribbles also play an important role in cell-cycle progression during morphogenesis^{5,4,7}. In mammals, TRIB1 is a serine-threonine kinase-like molecule⁸. However, contrary to most kinase proteins, this highly regulated protein appears to lack catalytic activity, but acts rather like a scaffold protein by interacting with other molecules⁹. For example, TRIB1 interacts with the mitogen activated protein kinase 1 (MEK1) and this interaction leads to the phosphorylation of ERK, resulting in cell survival or proliferation⁸. In addition to its potential as a biomarker in transplantation, TRIB1 has also been implicated in many diseases, primarily in cancer¹⁰ and myocardial infarction^{11,12,13}. However, little is known about its potential involvement in the immune responses that are key to these pathological processes.

In order to further explore the role of TRIB1 in the control of immune system, we analyzed its expression in human peripheral blood and found it to be expressed by lymphocytes and more particularly in resting B cells and activated monocytes and dendritic cells². Here we set out to explore potential role in the subset of peripheral blood lymphocytes that play a key role in immune regulation, CD4⁺CD25^{hi}CD127⁺FoxP3⁺ Regulatory T cells (Tregs). These cells are

primordial for maintaining self-tolerance by preventing auto-immunity^{14,15} and also contribute to transplant tolerance as well as to the control of cancerous cells^{16,17}. Tregs are characterized by their expression of Forkhead Box P3 (FoxP3), an X-linked transcription factor specifically and largely over-expressed in this cell type¹⁸. In mice, FoxP3 is the most reliable marker for Tregs, more so than other well-known Tregs markers such as CD25 (α -chain of the IL-2), GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein) and CTLA4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4) which can all be additionally expressed in other types of T cells^{18,19,20}. FoxP3 is known to be responsible for the suppressor function of Tregs²¹; the retroviral transduction of CD4⁺CD25⁻ T cells with a vector containing the FoxP3 gene confers to these cells suppressive functions and as they acquire a Tregs phenotype^{21,22,23}. In this paper, we explore TRIB1 expression in Tregs and subsequently demonstrate a link between TRIB1 and the key Tregs molecule FoxP3.

Experimental procedures

Human T cell isolation

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were prepared by lymphosep-lymphocyte separation media (Bio West, Nuaille, France) gradient centrifugation. CD25^{high} cells were isolated using a CD25 MicoBeads II kit for Humans (MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, Germany) and an autoMACS® Separator. We used half of the recommended beads to select only the CD25^{high} cell population. The CD25^{high} cells were then labeled with anti-CD4-PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen, Mountain View, CA), anti-CD127-PE (BD Pharmingen) and anti-CD25-Alexa Fluor 647 (anti-CD25 from Immunotech, Marseille, France) coupled to the fluorochrome using a molecular probe kit from Invitrogen, CergyPontoise, France) and sorted using a BD FACS Aria™ Flow Cytometer cell sorter and with FACSDiva™ software (BD Pharmingen). The negative fraction containing the CD25^{low} cells were then labeled with anti-CD4-PerCP-Cy5.5 (BD Pharmingen) and anti-CD25-Alexa Fluor 647 (anti-CD25 from Immunotech coupled to the fluorochrome using a molecular probe kit from Invitrogen) and sorted using the BD FACS Aria™ Flow Cytometer cell sorter with FACSDiva™ software. Sort gates for CD4+CD25- and CD4+CD25+CD127- human T cells are shown in Figure 1A. The purity was systematically greater than 97% for regulatory CD4+CD25+CD127-T cells and 96% for CD4+CD25- T cells.

Mouse T cell isolation

Splenocytes were prepared by using collagenase D and EDTA on a C57Bl6 mouse spleen. CD4⁺ T cells were isolated using the Biotinylated mouse CD4 T Lymphocyte Enrichment Cocktail (BD Biosciences Pharmingen, CA USA) according to the manufacturer's instructions. CD4⁺ T cells were then labeled with anti-CD4-FITC and anti-CD25-PE (BD Biosciences Pharmingen, CA USA) and sorted using the BD FACS Aria™ Flow Cytometer

cell sorter with BD FACSDiva™ software. Sort gates for CD4+CD25⁻ and CD4+CD25^{high} mouse T cells are shown in Figure 1B. Purity was systematically greater than 93% for CD4+CD25^{high} T cells and 98% for CD4+CD25⁻ T cells.

Human Treg activation

1×10⁵Tregs (CD4+CD25+CD127-) were cultured in 100µL of RPMI 1640 medium supplemented with 10% AB serum, 2mM L-glutamine, penicillin and streptomycin in each well of a round bottom 96 well tissue culture plate. For activation of CD4+CD25+CD127- Tregs, 500U/mL of rIL-2 and 20µL of beads coated with monoclonal antibodies against the CD3 and CD28 cell surface molecules (Dynabeads Human Treg expander kit; Invitrogen) were added per well. Cells were cultured for 24 hours in a humidified incubator at 5%CO₂ at 37°C.

RNA extraction and preparation of cDNA

Cells were resuspended in TRIzol reagent (Invitrogen) and conserved at -80°C until use. RNA isolation of T cells was performed using the TRIzol method (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined using a Nanodrop ND1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). RNA was reverse-transcribed into cDNA using an RT-Omniscript kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions.

Real-Time Quantitative PCR

Real-Time quantitative PCR was performed in an Applied Biosystems 7900 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA) using commercially available primer and probe sets for human TRIB1, FOXP3 and HPRT (Applied Biosystems: Hs00179769_m1;

Hs00203958_m1 and Hs99999909_m1 respectively) and for mouse TRIB1, FoxP3 and HPRT (Applied Biosystems: Mn00454875_m1; Mn00475156_m1 and Mn01545399_m1 respectively). HPRT was used as the endogenous reference gene to normalize RNA starting quantity. Relative expression between a given sample and a reference sample (fabricated using PBMC from a healthy volunteer or with mouse splenocytes) was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method after normalization to HPRT, with results expressed in arbitrary units.

Protein Complementation Assay

The Protein Complementation Assay (PCA) is a technique used to determine if two proteins directly and physically interact together. The principle of the PCA was described by Michnick and colleagues^{24,25} and Kiss-Toth's team⁹. It consists in transfecting cells with two plasmids. One plasmid contains the gene of the first protein under analysis followed by the first part of the GFP gene. The second plasmid contains the gene of the second protein under analysis studied followed by the complementary part of the GFP gene. The transfected cells express the two proteins associated with the two GFP fragments. In the case of a direct physical interaction between the two proteins, the two complementary fragments of the GFP protein become in close proximity to one another causing activation of the GFP and emission of fluorescence. Potential interaction between TRIB1 and FoxP3 was analyzed in HeLa and HEK 293 cultured in DMEM medium with 10% fetal bovine serum, 2mM L-glutamine, penicillin and streptomycin. The V1 plasmid was an eukaryotic expression vector pCDNA 3.1 (+) with a 3' GFP[1] fragment of the GFP gene (amino acids 1-158) and the V2 plasmid was a similar expression vector with a 5' GFP [2] fragment of GFP gene (amino acids 159-239) as described before (Sung & Kiss-Toth JBC, 2007). These plasmids contain an ampicillin resistance gene. The cDNA for TRIB1 (molecule of interest), TRIB1 Δ C (molecule of interest with the deletion of the C-terminus to assess the role of this fragment in the interaction),

TRIB1 Δ N (molecule of interest with the deletion of the N-terminus to assess the role of this fragment in the interaction), FoxP3 (molecule of interest), MEK1 (positive control of interaction with TRIB1), Gab1 (positive control of interaction with TRIB1 with cytoplasmic localization for microscopy analysis) or ZIP (negative control of interaction with FoxP3) were inserted into the expression vector by making sure of the orientation and the arrangement of the fusions protein of interest and GFP fragment was optimal to bring the GFP fragments into close proximity in case of interaction. On Day 0, HEK293 cells were seeded in a 24 well plate at a density of 75,000 cells per well in 500 μ L of complete medium. On Day 1, cells were transfected with polyfect (Qiagen, Courtaboeuf, France). Each transfection was performed in triplicate. For each well, there were 250 ng of V1 plasmid and 250 ng of V2 plasmid in a final volume of 25 μ L of serum-free media. 5 μ L of polyfect were added and the complexes were incubated at room temperature for 5 minutes. 25 μ L of complete medium were added and then 55 μ L of each complex solution were transferred to relevant wells of the cells and incubated overnight for 24H at 37°C/5%CO₂. On Day 2, cells were washed with PBS and GFP expression is analyzed by FACS.

For microscopy analysis the experiment was repeated with HeLa cells at a density of 10,000 cells per well in an 8-well CultureSlides. 25 ng of each plasmid, 5 μ L of serum free media, 5 μ L of polyfect were mixed and then 7.5 μ L of complete medium were added. 18.5 μ L of the complex solution were transferred to each well. The transfection was made in duplicate. After 24hrs of incubation, cells were observed by fluorescent microscopy.

Co-Immunoprecipitation of nuclear proteins

The Co-IP was performed on freshly isolated human Tregs, with the nuclear complex Co-IP kit (active motif, Belgium) according to the manufacturer's instructions. The protocol was run in two parts, the first part for the isolation of the nuclear proteins and the second part for the

immunoprecipitation itself. For the isolation of the nuclear proteins, the cells were washed with phosphatase inhibitor, centrifuged and the pellet was frozen at -80°C until use, then the nuclei were isolated and finally the nuclear fraction was digested and collected following the manufacturer's instruction. The protein concentration was determined by BCA assay (Interchim, Montluçon, France) following the manufacturer's instruction. For the co-immunoprecipitation, on Day 1, 120µg of protein extract was incubated overnight at 4°C with either 5µg of mouse anti-FoxP3 monoclonal antibody (clone ab450, Abcam, Paris, France), or with mouse IgG as a negative control, in low IP incubation buffer (without NaCl nor Detergent). On Day 2, Protein G sepharose 4 fast flow (GE Healthcare, Munich, Germany) was added to the protein/antibody mix and incubated for 1 hour at 4°C on a rotator. The proteins were then immunoprecipitated by centrifugation at 4000 rpm for 30 seconds at 4°C and washed with low IP wash buffer. The bead pellet was resuspended in 15µl 2X Reducing Loading Buffer and boiled at 95-100°C for 5 minutes.

Western Blot

The co-IP samples were loaded onto a 10% SDS-PAGE gel and run at 200V. The proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membrane (Immobilon-P membrane) (Millipore, Billerica, US) at 200mA for 2 hours using a tank transfer. The membrane was blocked by incubation for 30 min at 37°C with shaking in 2% bovine gelatin (in PBS-0.1% Tween20). The membrane was then incubated with the anti-TRIB1 rabbit polyclonal antibody (AP7726b, Abgent, San Diego, CA) overnight at 4°C with shaking. The next day, the membrane was washed and incubated for 1H at room temperature with shaking with an anti-rabbit IgG, HRP-linked (Cell Signaling Technology, Beverly, MA). This antibody was used as the secondary antibody in chemiluminescent Western blot assays using the enhanced chemiluminescence (ECL) system (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ). The revelation was made by using a

Luminescent image analyzer (Fujifilm) and the Image Reader LAS-4000 and multigauge V3.0 software (Fujifilm, Tokyo, Japan).

Statistics

The nonparametric Mann-Whitney test was used for comparison between two groups, and the nonparametric Kruskal-Wallis test was performed for comparison of more than two groups. The nonparametric Spearman test was used for correlations. Values of $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ and $***p < 0.001$ were considered as significant.

Results

Increased expression of Tribbles-1 in human and mouse CD4+CD25+CD127- Tregs compared to their CD4+CD25- non Tregs counterpart.

We isolated CD4+CD25+CD127- Tregs and CD4+CD25- non Treg counterparts from human PBMC using flow-cytometry and cell sorter (Fig. 1 A) and measured the level of TRIB1 by RT-qPCR. The expression of the FoxP3 gene was analyzed in parallel. We found TRIB1 mRNA, like that of FoxP3, to be expressed at significantly higher levels in human CD4+CD25+CD127- Tregs compared to their CD4+CD25- T cells counterparts (Fig. 2A) ($p < 0.001$ for TRIB1 and FoxP3). Moreover, a significant correlation was observed between TRIB1 and FoxP3 mRNA expression in human regulatory T cells ($r = 1,0$; $p = 0,0004$; Fig. 2A). Thus, we observed a similar increase of these two molecules in the Tregs, suggesting that most probably there is a strong link between the regulation of TRIB1 and FoxP3 expression in the Tregs. Moreover, this results were confirmed in CD4+CD25- and CD4+CD25+ T cells from mice (C57Bl6) where we also observed an increase in TRIB1 and FoxP3 levels in CD4+CD25+ cells compared to CD4+CD25- cells ($p < 0.05$ for TRIB1 and $p < 0.01$ for FoxP3) (Fig. 1 and 2B).

TRIB1 is not regulated upon Treg activation.

Given the correlation between TRIB1 and FoxP3 mRNA in Tregs, we wanted to know if these two molecules are regulated in the same way during Tregs activation. This was not the case as human Tregs activated with IL-2 and anti-CD3/anti-CD28 beads for 24 hours upregulated their expression of FoxP3 mRNA (2.5 fold, $p < 0.01$) whereas TRIB1 mRNA remained stable after activation (Fig. 3) (p NS). We also observed using the Spearman test that the correlation between TRIB1 and FoxP3 in Tregs is lost after activation ($p = 0.1333$).

These data suggest that the expression of TRIB1 and FoxP3 are constitutive and linked within non- activated Tregs.

TRIB1 interacts with FOXP3 in Human adherent cell lines.

We next analyzed the potential direct physical interaction between TRIB1 and FoxP3 molecules. Adherent cells lines (HEK293 cells or HeLa cells) were co-transfected with plasmids containing two different genes (among other TRIB1 and FoxP3). Each plasmid contained a complementary fragment of the GFP gene. Direct physical interaction between the two plasmid-encoded proteins led to the emission of GFP fluorescence, which was analyzed by flow cytometry and microscopy. For the FACS analysis, the assay was performed on HEK 293 cells as these cells produce a large amount of proteins. For microscopy analysis, the assay was performed on HeLa as these cells spread out on the culture plate, thus facilitating observation of intracellular fluorescence localization. By flow cytometry analysis, we showed that TRIB1 and FoxP3 interacted together (Fig.4A). Indeed, the value of the fluorescent cells is increased of more than 27% compared to the untransfected cells ($p < 0.01$). The strength of the interaction was similar to a previously reported strong interaction between TRIB1 and MEK1⁸. The analysis by microscopy on HeLa cells showed that the interaction tookplace in the nucleus (Fig. 4B left) contrary to the control TRIB1-Gab1 interaction which took place in the cytoplasm (Fig. 4B right). This nuclear interaction could explain the decreased of the fluorescent cells with the deletion of the N-terminus fragment of TRIB1 reported to be necessary for the nuclear import of the molecule²⁶. Indeed with the N-terminus deletion of TRIB1, the percentage of fluorescent cells is no longer significantly different from the untransfected cells. However, the deletion of the C-terminus of TRIB1 do not impact the interaction between TRIB1 and FoxP3 with is significantly increased compared to the

untransfected cells ($p < 0.05$) and similar to the interaction between the entire TRIB1 and FoxP3.

TRIB1 interacts with FOXP3 in freshly isolated human regulatory T cells.

Given that TRIB1 and FOXP3 were found to directly interact in a human cell line, we wished to confirm such an interaction in primary human Tregs. For this purpose we performed co-immunoprecipitation experiments on nuclear extracts of freshly isolated human Tregs with an anti-FoxP3 antibody. As shown in the left-hand panel of Fig.5, blotting of TRIB1 on the nuclear extract precipitated with anti-FoxP3 identified a clear band representing the TRIB1 protein. This band was absent for the negative control (Co-IP performed using with mouse IgG), confirming a direct interaction between the TRIB1 and FoxP3 proteins in freshly isolated human CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Tregs.

Discussion

Here we report on TRIB1, a molecule implicated in various forms of cancer^{27,28,29,30} plasmalipid homeostasis, myocardiac infarction^{31,32,11} and inflammation states^{33,34,9}. Our previous demonstration of this molecule as a biomarker of rejection in kidney transplantation based on its measurement in PBMC led us to further explore TRIB1 expression and function in a key subtype of PBMC with a transversal role in regulating immune responses, so-called Tregs. Given that Tregs are characterized by their expression of FOXP3, we searched for a potential relationship between FOXP3 and TRIB1.

The regulatory mechanisms of the Tregs are focused on FoxP3 via its expression regulated by complex mechanisms but also via its interaction with other molecules to acts as transcription factor. Indeed, the expression of Forkhead box P3 (FoxP3) is highly regulated by many transcription factors which bind one of the four regulating regions of the FoxP3 gene^{35,36,37}. In addition to regulating its own expression, FoxP3 also regulates the transcription of other molecules by interacting with many different proteins such as NFAT (Nuclear factor of activated T-cells^{38,39}), NF- κ B (nuclear factor-kappa B³⁹) and Runx1/AML1⁴⁰. These interactions lead to regulation of cytokine production, including IL-2, IL-4 and IFN- γ as well as the Tregs markers expression (CD25, CTLA-4)^{41,42}. FoxP3 can be considered as a master regulator of Tregs.

Here we show that TRIB1 is expressed at significantly higher levels in freshly isolated human Tregs compared to their non-Treg counterparts. This result was confirmed in mice. Moreover, we also found that the expression of the two TRIB1 and FoxP3 molecules in human Tregs to be strongly correlated. This suggests that TRIB1 and FOXP3 may be involved in regulating common pathways. Interestingly, TRIB1 mRNA was not up-regulated upon a polyclonal stimulation unlike FoxP3 mRNA, suggesting a constitutive link of these two molecules in Tregs.

Given the correlation between the two molecules we next asked whether these two molecules may interact directly. For this, we used the protein complementation assay describes by Kiss-Toth's team⁹. Using this technology, we have shown that TRIB1 and FoxP3 interact together and that this interaction is as strong as the TRIB1-MEK1 interaction previously reported⁸. This interaction decreased slightly when TRIB1 is deleted of its N-terminus domain. This nuclear interaction fits well with the fact that the N-terminus domain of TRIB1 is particularly important for transporting TRIB1 to the nucleus^{3,45} and that FoxP3 is principally expressed in the nucleus¹⁸. This was confirmed by fluorescent microscopy of a PCA experiment which shows clearly the interaction between TRIB1 and FoxP3 in the nucleus. By cons, when TRIB1 was deleted from its C-terminus domain we didn't see any difference compared to the full TRIB1. This data indicate that the C-terminus domain is not involved in the interaction of TRIB1 with FoxP3. As the PCA experiment consists in transfecting cell lines with plasmid, we wanted to confirm the TRIB1 and FoxP3 interaction in more physiological conditions. For this, we have realized a co-immunoprecipitation (co-IP) starting from nuclear extract of freshly isolated human CD4+CD25+CD127- Tregs. This experiment results are in perfect harmony with the previous. Indeed, this co-IP shows clearly that TRIB1 and FoxP3 interact together and that this interaction takes place in the nucleus.

The interaction between these two molecules was not identified until now. It could have an important impact on the Tregs function that remains to be determined in further studies. Indeed, TRIB1 is known to act on various pathway by binding with diverse proteins^{27,46} and is reported to be implicated in the cell proliferation^{8,28,47,48} or to have anti-proliferative effects⁴⁹ that may have an impact on Tregs biology or function. Indeed, Tregs have a detrimental impact on cancer development but, on the contrary, these cells are important to prevent autoimmune disease. Thus, the impact of the interaction between TRIB1 and FoxP3 on the

regulatory T cells proliferation can be either deleterious or beneficial depending on the pathway involved. This point needs to be further studied to be clarified.

Acknowledgments:

ED is a recipient of a CIFRE funding N° 717/2008. SB is a recipient of an ANR grant ANR-07-1215-0101

CENTAURE

Bibliography

1. Biomarkers Definitions Working Group Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin. Pharmacol. Ther.***69**, 89-95 (2001).
2. Ashton-Chess, J. *et al.* Tribbles-1 as a Novel Biomarker of Chronic Antibody-Mediated Rejection. *Journal of the American Society of Nephrology***19**, 1116-1127 (2008).
3. Hegedus, Z., Czibula, A. & Kiss-Toth, E. Tribbles: novel regulators of cell function; evolutionary aspects. *Cell. Mol. Life Sci.***63**, 1632-1641 (2006).
4. Mata, J., Curado, S., Ephrussi, A. & Rørth, P. Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell***101**, 511-522 (2000).
5. Seher, T. C. & Leptin, M. Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation. *Curr. Biol.***10**, 623-629 (2000).
6. Grosshans, J. & Wieschaus, E. A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell***101**, 523-531 (2000).
7. Grosshans, J. & Wieschaus, E. A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell***101**, 523-531 (2000).
8. Kiss-Toth, E. *et al.* Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.***279**, 42703-42708 (2004).
9. Sung, H. Y. *et al.* Human tribbles-1 controls proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells via MAPK signaling pathways. *J. Biol. Chem.***282**, 18379-18387 (2007).
10. Yokoyama, T. & Nakamura, T. Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation. *Cancer Sci.***102**, 1115-1122 (2011).
11. Kathiresan, S. *et al.* Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat. Genet.***40**, 189-197 (2008).
12. Wang, J. *et al.* Polygenic determinants of severe hypertriglyceridemia. *Hum. Mol. Genet.***17**, 2894-2899 (2008).
13. Willer, C. J. *et al.* Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat. Genet.***40**, 161-169 (2008).
14. Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M. & Toda, M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.***155**, 1151-1164 (1995).
15. Earle, K. E. *et al.* In vitro expanded human CD4+CD25+ regulatory T cells suppress effector T cell proliferation. *Clin. Immunol.***115**, 3-9 (2005).
16. Li, X. C. & Turka, L. A. An update on regulatory T cells in transplant tolerance and rejection. *Nat Rev Nephrol***6**, 577-583 (2010).
17. Nishikawa, H. & Sakaguchi, S. Regulatory T cells in tumor immunity. *Int. J. Cancer***127**, 759-767 (2010).
18. Fontenot, J. D. *et al.* Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity***22**, 329-341 (2005).
19. Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y. & Sakaguchi, S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.***3**, 135-142 (2002).
20. Takahashi, T. *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.***192**, 303-310 (2000).
21. Fontenot, J. D., Gavin, M. A. & Rudensky, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.***4**, 330-336 (2003).

22. Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science***299**, 1057-1061 (2003).
23. Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.-A. & Ramsdell, F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat. Immunol.***4**, 337-342 (2003).
24. Remy, I. & Michnick, S. W. A cDNA library functional screening strategy based on fluorescent protein complementation assays to identify novel components of signaling pathways. *Methods***32**, 381-388 (2004).
25. Remy, I. & Michnick, S. W. A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase. *Nat. Methods***3**, 977-979 (2006).
26. Hegedus, Z., Czibula, A. & Kiss-Toth, E. Tribbles: a family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function. *Cell. Signal***19**, 238-250 (2007).
27. Dedhia, P. H. *et al.* Differential ability of Tribbles family members to promote degradation of C/EBPalpha and induce acute myelogenous leukemia. *Blood***116**, 1321-1328 (2010).
28. Jin, G. *et al.* Trib1 and Evi1 cooperate with Hoxa and Meis1 in myeloid leukemogenesis. *Blood***109**, 3998-4005 (2007).
29. Röthlisberger, B., Heizmann, M., Bargetzi, M. J. & Huber, A. R. TRIB1 overexpression in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.***176**, 58-60 (2007).
30. Rücker, F. G. *et al.* Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization. *J. Clin. Oncol.***24**, 3887-3894 (2006).
31. Burkhardt, R. *et al.* Trib1 is a lipid- and myocardial infarction-associated gene that regulates hepatic lipogenesis and VLDL production in mice. *J. Clin. Invest.***120**, 4410-4414 (2010).
32. Varbo, A., Benn, M., Tybjærg-Hansen, A., Grande, P. & Nordestgaard, B. G. TRIB1 and GCKR polymorphisms, lipid levels, and risk of ischemic heart disease in the general population. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.***31**, 451-457 (2011).
33. Eder, K. *et al.* LDL uptake by monocytes in response to inflammation is MAPK dependent but independent of tribbles protein expression. *Immunol. Lett.***116**, 178-183 (2008).
34. Ostertag, A. *et al.* Control of adipose tissue inflammation through TRB1. *Diabetes***59**, 1991-2000 (2010).
35. Maruyama, T. *et al.* Control of the differentiation of regulatory T cells and T(H)17 cells by the DNA-binding inhibitor Id3. *Nat. Immunol.***12**, 86-95 (2011).
36. Ruan, Q. *et al.* Development of Foxp3(+) regulatory t cells is driven by the c-Rel enhanceosome. *Immunity***31**, 932-940 (2009).
37. Barbarulo, A. *et al.* Notch3 and canonical NF-kappaB signaling pathways cooperatively regulate Foxp3 transcription. *J. Immunol.***186**, 6199-6206 (2011).
38. Wu, Y. *et al.* FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell***126**, 375-387 (2006).
39. Bettelli, E., Dastrange, M. & Oukka, M. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.***102**, 5138-5143 (2005).
40. Ono, M. *et al.* Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature***446**, 685-689 (2007).
41. Zheng, Y. & Rudensky, A. Y. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat. Immunol.***8**, 457-462 (2007).
42. Khattri, R. *et al.* The amount of scurfin protein determines peripheral T cell number and responsiveness. *J. Immunol.***167**, 6312-6320 (2001).

43. Sharova, L. V. *et al.* Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res.***16**, 45-58 (2009).
44. Sung, H. Y., Francis, S. E., Crossman, D. C. & Kiss-Toth, E. Regulation of expression and signalling modulator function of mammalian tribbles is cell-type specific. *Immunol. Lett.***104**, 171-177 (2006).
45. Kiss-Toth, E. *et al.* Functional mapping and identification of novel regulators for the Toll/Interleukin-1 signalling network by transcription expression cloning. *Cell. Signal.***18**, 202-214 (2006).
46. Yokoyama, T. *et al.* Trib1 links the MEK1/ERK pathway in myeloid leukemogenesis. *Blood***116**, 2768-2775 (2010).
47. Puiffe, M.-L. *et al.* Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia***9**, 820-829 (2007).
48. Puskas, L. G., Juhasz, F., Zarva, A., Hackler, L., Jr & Farid, N. R. Gene profiling identifies genes specific for well-differentiated epithelial thyroid tumors. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)***51**, 177-186 (2005).
49. Gilby, D. C. *et al.* Tribbles-1 and -2 are tumour suppressors, down-regulated in human acute myeloid leukaemia. *Immunol. Lett.***130**, 115-124 (2010).

Figures

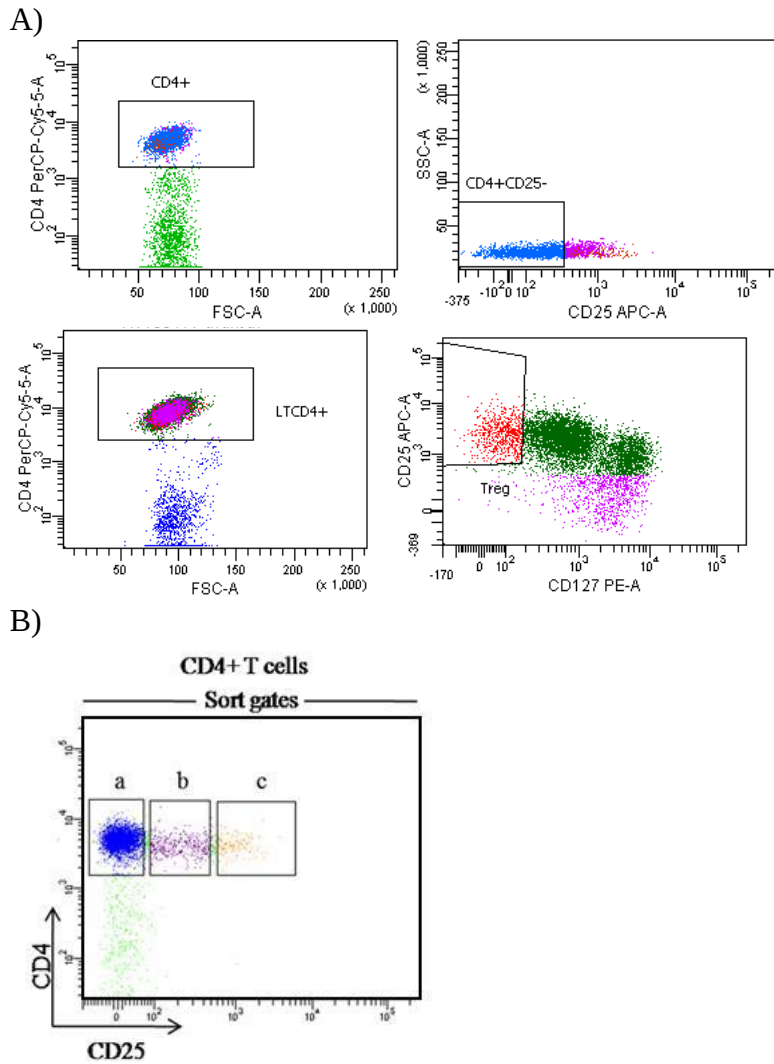


Figure 1:A- Sort parameters for isolation of the human CD4+CD25⁻ (up) and CD4+CD25+CD127⁻ (down) T cells also called regulatory T cells. The left panels show the gate eliminating the CD4⁻ T cells and selected specifically the CD4⁺ T cells. The right and up panel shows the gate for selecting the CD4+CD25⁻ T cells from the CD4⁺ fraction previously selected. The right and down panel shows the gate for selecting the CD4+CD25+CD127⁻ T cells from the CD4⁺ fraction previously selected.B- Sort parameters for isolation of the mouse CD4+CD25⁻ and CD4+CD25^{high} T cells. The different populations were isolated after a CD4⁺ T cells enrichment of mouse splenocytes Only the CD4⁺ T cells population is represented on the panel as the CD4⁻ T cells were eliminated by the enrichment and a first gate selected specifically the CD4⁺ T cells. The left gate show the sorting of the CD4+CD25⁻ T cells. The right gate show the sorting of the CD4+CD25^{high} T cells.

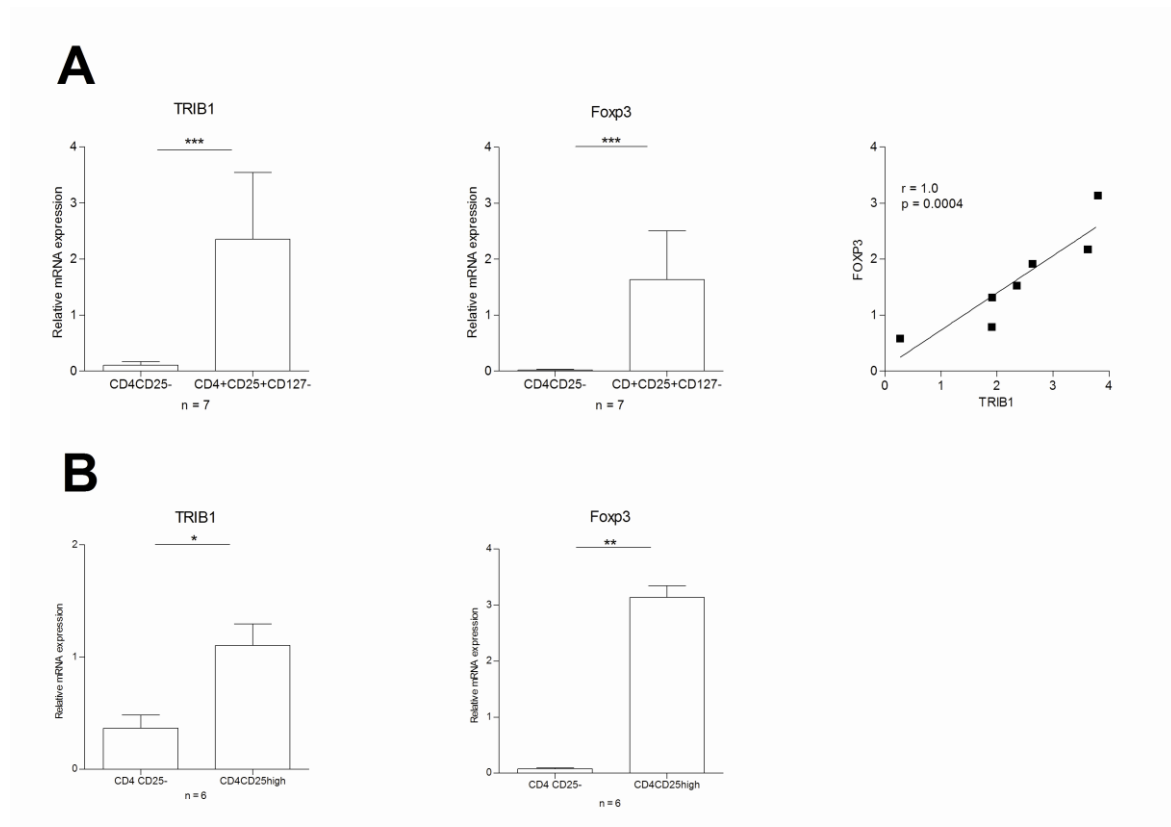


Figure 2: A- Quantification of the TRIB1 and FoxP3 mRNA in human CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T cells. Real-time quantitative RT-PCR analysis for quantification of TRIB1 mRNA (left) and FoxP3 mRNA (middle) in CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺CD127⁻ human T cells from seven healthy individuals. Statistical analyses were performed using a non parametric Mann Whitney test. Analysis of correlation between TRIB1 and FoxP3 in CD4⁺CD25⁺CD127⁻ T cells and statistical analysis of correlation were performed with a non parametric spearman test (right). B- Quantification of the TRIB1 and FoxP3 mRNA in mouse CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25^{high} T cells. Real-time quantitative RT-PCR analysis of TRIB1 (left) and FoxP3 (right) mRNA in CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25^{high} mouse T cells of 6 normal C57Bl6 mice. Statistical analyses were performed using a non parametric Mann Whitney test.

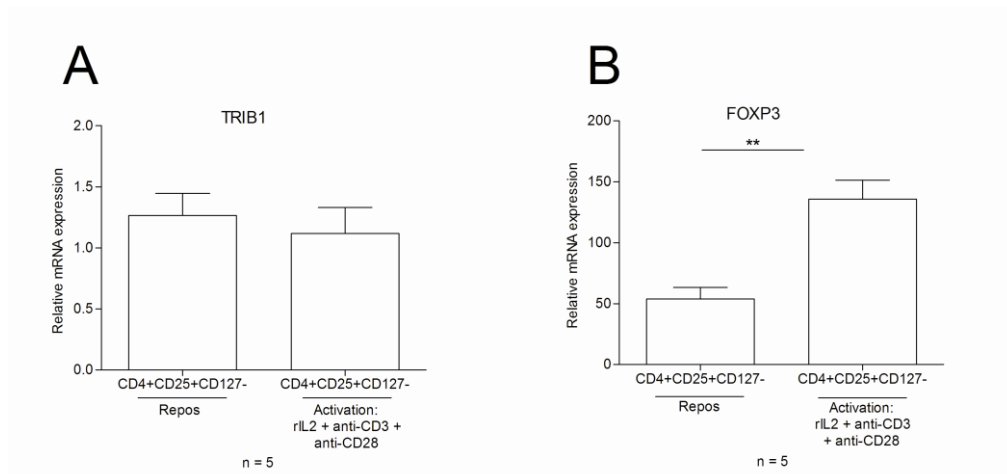


Figure 3: Quantification of the TRIB1 and FoxP3 mRNA in human CD4+CD25+CD127- T cells with or without activation. Real-time quantitative RT-PCR analysis for quantification of TRIB1 mRNA (A) and FoxP3 mRNA (B) in CD4+CD25+CD127- human T cells from five healthy individuals after 24 hours of culture in complete medium associated with rIL-2, anti-CD3 and anti-CD28 antibodies. Statistical analyses were performed using a non parametric Mann Whitney test.

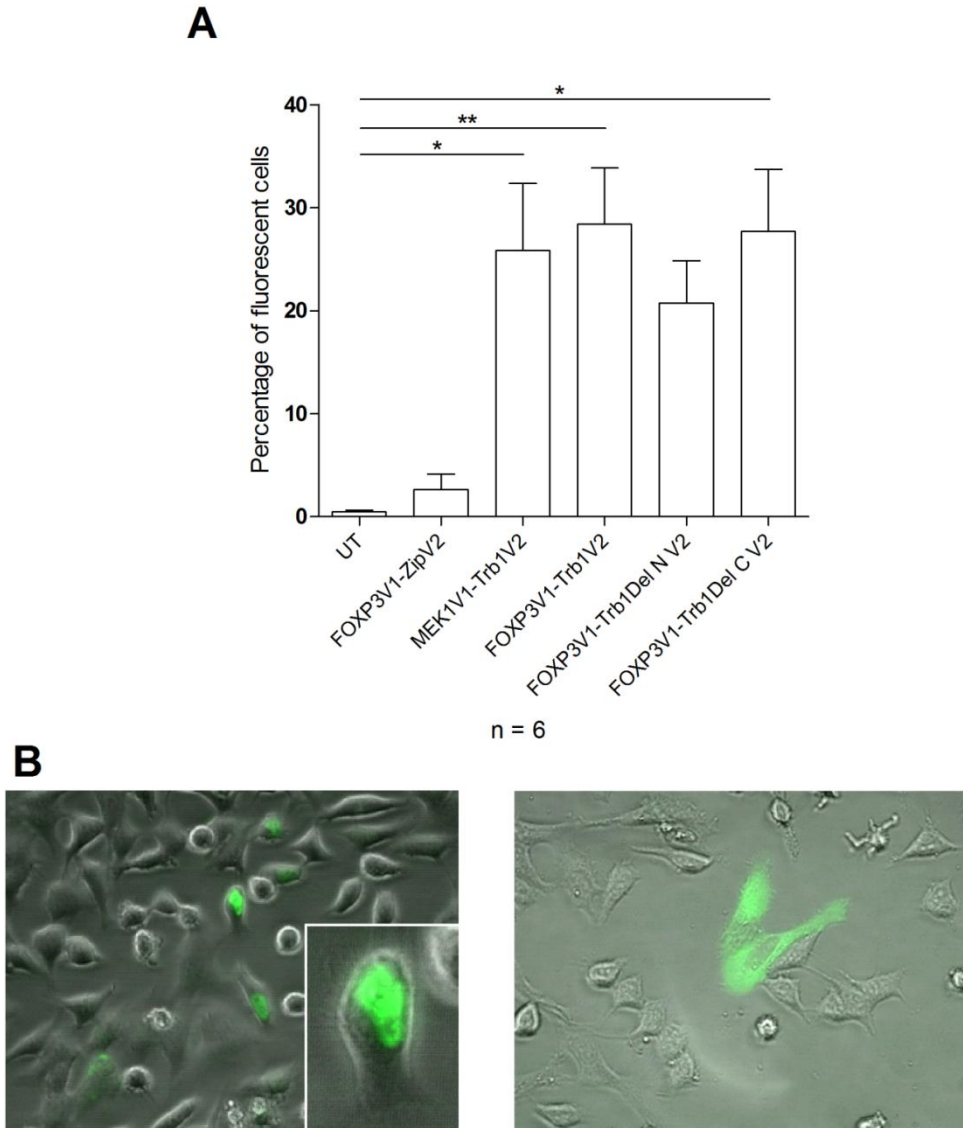


Figure 4: A- Percentage of fluorescent HEK293 transfected cells in PCA experiments analyzed by flow cytometry in PCA experiments. UT represents the untransfected cells. FoxP3V1-ZipV2 is a negative control as FOXP3 and Zip are two proteins which do not interact. MEK1V1-Trb1V2 is a positive control and show a strong interaction previously describes between MEK1 and TRIB1. FOXP3V1-Trb1V2 represents the interaction between FoxP3 and TRIB1. FoxP3V1-Trb1DelNV2 represents the interaction between FoxP3 and TRIB1 with a deletion of the N-terminus of TRIB1 protein. FoxP3V1-TrbDelC1V2 represents the interaction between FoxP3 and TRIB1 with a deletion of the C-terminus of TRIB1 protein. The experiment was repeated 6 times and was made in triplicate each time. B- Fluorescent microscopy analyses of HeLa live cells in PCA experiments Panel a show the analysis by fluorescence microscopy from a PCA experiment made on HeLa cells with the FoxP3V1 and the Trb1V2 plasmids. Panel b show the analysis by fluorescence microscopy from a PCA experiment made on HeLa cells with the GAB1V1 and the Trb1V2 plasmids.

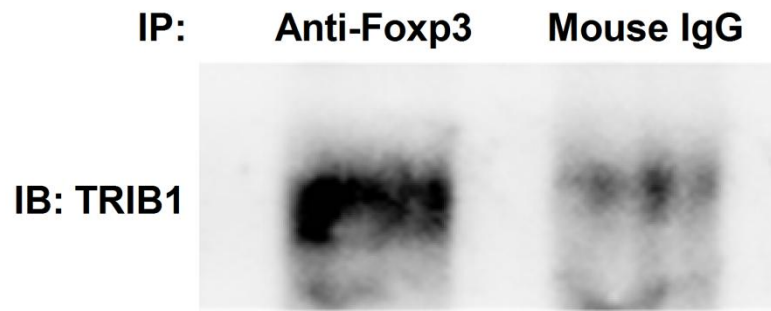


Figure 5: TRIB1 immunoblotting on co-IP samples performed with anti-FoxP3 antibody or mouse IgG on nuclear extract of human regulatory T cells. TRIB1 protein expression was assessed by western blotting. The sample come from nuclear extract of freshly isolated human regulatory T cells co-immunoprecipitated with the FoxP3 protein.

2. Résultats complémentaires

a. Etude de TRIB1 dans une lignée cellulaire : les Jurkats

Après avoir analysé le profil d'expression de TRIB1 dans divers sous-types cellulaires, nous avons constaté que TRIB1 était plus fortement exprimé dans les Tregs par rapport aux cellules non régulatrices CD4+CD25-. Nous avons donc souhaité nous intéresser à l'étude de TRIB1 dans les Tregs. Afin de mettre au point les outils dont nous aurons besoin pour cette étude, nous avons utilisé une lignée cellulaire T : les Jurkats.

Dans cette optique, nous avons tout d'abord réalisé une activation de Jurkats avec de la PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) pendant 24h, puis nous avons analysé l'expression de TRIB1 dans ces cellules, mais également des autres molécules de la même famille c'est-à-dire TRIB2 et TRIB3. FoxP3 étant une molécule cruciale pour la fonction suppressive des Tregs nous avons également analysé son expression au cours de l'activation (Figure 18).

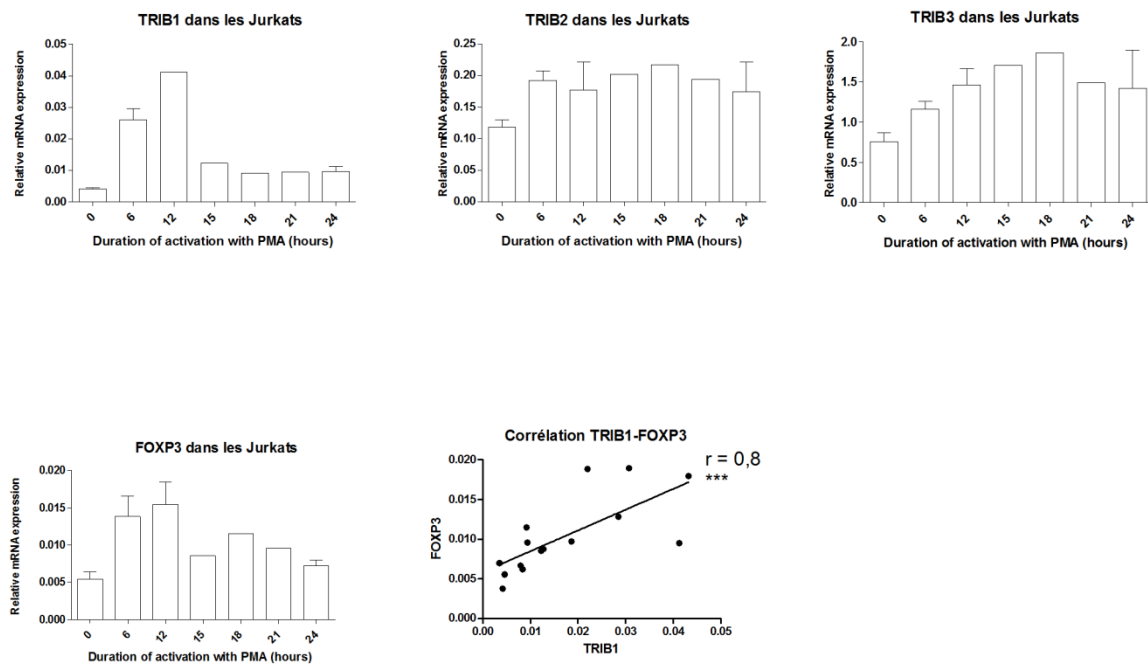


Figure 18: Expression relative d'ARNm de TRIB1, TRIB2, TRIB3 et FoxP3 au cours du temps dans des Jurkats activées à la PMA. Corrélation entre l'expression d'ARNm de TRIB1 et FoxP3 dans ces Jurkats.

De manière non surprenante, nous avons observé une augmentation transitoire de FoxP3 dans les Jurkats suite à l'activation. En effet, dans les LT CD4+CD25- humains, il a également été décrit que FoxP3 augmente transitoirement suite à une activation.

Cette étude montre que TRIB1 est également très largement régulé lors de l'activation des Jurkats par la PMA contrairement aux autres membres de la même famille. On observe que l'augmentation de TRIB1 est transitoire et atteint son maximum 12 heures après activation puis retourne à son niveau basal 15 heures après activation. De la même façon, FoxP3 suit le même profil suite à l'activation des Jurkats à la PMA. Un analyse statistique montre que les deux molécules TRIB1 et FoxP3 sont régulées de la même façon car l'expression des deux molécules est corrélée ($r=0,8$; $p=0,0003$). Cependant, le niveau de FoxP3 diminue de manière moins importante que TRIB1 puisque après 24H le niveau basal d'expression de FoxP3 n'est pas retrouvé.

Cette première étude nous a donc bien confortés dans l'idée qu'il pouvait exister un lien entre TRIB1 et FoxP3.

Pour la suite de l'étude de TRIB1 dans les Tregs, nous souhaitons analyser le rôle fonctionnel de TRIB1 au sein de ces cellules. D'après la littérature, il semble que TRIB1 joue un rôle dans la prolifération cellulaire. Ainsi nous voulions donc réaliser des tests de prolifération et de suppression avec des Tregs n'exprimant plus de TRIB1. Pour cela, nous avons utilisé des siRNA dirigés contre TRIB1.

Dans une étude préliminaire nous avons donc analysé plusieurs siRNA dirigés contre TRIB1 dans des jurkats activés 12 heures à la PMA car c'est le moment où l'expression de TRIB1 est la plus importante (Figure 19).

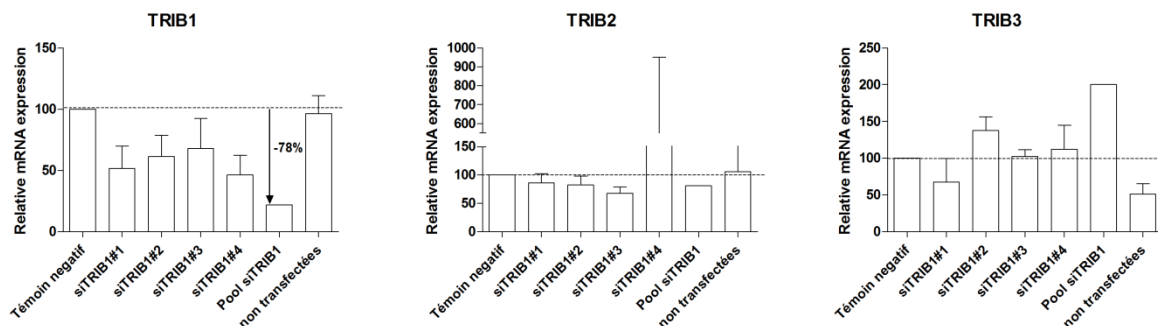


Figure 19: Expression relative d'ARNm de TRIB1, TRIB2 et TRIB3 dans des Jurkats activées à la PMA pendant 12 heures et transfectées avec des siRNA dirigées contre TRIB1 ou avec un siRNA contrôle.

Cette analyse nous a permis de constater que le mix des quatre siRNA a une meilleure efficacité que les siRNA utilisés individuellement en comparant avec le siRNA contrôle négatif qui ne doit pas modifier le taux de TRIB1. Le mix de siRNA permet une diminution

de 78% de l'expression de TRIB1. Nous avons également montré que ces siRNA sont spécifiques de TRIB1 car l'expression de TRIB2 et de TRIB3 n'est pas diminuée.

b. Etude de TRIB1 dans les lymphocytes T régulateurs

Nous avons montré dans notre étude, que l'expression de TRIB1 dans les Tregs est plus importante que dans les lymphocytes T CD4⁺CD25⁻. De plus TRIB1 a été décrite comme une molécule pro-prolifératrice mais également anti-prolifératrice en fonction du modèle utilisé. Plus spécifiquement, l'activité pro-prolifératrice a été décrite principalement dans des modèles de pathologies cancéreuses. Ainsi, nous souhaitons définir le rôle que peut jouer la molécule TRIB1 dans les Tregs des individus sains chez lesquels elle est fortement exprimée.

Pour cela, nous avons dans un premier temps réalisé des transfections dans les Tregs avec le pool de siRNA qui ont été préalablement marqués à la Cy5. L'utilisation des siRNA marqués à la Cy5 devrait nous permettre de pouvoir ensuite trier les Tregs transfectés à l'aide de cytomètre trieur de cellules BD FACSAria™ afin de les utiliser pour les tests de suppression et de prolifération.

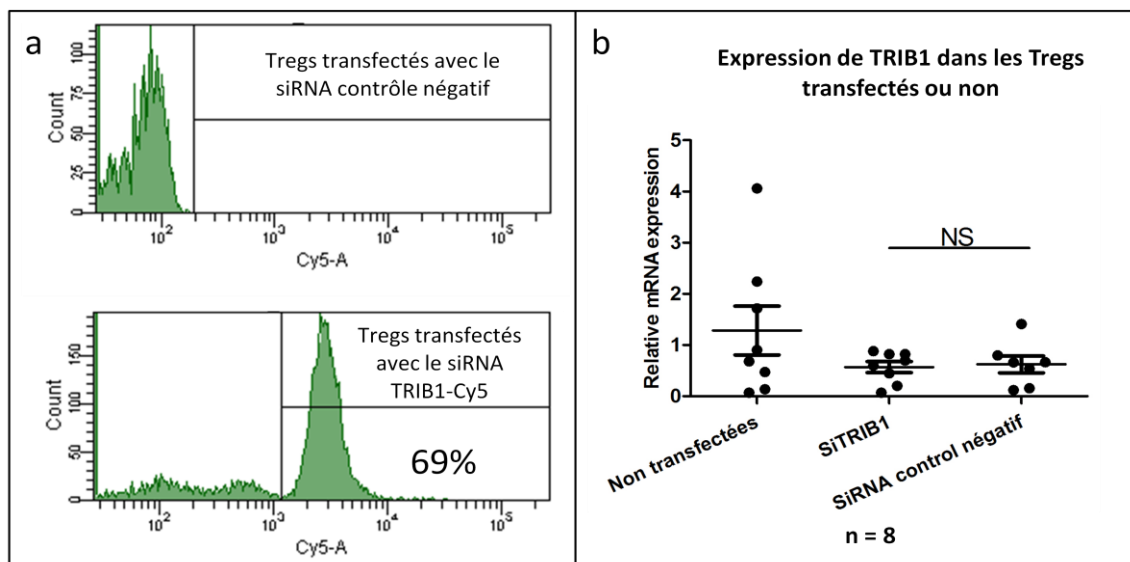


Figure 20: a- Image représentative des analyses par FACS de la transfection des Tregs avec le siRNA-Cy5 dirigés contre TRIB1. b- Analyse de l'expression de TRIB1 dans les Tregs non transfectées ou dans les Tregs transfectées avec un siRNA dirigé contre TRIB1 ou un siRNA contrôle négatif.

Malgré l'apparente efficacité de transfection d'après l'analyse par FACS (Figure 20a), nous n'observons pas de différence d'expression de TRIB1 au sein de ces Tregs transfectés avec

les siRNA dirigés contre TRIB1 en comparaison avec les Tregs transfectés avec un siRNA contrôle négatif (Figure 20b).

Face à ces résultats décevants, nous avons donc décidé de mettre de côté, temporairement, l'étude de la fonction de TRIB1 dans les Tregs humains au profit de l'étude dans un modèle animal, la souris.

c. Production de souris TRIB cKO

Nous avons voulu développer un modèle animal chez lequel l'expression de TRIB1 est éteinte. Ainsi, nous avons lancé en 2006 la production de souris KO pour le gène TRIB1 via l'excision de l'exon 2 du gène (Stratégie 1 figure 21). La production de ces souris a été confiée à l'Institut Clinique de la Souris situé à Illkirch. Malgré tous leurs efforts, il s'est avéré qu'ils n'ont pas réussi à produire de souris KO TRIB1. Nous avons donc décidé de modifier la stratégie de KO en la remplaçant par la réalisation de souris KO conditionnelle pour le gène TRIB1 (Stratégie 2 figure 21).

La stratégie 2 utilisée est la suivante :

Le gène TRIB1 comportant 3 exons est modifié via l'insertion de plusieurs séquences. Le gène de résistance à la néomycine est inséré et placé entre deux séquences flp et l'exon 2 est placé entre 2 séquences LoxP. Ensuite, le gène TRIB1 modifié est électroporé dans des cellules souches embryonnaires (ES) qui vont être sélectionnées par la néomycine. Une fois les cellules ES sélectionnées, le gène de résistance à la néomycine va être éliminé grâce aux séquences flp qui vont-elles-mêmes ensuite être éliminées. En septembre 2011, nous avons obtenu des souris L2/L2 qui sont donc conditionnelles KO pour le gène TRIB1. Par la suite nous allons devoir utiliser le CRE recombinase afin de déléter l'exon 2 du gène TRIB1 afin de rendre la molécule non fonctionnelle.

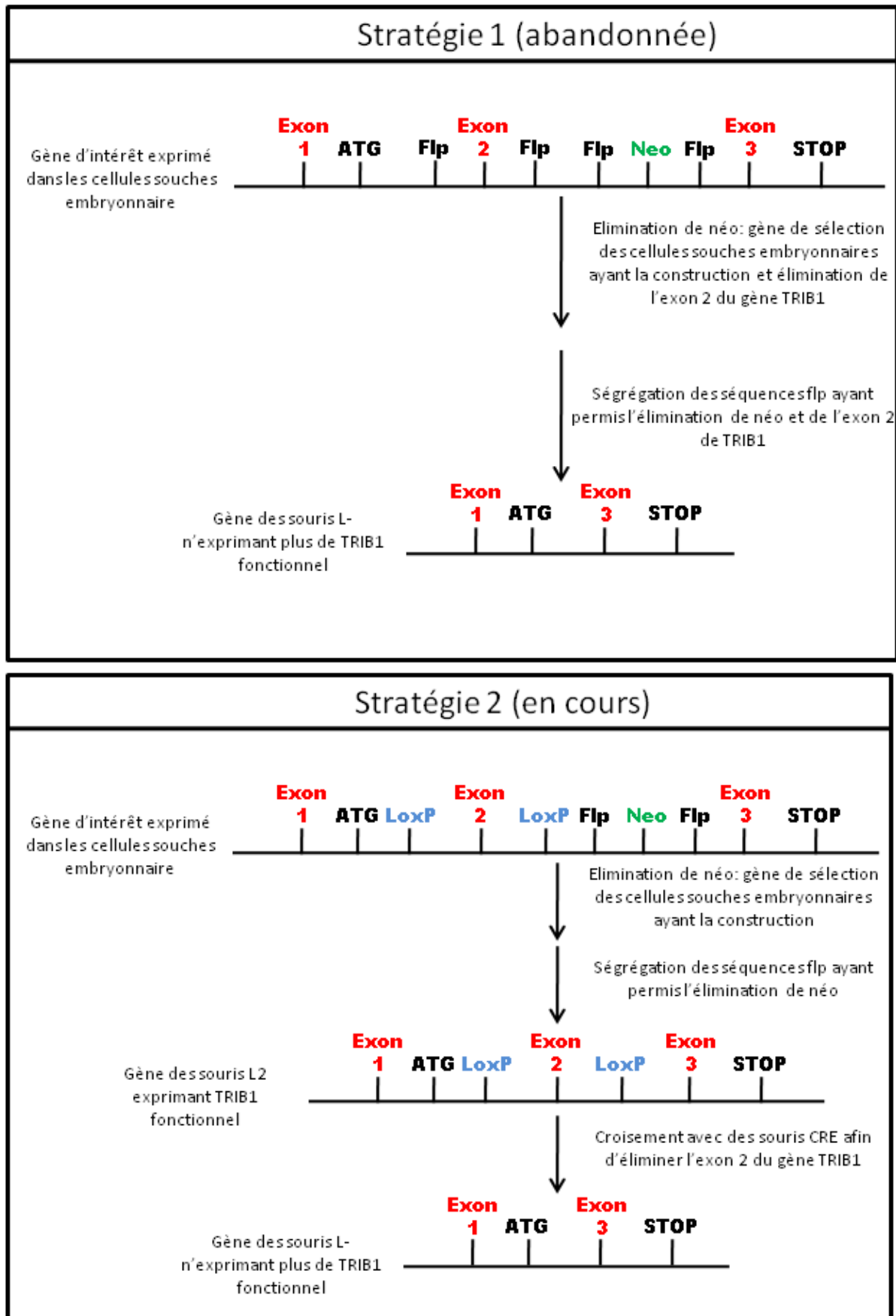


Figure 21: Stratégies utilisées pour la production des souris KO et cKO.

d. Recherche de molécules interagissant avec TRIB1

Enfin, nous avons réalisé une dernière étude en collaboration avec la société Hybrigenics. Cette société est spécialisée dans l'étude d'interaction protéine-protéine par le système de levure double hybride (Figure 22).

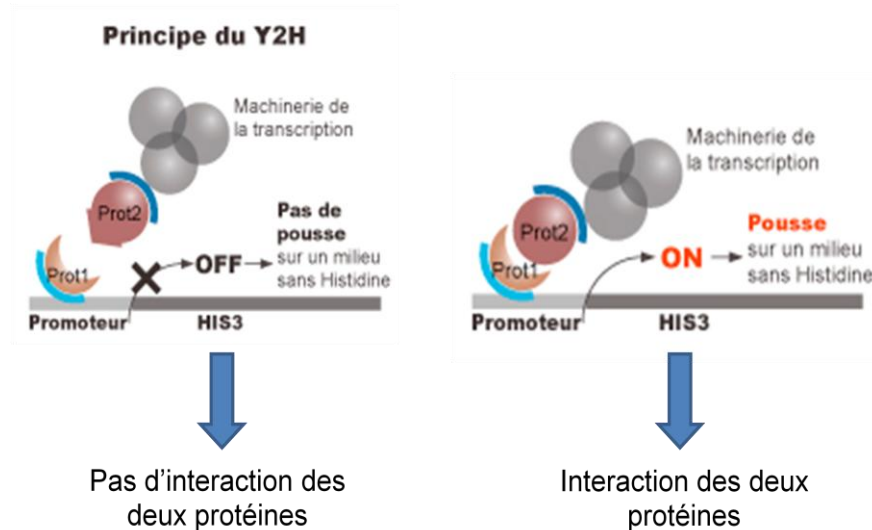


Figure 22: Principe du système de levure double hybride utilise par Hybrigenics.

Dans cette étude, la protéine TRIB1 humaine a été utilisée comme appât et les protéines constituant les proies sont issues d'une banque réalisée à partir de leucocytes humain et de cellules mononucléées activées. Grâce à cette étude, nous avons pu identifier trois partenaires d'interaction de TRIB1 potentiellement intéressants. Deux protéines ont obtenu un score A, qui signifie que le niveau de confiance dans l'interaction est très élevé et une protéine a obtenu un score B avec donc un niveau de confiance dans l'interaction élevé.

La première protéine avec un score A est la molécule MALT1 (Mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1) et la deuxième protéine est STK40 (Serine/threonine kinase 40). Enfin la protéine avec un score B est P4HA1 (Sous unité $\alpha 1$ de l'enzyme prolyl-4-hydroxylase).

La protéine MALT1 est une protéase et plus précisément une paracaspase qui active NF- κ B lors de l'activation des T. MALT1 est impliquée dans l'activation des T, leur prolifération, leur production d'IL2 et leur adhésion par les intégrines. Cette protéine est également particulièrement importante dans la pathogenèse du lymphome de MALT (Ruland et al. 2003; Rebeaud et al. 2008).

STK40 est une protéine possédant une forte homologie avec TRIB1 ce qui peut entre autre expliquer l'interaction trouvée par le système double hybride. Cette molécule inhibe l'activation NF-KB déclenchée par TNF et inhibe également la transcription induite par p53 (J. Huang et al. 2003). De plus STK40 active la voie ERK/MAPK afin d'induire la différenciation de l'endoderme extra-embryonnaire chez la souris (Lingjie Li et al. 2010).

Enfin P4HA1 a un rôle dans synthèse du collagène. Cette molécule est sur-régulée par TGFβ et l'interleukine-6 mais sous-régulée par le TNFα via les voies ASK1-JNK et ERK (L. Chen et al. 2006; Li Li et al. 2011; C. Zhang et al. 2007).

3. Discussion

a. Discussion de l'article sur TRIB1 dans les Tregs

Dans la première partie de l'étude menée au cours de cette thèse, nous avons montré que Tribbles-1 (TRIB1) constitue un biomarqueur du rejet chronique humoral actif. Ainsi, cette molécule, déjà décrite dans diverses pathologies, semble également avoir un rôle dans la transplantation. Dans la deuxième partie de ma thèse, nous nous sommes plus particulièrement intéressés à cette molécule TRIB1 dans les lymphocytes T régulateurs. En effet, en analysant l'expression de TRIB1 dans plusieurs sous-type cellulaires, nous avons observé que cette molécule est largement sur-exprimée dans les Tregs d'individus sains comparé aux lymphocytes T CD4+CD25-.

Dans ces Tregs, la molécule FoxP3 (Forkhead box P3) constitue un marqueur de référence. Il confère à ces cellules leurs propriétés suppressives comme en témoignent des expériences dans lesquelles l'absence de FoxP3 élimine les capacités suppressives des Tregs (Fontenot, Rasmussen, L. M. Williams, et al. 2005) et à l'inverse l'expression forcée de FoxP3 dans les cellules CD4+CD25- rend ces cellules suppressives (Hori et al. 2003). L'expression de FoxP3 est principalement régulée par les interactions de diverses molécules au niveau du gène et l'activité de FoxP3 est également contrôlée par des interactions avec d'autres molécules (Mantel et al. 2006; Bettelli et al. 2005; Ono et al. 2007).

Ces deux molécules, TRIB1 et FoxP3, sont exprimées de manière plus importante dans les Tregs comparées aux lymphocytes T CD4+CD25- non régulateurs et elles ont été décrites

comme agissant en partie grâce à des interactions avec d'autres molécules. Ainsi, nous avons souhaité analyser l'existence éventuelle un lien entre ces deux molécules. Par cette étude, nous avons donc montré qu'en plus d'une sur-expression au sein des Tregs, il existe une corrélation de ces deux molécules dans les Tregs, ce qui laisse supposer que TRIB1 et FoxP3 peuvent peut-être être impliquées dans les mêmes fonctions ou voies de signalisation. En revanche, suite à une activation des Tregs, nous avons montré que contrairement à l'expression de FoxP3 qui augmente, l'expression de TRIB1 est, quant à elle, stable. Ces données indiquent que TRIB1 et FoxP3 sont deux molécules constitutives des Tregs mais que FoxP3 est modulée par l'activation alors que TRIB1 est indépendante de cette activation. Ainsi, TRIB1 est une des rares molécules exprimées par les Tregs et qui est indépendante de l'état d'activation de ces cellules. TRIB1 pourrait donc constituer un biomarqueur de ces cellules.

La protéine TRIB1 est une sérine-thréonine kinase like qui agit comme une scaffold protéine c'est-à-dire via des interactions avec d'autres molécules. De la même manière, FoxP3 agit également via des interactions avec d'autres molécules. Ainsi, étant donné le mode d'action de ces deux molécules et la corrélation qui existe dans les Tregs, nous avons souhaité voir si ces deux protéines interagissaient ensemble. Pour cela, nous avons utilisé le test PCA (Protein Complementation assay). Par cette technique, nous avons pu montrer que, dans des lignées cellulaires adhérentes humaines, TRIB1 et FoxP3 interagissent ensemble de manière aussi importante que l'interaction TRIB1-MEK1 précédemment décrite (Endre Kiss-Toth et al. 2004). Cette étude a également montré que cette interaction avait lieu dans le noyau et que la partie N-Terminale de TRIB1 joue un rôle vu que la délétion de ce fragment est associée à une diminution de l'interaction. Cette dernière donnée est tout à fait en accord avec les précédentes études réalisées sur TRIB1 qui montrent que la partie N-terminale de la protéine est liée à la localisation nucléaire de la protéine. Afin de confirmer cette interaction dans des conditions plus physiologiques, nous avons ensuite analysé l'interaction de ces deux protéines par co-immunoprécipitation à partir des noyaux de lymphocytes T régulateurs CD4+CD25+CD127- fraîchement isolés. Cette expérience a confirmé les résultats précédents en montrant très clairement une interaction entre les deux molécules dans le noyau.

Étant donné que l'activité de TRIB1 se fait via des interactions, on peut supposer que l'interaction TRIB1-FoxP3 induit une activation ou au contraire une inhibition de l'activité de FoxP3 sur la transcription de gène. De plus, TRIB1 semble être impliqué dans la prolifération

cellulaire, ainsi on peut imaginer que son interaction avec FoxP3 joue sur la prolifération des Tregs. Ce point nécessite par la suite d'être étudié de manière plus approfondie.

b. Discussion des résultats complémentaires

Les résultats complémentaires ont montré que contrairement à ce que l'on peut observer dans les Tregs, TRIB1 est régulé par l'activation dans la lignée cellulaire T, les Jurkats tout comme FoxP3. De plus, on observe qu'au cours de cette activation l'expression de ces deux molécules est corrélée. En revanche, on peut voir que l'expression de TRIB2 ou TRIB3 n'est régulée par cette activation. Ces données nous indiquent qu'il existe peut-être un lien entre TRIB1 et FoxP3 dans les Jurkats. Cependant, le rôle que joue TRIB1 dans ces cellules est très probablement différent de celui qu'il joue dans les Tregs étant donné que l'activation module son expression.

De plus, nous avons également montré que la génération de souris TRIB1 KO non conditionnelle semble difficile et donc que le passage par le système cre-loxp apparaît être une bonne alternative afin d'empêcher la production de la molécule TRIB1. Je discuterai plus précisément de la stratégie que nous souhaitons adopter dans la partie « perspective ».

Enfin, nous avons montré qu'il existait de nombreux partenaires d'interaction de TRIB1 par la technique de levure double hybride, dont MALT1, STK40 et P4HA1. Ces interactions sont à confirmer mais nous ouvrent la porte sur de nombreuses études possibles que je vais partiellement développer dans la partie « perspectives ».

Discussion Générale

La transplantation d'organes est actuellement un traitement de choix afin de pallier la déficience d'un organe vital. L'utilisation de traitements immunosuppresseurs a permis d'améliorer la survie du greffon, cependant ces traitements ont également des effets néfastes chez le patient tels que des infections opportunistes, la toxicité au niveau rénal ou le développement de cancer... De plus ces traitements, bien qu'efficace dans les premier temps suivant la greffe n'ont malheureusement pas d'effet sur le rejet chronique humoral actif qui est actuellement un phénomène irréversible aboutissant à la perte du greffon et, dans le cadre de la transplantation rénale, au retour en dialyse du patient. La recherche translationnelle s'évertue donc à trouver de nouveaux biomarqueurs qui permettraient d'identifier les patients ayant un risque important de développer un rejet chronique humoral actif ainsi que les patients qui pourraient diminuer voir même arrêter leur traitement sans rejeter leur greffon c'est-à-dire les patients opérationnellement tolérants. De plus, la découverte de biomarqueurs du rejet chronique humoral actif pourrait éventuellement permettre d'adapter les traitements immunosuppresseurs avant les premiers signes de la maladie. Enfin, actuellement, dans le cadre de la transplantation rénale le diagnostique du RCHA se fait via la biopsie. Il serait intéressant de disposer de biomarqueurs moins invasifs tels que des biomarqueurs sanguin voir même urinaire.

L'étude sur les biomarqueurs que j'ai réalisée au cours de ma thèse nous a permis d'identifier plusieurs biomarqueurs sanguins qui sont différentiellement exprimés chez les patients en RCHA : il s'agit de TRIB1, GrzB, TLR4 et PSMB10. Ces biomarqueurs nous permettent de mieux comprendre les mécanismes intervenant aux cours du RCHA. En effet, TRIB1 est augmenté dans le RCHA, dans les cellules endothéliales activées et dans les CPA activés, ce qui laisse suggérer que le RCHA est peut-être en partie dû aux cellules endothéliales et aux CPA activés. En ce qui concerne GrzB, nous avons montré que cette molécule est augmentée dans le greffon mais diminuée dans le sang de patients en RCHA en comparaison à d'autres types de dysfonctions chroniques d'origine non-immunes, nous indiquant qu'il est possible que les cellules cytotoxiques produisant cette protéase quittent le flux sanguin pour s'accumuler au niveau du greffon et ainsi participer à sa destruction . Nous avons également montré que la molécule TLR4 est augmentée chez les patients en RCHA laissant penser qu'une composante de l'immunité innée pourrait peut-être intervenir dans ce type de rejet. Enfin, nous avons montré qu'une des sous-unités de l'immunoprotéasome, PSMB10 est également augmentée chez les patients en RCHA. Cette dernière donnée suggère que le protéasome à un rôle à jouer lors de ce type de rejet, ce qui est confirmé à l'utilisation

d'inhibiteur du protéasome qui semble améliorer les lésions chroniques du greffon chez l'animal.

Ainsi, tous ces biomarqueurs donnent un bon nombre d'indications quant aux événements possibles qui interviennent dans le rejet chronique humoral actif. Ces études ont également mis en évidence l'importance de divers facteurs qui peuvent influencer les valeurs mesurées pour ces molécules. Ces facteurs peuvent être des données démographiques comme l'âge du receveur ou du donneur de greffe, le poids du greffon, mais également des facteurs cliniques comme le traitement utilisé et le temps post-transplantation. Ces biomarqueurs ayant un profil particulier chez les patients en RCHA nous indiquent également qu'ils pourraient peut-être constituer des cibles thérapeutiques afin de diminuer les lésions chroniques aboutissant à la perte du greffon.

En ce qui concerne la molécule TRIB1, chez l'individu sain, le taux de TRIB1 est élevé dans les Tregs en comparaison aux lymphocytes T CD4+CD25-, en revanche lorsque l'on analyse les lymphocytes T régulateurs chez les patients en RCHA, il semblerait que cette molécule soit nettement diminuée. De plus, nous avons montré que la molécule TRIB1 interagissait avec la molécule FoxP3 qui confère les capacités suppressives aux Tregs. Or il a été décrit que la molécule TRIB1 intervenait dans la prolifération cellulaire. On peut donc penser qu'au cours du RCHA, l'interaction TRIB1-FoxP3 induit une diminution de l'expression de TRIB1 par un phénomène de rétrocontrôle négatif. Cette diminution de TRIB1 engendre une diminution de la prolifération des Tregs ce qui explique les observations faites auparavant qui montrent une diminution de Tregs chez les patients en RCHA. De plus nous avons également montré qu'il y avait une diminution de FoxP3 dans les Tregs au cours de ce RCHA qui pourrait peut être expliquer l'orientation des cellules vers un profil Th2 qui est un profil d'immunité humorale. Cependant, on ne peut pas exclure que la diminution de TRIB1 et de FoxP3 soit liée aux traitements immunosuppresseurs.

En conclusion, nous avons identifié plusieurs molécules différenciellement exprimées chez les patients en rejet chronique humoral actif qui nous permettent de mieux comprendre les mécanismes de ce rejet mais également d'identifier des cibles thérapeutiques pour ce type de rejet qui est actuellement irréversible.

Perspectives

I. Etude de TRIB1 dans les Tregs de patients transplantés rénaux

Un point qui nécessite d'être étudié à la suite de cette première étude est l'expression de TRIB1 dans les lymphocytes T régulateurs. En effet, actuellement, le nombre d'échantillons n'est pas assez important afin de pouvoir en tirer de véritables conclusions. Ainsi, nous sommes en cours de recrutement de patients transplantés avec une fonction stable de leur greffon mais également de patients avec un RCHA et des HV. Nous souhaitons isoler les Tregs et les lymphocytes T CD4+CD25- à partir du sang de ces patients afin mesurer l'expression de TRIB1 et de Foxp3 pour confirmer ou non les résultats préliminaires que nous avons préalablement obtenus, à savoir une diminution de l'expression de TRIB1 et FoxP3 dans les Tregs des patients avec un RCHA.

II. Etude du rôle de TRIB1 dans les Tregs

1. Etude de TRIB1 dans les Tregs de souris *in vitro*

Nous avons précédemment montré que l'expression de TRIB1 est augmentée dans les Tregs de souris en comparaison au LT CD4+CD25-. Ainsi, nous allons étudier l'impact de l'absence de TRIB1 dans la fonction des Tregs. Parallèlement, nous allons également utiliser des souris sauvages avec lesquelles nous souhaitons isoler les Tregs et sur-exprimer TRIB1.

a. Sous-expression de TRIB1 dans les Tregs issus des souris cKO

Pour cette première étude, nous souhaitons isoler des Tregs des souris cKO que j'ai précédemment décrites dans la partie « résultats ». Dans ces cellules, l'exon 2 du gène TRIB1 est situé entre deux séquences loxp, il est donc nécessaire d'utiliser une CRE recombinase afin d'exciser cet exon pour inactiver le gène. Les techniques de transfection des Tregs étant assez peu efficaces, nous souhaitons utiliser un lentivirus contenant un plasmide bien spécifique afin d'infecter les Tregs. Le plasmide qui va être intégré dans le lentivirus contient le gène de la CRE recombinase sous le contrôle d'un premier promoteur et le gène de la GFP sous le contrôle d'un deuxième promoteur (carte du plasmide figure 23). Ainsi lors de

l'infection des Tregs par ce lentivirus, la protéine CRE va induire la sous-expression de TRIB1 et en même temps, nous allons pouvoir identifier les cellules infectées grâce à l'expression de la GFP, ce qui va nous permettre également de pouvoir trier ces cellules par cytométrie en flux.

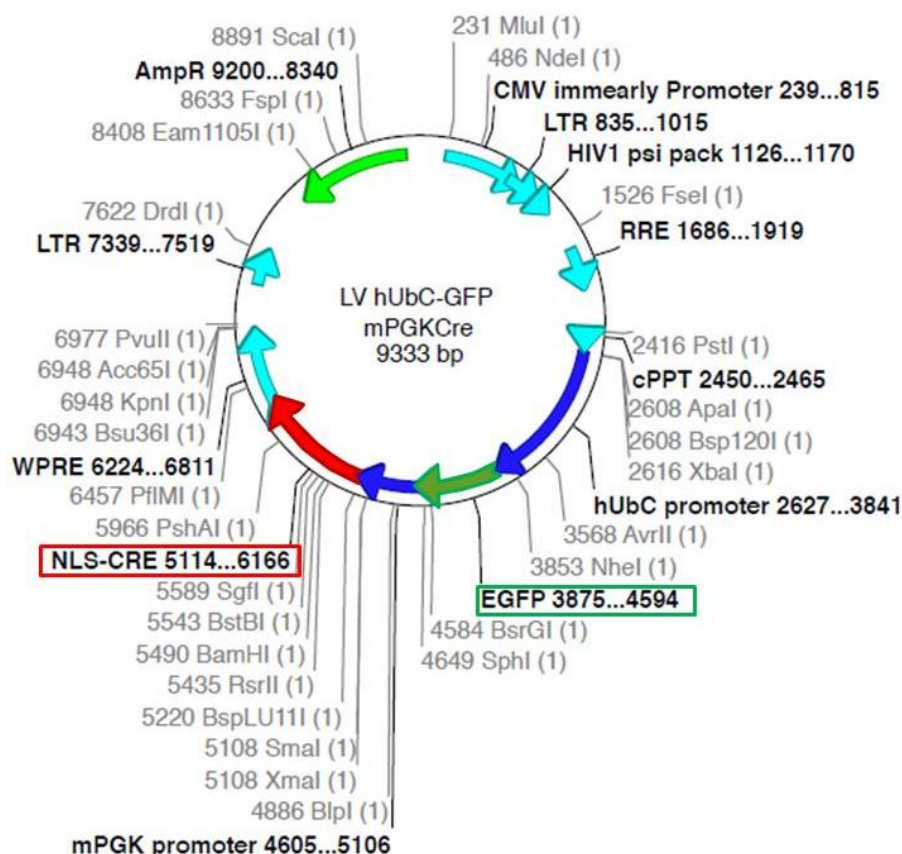


Figure 23: Carte du plasmide CRE-GFP

En bleu foncé, les promoteurs ; en vert le gène de la GFP ; en rouge le gène de la CRE recombinase

Une fois que les cellules seront infectées, nous allons réaliser des tests de prolifération mais également des tests de suppression.

Pour le test de prolifération, nous allons marquer nos cellules avec du CellTrace violet (Invitrogen) puis les déposer en plaque 96 puits pré-coater avec un anticorps anti-CD3. Nous allons également ajouter au milieu de culture un anticorps anti-CD28 et de l'IL-2 afin de stimuler la prolifération. Ainsi, si TRIB1 joue un rôle sur la prolifération des Tregs, nous devons donc observer une modification du taux de prolifération en l'absence de cette molécule.

Pour le test de suppression, nous allons déposer nos cellules infectées dans une plaque 96 puits pré-coater avec un anticorps anti-CD3 auxquels on va ajouter des lymphocytes T CD4+CD25- marqués avec du CellTrace violet (Invitrogen) et des anticorps anti-CD28. Ainsi nous allons pouvoir observer si TRIB1 joue un rôle dans les capacités suppressives des Tregs en analysant la prolifération des cibles des Tregs c'est-à-dire les T CD4+CD25-.

b. Sur-expression de TRIB1 dans Tregs et non-Tregs issus de souris sauvages

Dans un deuxième temps, nous allons analyser de rôle des TRIB1 dans la prolifération et la suppression en réalisant les mêmes types de tests. En revanche, les cellules seront infectées avec un lentivirus contenant un autre plasmide. Le plasmide utilisé sera un plasmide P2A. Dans ce plasmide, le gène TRIB1 sera inséré suivi du gène de la GFP. Les deux molécules seront sous le contrôle du même promoteur. Entre les deux gènes il y aura un peptide P2A. L'intérêt de ce plasmide est que les cellules infectées vont être identifiables grâce à la GFP. De plus, la GFP étant une protéine assez grosse, elle peut empêcher la protéine TRIB1 de fonctionner correctement d'où l'intérêt du peptide P2A qui va être clivé par la machinerie lentivirale et ainsi séparer TRIB1 de la GFP (Carte du plasmide figure 24). Par cette technique nous aurons donc les deux protéines exprimées dans les mêmes cellules mais sans qu'elles n'interfèrent l'une avec l'autre.

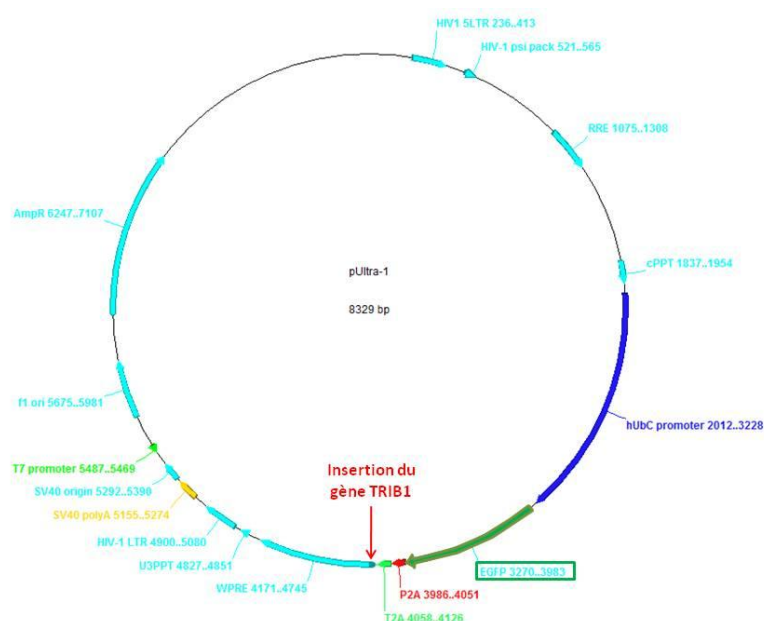


Figure 24: carte du plasmide P2A

En vert foncé gène de la GFP; en rouge peptide P2A ; insertion du gène TRIB1 après le peptide P2A

Nous souhaitons donc infecter des lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ avec ce lentivirus et ensuite réaliser des tests de prolifération mais également des tests de suppression afin de voir si ces cellules acquièrent des propriétés suppressives via l'expression TRIB1.

Nous souhaitons également infecter des Tregs avec ce lentivirus afin de sur-exprimer de manière importante l'expression de TRIB1 et ainsi voir si la prolifération et la suppression de ces cellules en sont modifiées.

2. Etude de TRIB1 dans les lymphocytes T *in vivo*

Dans un deuxième temps nous souhaitons étudier le rôle de TRIB1 dans les lymphocytes T CD4⁺. Pour cela, nous allons utiliser nos souris cKO pour TRIB1 que nous allons croiser avec des souris CRE dont le gène de la CRE recombinase est sous le contrôle d'un promoteur spécifique des lymphocytes T CD4⁺ et qui est inductible par le tamoxifène. L'intérêt de l'induction par le tamoxifène est que l'on peut éteindre l'expression de TRIB1 au moment souhaité. En effet, il a été décrit que les souris TRIB1 KO ne se reproduisent pas. Il est donc nécessaire de ne pas éliminer TRIB1 au cours du développement embryonnaire mais plus tard, après la naissance. L'élimination de TRIB1 chez ces souris va nous indiquer si cette molécule joue un rôle dans la prolifération ou dans la suppression en observant l'apparition ou non de pathologies lymphoprolifératives.

Il existe également des souris CRE dont l'expression de la CRE recombinase est sous le contrôle du promoteur de Foxp3. Cependant ces souris ne sont pas encore disponibles. Nous prévoyons tout de même de croiser nos souris cKO avec ces souris CRE afin de supprimer l'expression de TRIB1 spécifiquement dans les Tregs. Ainsi nous pourrions évaluer le rôle de cette molécule au sein de ces cellules régulatrices indispensables dans le contrôle de l'immunité.

III. Etude des molécules interagissant avec TRIB1

Une dernière perspective pour ce projet est d'explorer les interactions décrites par le système de levure double-hybrides.

Nous souhaitons tout d'abord nous focaliser sur la molécule MALT1, étant donné son implication dans le cancer et plus particulièrement dans le lymphome de MALT (Mucosa-associated lymphoid tissue). En effet, ces molécules semblent jouer toutes deux un rôle dans les cancers des cellules sanguines.

Dans un premier temps nous allons analyser le profil d'expression de MALT1 dans divers types cellulaires après activation ou non. Par la suite, nous allons confirmer, par PCA, l'interaction TRIB1-MALT1 dans des lignées cellulaires adhérentes humaines. Ensuite, nous analyserons l'interaction TRIB1-MALT1 dans des cellules primaires où les deux molécules sont fortement exprimées. Enfin, si l'interaction est confirmée, il faudra déterminer le rôle de cette interaction dans ce type cellulaire.

Le même type d'analyses devra également être réalisé pour les deux autres molécules découvertes par le système de levure double-hybrides.

Bibliographie

- Aerts, N.E. et al., 2008. Activated T cells complicate the identification of regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Cellular Immunology*, 251(2), p.109–115.
- Agarwal, S. et al., 2009. Inhibition of 12-LOX and COX-2 reduces the proliferation of human epidermoid carcinoma cells (A431) by modulating the ERK and PI3K-Akt signalling pathways. *Experimental Dermatology*, 18(11), p.939–946.
- Akl, A. et al., 2008. An investigation to assess the potential of CD25^{high}CD4⁺ T cells to regulate responses to donor alloantigens in clinically stable renal transplant recipients. *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*, 21(1), p.65–73.
- Akl, A., Luo, S. & Wood, K.J., 2005. Induction of transplantation tolerance-the potential of regulatory T cells. *Transplant Immunology*, 14(3-4), p.225–230.
- Al-Lamki, R.S., Bradley, J.R. & Pober, Jordan S, 2008. Endothelial cells in allograft rejection. *Transplantation*, 86(10), p.1340–1348.
- Allan, S.E. et al., 2007. Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production. *International Immunology*, 19(4), p.345–354.
- Allen, G. et al., 2009. Rapid accommodation of an A1 renal allograft after preconditioning for ABO-incompatible transplantation. *Contributions to Nephrology*, 162, p.35–46.
- Altucci, L. et al., 2007. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 6(10), p.793–810.
- Alvarez, C.M. et al., 2009. Expression of regulatory T-cell-related molecule genes and clinical outcome in kidney transplant recipients. *Transplantation*, 87(6), p.857–863.
- Anglicheau, D. & Suthanthiran, M., 2008. Noninvasive prediction of organ graft rejection and outcome using gene expression patterns. *Transplantation*, 86(2), p.192–199.
- Annacker, O. et al., 2001. CD25⁺ CD4⁺ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 166(5), p.3008–3018.
- Argiropoulos, B. et al., 2008. Linkage of Meis1 leukemogenic activity to multiple downstream effectors including Trib2 and Ccl3. *Experimental Hematology*, 36(7), p.845–859.
- Ashton-Chess, J. et al., 2010. Immunoproteasome beta subunit 10 is increased in chronic antibody-mediated rejection. *Kidney International*, 77(10), p.880–890.
- Ashton-Chess, J. et al., 2008. Tribbles-1 as a novel biomarker of chronic antibody-mediated rejection. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 19(6), p.1116–1127.
- Atkinson, A.J. et al., 2001. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 69(3), p.89–95.
- Auchincloss, H., Jr et al., 1993. The role of « indirect » recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(8), p.3373–3377.
- Baeten, D. et al., 2006. Phenotypically and functionally distinct CD8⁺ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 17(1), p.294–304.
- Baker, R.J. et al., 2001. Loss of direct and maintenance of indirect alloresponses in renal allograft recipients: implications for the pathogenesis of chronic allograft nephropathy.

- Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 167(12), p.7199–7206.
- Bardel, E. et al., 2008. Human CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells do not constitutively express IL-35. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 181(10), p.6898–6905.
- Barton-Burke, M. et al., 2008. Graft-versus-host disease: a complex long-term side effect of hematopoietic stem cell transplant. *Oncology* (Williston Park, N.Y.), 22(11 Suppl Nurse Ed), p.31–45.
- Bashuda, H. et al., 2005. Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates. *The Journal of Clinical Investigation*, 115(7), p.1896–1902.
- Battaglia, M., Stabilini, A., Draghici, E., et al., 2006. Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance. *Diabetes*, 55(1), p.40–49.
- Battaglia, M., Stabilini, A., Migliavacca, B., et al., 2006. Rapamycin promotes expansion of functional CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells of both healthy subjects and type 1 diabetic patients. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 177(12), p.8338–8347.
- Bendelac, A. et al., 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annual Review of Immunology*, 15, p.535–562.
- Benham, A.M., Sawyer, G.J. & Fabre, J.W., 1995. Indirect T cell allorecognition of donor antigens contributes to the rejection of vascularized kidney allografts. *Transplantation*, 59(7), p.1028–1032.
- Bestard, O. et al., 2007. Achieving donor-specific hyporesponsiveness is associated with FOXP3⁺ regulatory T cell recruitment in human renal allograft infiltrates. *Journal of Immunology* (Baltimore, Md.: 1950), 179(7), p.4901–4909.
- Bettelli, E., Dastrange, M. & Oukka, M., 2005. Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF-kappa B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(14), p.5138–5143.
- Bi, X. et al., 2008. Overexpression of TRB3 gene in adipose tissue of rats with high fructose-induced metabolic syndrome. *Endocrine Journal*, 55(4), p.747–752.
- Billingham, R.E., BRENT, L. & MEDAWAR, P.B., 1953. Actively acquired tolerance of foreign cells. *Nature*, 172(4379), p.603–606.
- Bisoffi, M. et al., 2004. Expression profiles of androgen independent bone metastatic prostate cancer cells indicate up-regulation of the putative serine-threonine kinase GS3955. *The Journal of Urology*, 172(3), p.1145–1150.
- Blair, P.A. et al., 2010. CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*, 32(1), p.129–140.
- Bogdan, C. et al., 1992. Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *The Journal of Biological Chemistry*, 267(32), p.23301–23308.
- Boissonnas, A. et al., 2010. Foxp3⁺ T cells induce perforin-dependent dendritic cell death in tumor-draining lymph nodes. *Immunity*, 32(2), p.266–278.
- Bopp, T. et al., 2007. Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(6), p.1303–1310.

- Borsellino, G. et al., 2007. Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression. *Blood*, 110(4), p.1225–1232.
- Bowers, A.J., Scully, S. & Boylan, J.F., 2003. SKIP3, a novel Drosophila tribbles ortholog, is overexpressed in human tumors and is regulated by hypoxia. *Oncogene*, 22(18), p.2823–2835.
- Braud, C. et al., 2008. Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: Part I. Blood gene expression statistical analysis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103(6), p.1681–1692.
- Braudeau, C. et al., 2008. Contrasted blood and intragraft toll-like receptor 4 mRNA profiles in operational tolerance versus chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation*, 86(1), p.130–136.
- Braudeau, C. et al., 2007. Variation in numbers of CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transplant International: Official Journal of the European Society for Organ Transplantation*, 20(10), p.845–855.
- Brenner, M.B. et al., 1986. Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature*, 322(6075), p.145–149.
- Brouard, S., Mansfield, E., Braud, C., Li, Li, Giral, M., Hsieh, S., Baeten, D., Zhang, M., Ashton-Chess, J., Braudeau, C., Hsieh, F., et al., 2007. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), p.15448–15453.
- Brouard, S., Mansfield, E., Braud, C., Li, Li, Giral, M., Hsieh, S., Baeten, D., Zhang, M., Ashton-Chess, J., Braudeau, C., Hsieh, F., et al., 2007. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(39), p.15448–15453.
- Burkhardt, R. et al., 2010. Trib1 is a lipid- and myocardial infarction-associated gene that regulates hepatic lipogenesis and VLDL production in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(12), p.4410–4414.
- Butcher, J.A. et al., 1999. Renal transplantation for end-stage renal disease following bone marrow transplantation: a report of six cases, with and without immunosuppression. *Clinical Transplantation*, 13(4), p.330–335.
- Campbell, D.J. & Koch, M.A., 2011. Phenotypical and functional specialization of FOXP3⁺ regulatory T cells. *Nature Reviews. Immunology*, 11(2), p.119–130.
- Carraro, V. et al., 2010. Amino acid availability controls TRB3 transcription in liver through the GCN2/eIF2 α /ATF4 pathway. *PloS One*, 5(12), p.e15716.
- Cavanillas, M.L. et al., 2011. Replication of top markers of a genome-wide association study in multiple sclerosis in Spain. *Genes and Immunity*, 12(2), p.110–115.
- Chambers, J.C. et al., 2011. Genome-wide association study identifies loci influencing concentrations of liver enzymes in plasma. *Nature Genetics*, 43(11), p.1131–1138.
- Chaturvedi, V. et al., 2011. Cutting edge: Human regulatory T cells require IL-35 to mediate suppression and infectious tolerance. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 186(12), p.6661–6666.
- Chen, L. et al., 2006. Human prolyl-4-hydroxylase α (I) transcription is mediated by upstream stimulatory factors. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(16), p.10849–10855.

- Chen, W. et al., 2003. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(12), p.1875–1886.
- Chen, Y., Inobe, J. & Weiner, H.L., 1995. Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4⁺ and CD8⁺ cells mediate active suppression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 155(2), p.910–916.
- Cheng, O. et al., 2006. Connective tissue growth factor is a biomarker and mediator of kidney allograft fibrosis. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 6(10), p.2292–2306.
- Cohen, D. et al., 2012. Pros and cons for C4d as a biomarker. *Kidney International*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22297669> [Consulté février 5, 2012].
- Collins, T. et al., 1984. Immune interferon activates multiple class II major histocompatibility complex genes and the associated invariant chain gene in human endothelial cells and dermal fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 81(15), p.4917–4921.
- Collison, L.W. et al., 2007. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*, 450(7169), p.566–569.
- Colvin, R.B. & Smith, R Neal, 2005. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nature Reviews. Immunology*, 5(10), p.807–817.
- Crocker, B.P. et al., 1996. Macrophages and chronic renal allograft nephropathy. *Kidney International. Supplement*, 57, p.S42–49.
- Cvetkovic-Lopes, V. et al., 2010. Elevated Tribbles homolog 2-specific antibody levels in narcolepsy patients. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(3), p.713–719.
- Danger, R. et al., 2012. Upregulation of miR-142-3p in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Operationally Tolerant Patients with a Renal Transplant. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22282590> [Consulté février 11, 2012].
- Dantal, J. et al., 1998. Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. *Lancet*, 351(9103), p.623–628.
- Dedhia, P.H. et al., 2010. Differential ability of Tribbles family members to promote degradation of C/EBPalpha and induce acute myelogenous leukemia. *Blood*, 116(8), p.1321–1328.
- Deng, J. et al., 2009. Human tribbles homologue 2 is expressed in unstable regions of carotid plaques and regulates macrophage IL-10 in vitro. *Clinical Science (London, England: 1979)*, 116(3), p.241–248.
- Ding, J., Kato, S. & Du, K., 2008. PI3K activates negative and positive signals to regulate TRB3 expression in hepatic cells. *Experimental Cell Research*, 314(7), p.1566–1574.
- Donauer, J. et al., 2003. Expression profiling on chronically rejected transplant kidneys. *Transplantation*, 76(3), p.539–547.
- Du, J. et al., 2008. Isoform-specific inhibition of ROR alpha-mediated transcriptional activation by human FOXP3. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(7), p.4785–4792.
- Du, K. et al., 2003. TRB3: a tribbles homolog that inhibits Akt/PKB activation by insulin in liver. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5625), p.1574–1577.

- Du, K. & Ding, J., 2009. Insulin regulates TRB3 and other stress-responsive gene expression through induction of C/EBP β . *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 23(4), p.475–485.
- Eder, K. et al., 2008. Tribbles-2 is a novel regulator of inflammatory activation of monocytes. *International Immunology*, 20(12), p.1543–1550.
- Edgar, B.A., Lehman, D.A. & O'Farrell, P.H., 1994. Transcriptional regulation of string (cdc25): a link between developmental programming and the cell cycle. *Development (Cambridge, England)*, 120(11), p.3131–3143.
- Everly, M.J. et al., 2008. Bortezomib provides effective therapy for antibody- and cell-mediated acute rejection. *Transplantation*, 86(12), p.1754–1761.
- Fallarino, F. et al., 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature Immunology*, 4(12), p.1206–1212.
- Fangmann, J., Dalchau, R. & Fabre, J.W., 1992. Rejection of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides. *The Journal of Experimental Medicine*, 175(6), p.1521–1529.
- Flechner, S.M. et al., 2004. De novo kidney transplantation without use of calcineurin inhibitors preserves renal structure and function at two years. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 4(11), p.1776–1785.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Gavin, M.A., et al., 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nature Immunology*, 6(11), p.1142–1151.
- Fontenot, J.D., Rasmussen, J.P., Williams, L.M., et al., 2005. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*, 22(3), p.329–341.
- Fourtounas, C. et al., 2010. Different immunosuppressive combinations on T-cell regulation in renal transplant recipients. *American Journal of Nephrology*, 32(1), p.1–9.
- Freemantle, S.J., Spinella, M.J. & Dmitrovsky, E., 2003. Retinoids in cancer therapy and chemoprevention: promise meets resistance. *Oncogene*, 22(47), p.7305–7315.
- Frey, A.B. & Rao, T.D., 1999. NKT cell cytokine imbalance in murine diabetes mellitus. *Autoimmunity*, 29(3), p.201–214.
- Garcia-Rios, A. et al., 2011. Polymorphism at the TRIB1 gene modulates plasma lipid levels: insight from the Spanish familial hypercholesterolemia cohort study. *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 21(12), p.957–963.
- Garín, M.I. et al., 2007. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*, 109(5), p.2058–2065.
- Gershon, R.K. & Kondo, K., 1970. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 18(5), p.723–737.
- Ghiringhelli, F. et al., 2005. CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor- β -dependent manner. *The Journal of Experimental Medicine*, 202(8), p.1075–1085.
- Gilby, D.C. et al., 2010. Tribbles-1 and -2 are tumour suppressors, down-regulated in human acute myeloid leukaemia. *Immunology Letters*, 130(1–2), p.115–124.
- Giral, M., Martinez, F., et al., 2010. Atlas de néphropathologie du transplant. *Novartis*.
- Giral, M., Foucher, Y., et al., 2010. Kidney and recipient weight incompatibility reduces long-term graft survival. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 21(6), p.1022–1029.
- Giral-Classe, M. et al., 1998. Delayed graft function of more than six days strongly decreases

- long-term survival of transplanted kidneys. *Kidney International*, 54(3), p.972–978.
- Goh, A.M., Coffill, C.R. & Lane, D.P., 2011. The role of mutant p53 in human cancer. *The Journal of Pathology*, 223(2), p.116–126.
- Gondek, D.C. et al., 2005. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 174(4), p.1783–1786.
- Good, M.C., Zalatan, J.G. & Lim, W.A., 2011. Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science (New York, N.Y.)*, 332(6030), p.680–686.
- Grandinetti, K.B. et al., 2011. Overexpression of TRIB2 in human lung cancers contributes to tumorigenesis through downregulation of C/EBP α . *Oncogene*, 30(30), p.3328–3335.
- Grazia, T.J. et al., 2010. Acute cardiac allograft rejection by directly cytotoxic CD4 T cells: parallel requirements for Fas and perforin. *Transplantation*, 89(1), p.33–39.
- Green, E.A. et al., 2003. CD4+CD25+ T regulatory cells control anti-islet CD8+ T cells through TGF-beta-TGF-beta receptor interactions in type 1 diabetes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(19), p.10878–10883.
- Grimm, P.C. et al., 2001. Neointimal and tubulointerstitial infiltration by recipient mesenchymal cells in chronic renal-allograft rejection. *The New England Journal of Medicine*, 345(2), p.93–97.
- Grosshans, J. & Wieschaus, E., 2000. A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell*, 101(5), p.523–531.
- Grossman, W.J. et al., 2004. Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood*, 104(9), p.2840–2848.
- Groux, H. et al., 1997. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389(6652), p.737–742.
- Haiqi, H., Yong, Z. & Yi, L., 2011. Transcriptional regulation of Foxp3 in regulatory T cells. *Immunobiology*, 216(6), p.678–685.
- Hansmann, L. et al., 2012. Dominant Th2 Differentiation of Human Regulatory T Cells upon Loss of FOXP3 Expression. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 188(3), p.1275–1282.
- Hashimoto, Y. & Shudo, K., 1991. Retinoids and their nuclear receptors. *Cell Biology Reviews: CBR*, 25(3), p.209–230, 233–235.
- Hegedus, Z., Czibula, A. & Kiss-Toth, E., 2007. Tribbles: a family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function. *Cellular Signalling*, 19(2), p.238–250.
- Hegedus, Z., Czibula, A. & Kiss-Toth, E., 2006. Tribbles: novel regulators of cell function; evolutionary aspects. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 63(14), p.1632–1641.
- Hegele, R.A. et al., 2009. A polygenic basis for four classical Fredrickson hyperlipoproteinemia phenotypes that are characterized by hypertriglyceridemia. *Human Molecular Genetics*, 18(21), p.4189–4194.
- Hirano, T. et al., 2008. Genes encoded within 8q24 on the amplicon of a large extrachromosomal element are selectively repressed during the terminal differentiation of HL-60 cells. *Mutation Research*, 640(1-2), p.97–106.
- Hoffmann, S.C. et al., 2005. Functionally significant renal allograft rejection is defined by transcriptional criteria. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*,

- 5(3), p.573–581.
- Hori, S., Nomura, T. & Sakaguchi, Shimon, 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5609), p.1057–1061.
- Hotchkiss, H. et al., 2006. Differential expression of profibrotic and growth factors in chronic allograft nephropathy. *Transplantation*, 81(3), p.342–349.
- Hua, F. et al., 2011. TRB3 interacts with SMAD3 promoting tumor cell migration and invasion. *Journal of Cell Science*, 124(Pt 19), p.3235–3246.
- Huang, C.-T. et al., 2004. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity*, 21(4), p.503–513.
- Huang, J. et al., 2003. Identification of a novel serine/threonine kinase that inhibits TNF-induced NF-kappaB activation and p53-induced transcription. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 309(4), p.774–778.
- Huang, X.-P. et al., 2006. Negative implication of C-MYC as an amplification target in esophageal cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 165(1), p.20–24.
- Humphrey, R.K. et al., 2010. Mixed lineage kinase-3 stabilizes and functionally cooperates with TRIBBLES-3 to compromise mitochondrial integrity in cytokine-induced death of pancreatic beta cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(29), p.22426–22436.
- Imajo, M. & Nishida, E., 2010. Human Tribbles homolog 1 functions as a negative regulator of retinoic acid receptor. *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 15(10), p.1089–1097.
- Jacobsen, N. et al., 1994. Tolerance to an HLA-B,DR disparate kidney allograft after bone-marrow transplantation from same donor. *Lancet*, 343(8900), p.800.
- Jin, G. et al., 2007. Trib1 and Evi1 cooperate with Hoxa and Meis1 in myeloid leukemogenesis. *Blood*, 109(9), p.3998–4005.
- Jin, Y.-P. et al., 2002. Ligation of HLA class I molecules on endothelial cells induces phosphorylation of Src, paxillin, and focal adhesion kinase in an actin-dependent manner. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(11), p.5415–5423.
- Joffre, O. et al., 2008. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nature Medicine*, 14(1), p.88–92.
- Jousse, C. et al., 2007. TRB3 inhibits the transcriptional activation of stress-regulated genes by a negative feedback on the ATF4 pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(21), p.15851–15861.
- Kamath, A. et al., 2008. Double-minute MYC amplification and deletion of MTAP, CDKN2A, CDKN2B, and ELAVL2 in an acute myeloid leukemia characterized by oligonucleotide-array comparative genomic hybridization. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 183(2), p.117–120.
- Kapessidou, Y. et al., 2006. The replacement of graft endothelium by recipient-type cells conditions allograft rejection mediated by indirect pathway CD4+ T cells. *Transplantation*, 82(4), p.582–591.
- Kaplan, Bruce, Schold, J. & Meier-Kriesche, H.-U., 2003. Poor predictive value of serum creatinine for renal allograft loss. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 3(12), p.1560–1565.
- Karagiannidis, C. et al., 2004. Glucocorticoids upregulate FOXP3 expression and regulatory T cells in asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(6), p.1425–1433.
- Karim, M., Bushell, A.R. & Wood, K.J., 2002. Regulatory T cells in transplantation. *Current*

- Opinion in Immunology*, 14(5), p.584–591.
- Kathiresan, S. et al., 2008. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nature Genetics*, 40(2), p.189–197.
- Kawai, T. et al., 2008. HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *The New England Journal of Medicine*, 358(4), p.353–361.
- Kawashima, M. et al., 2010. Anti-Tribbles homolog 2 (TRIB2) autoantibodies in narcolepsy are associated with recent onset of cataplexy. *Sleep*, 33(7), p.869–874.
- Keeshan, K. et al., 2010. Transformation by Tribbles homolog 2 (Trib2) requires both the Trib2 kinase domain and COP1 binding. *Blood*, 116(23), p.4948–4957.
- Keeshan, K. et al., 2008. Tribbles homolog 2 (Trib2) and HoxA9 cooperate to accelerate acute myelogenous leukemia. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, 40(1), p.119–121.
- Keeshan, K. et al., 2006. Tribbles homolog 2 inactivates C/EBPalpha and causes acute myelogenous leukemia. *Cancer Cell*, 10(5), p.401–411.
- Kingsley, C.I. et al., 2002. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(3), p.1080–1086.
- Kirk, A.D. et al., 1997. CTLA4-Ig and anti-CD40 ligand prevent renal allograft rejection in primates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(16), p.8789–8794.
- Kissmeyer-Nielsen, F. et al., 1966. Hyperacute rejection of kidney allografts, associated with pre-existing humoral antibodies against donor cells. *Lancet*, 2(7465), p.662–665.
- Kiss-Toth, Endre et al., 2004. Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(41), p.42703–42708.
- Kobayashi, A. et al., 2012. Clinicopathological impacts of activated transcription factor c-Jun in peritubular capillary endothelial cells in chronic antibody-mediated rejection after kidney transplantation. *Clinical Nephrology*, 77(1), p.32–39.
- Koch, C.A., Khalpey, Z.I. & Platt, J.L., 2004. Accommodation: preventing injury in transplantation and disease. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(9), p.5143–5148.
- Kohei, N. et al., 2011. Chronic Antibody-Mediated Rejection Is Reduced by Targeting B-Cell Immunity During an Introductory Period. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22054413> [Consulté janvier 25, 2012].
- Kohm, A.P. et al., 2002. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(9), p.4712–4716.
- Kojima, A. & Prehn, R.T., 1981. Genetic susceptibility to post-thymectomy autoimmune diseases in mice. *Immunogenetics*, 14(1-2), p.15–27.
- Koop, K. et al., 2004. Differentiation between chronic rejection and chronic cyclosporine toxicity by analysis of renal cortical mRNA. *Kidney International*, 66(5), p.2038–2046.
- Kreisel, D., Krupnick, A.S., Balsara, K.R., et al., 2002. Mouse vascular endothelium activates CD8+ T lymphocytes in a B7-dependent fashion. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 169(11), p.6154–6161.

- Kreisel, D., Krupnick, A.S., Gelman, A.E., et al., 2002. Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8⁺ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition. *Nature Medicine*, 8(3), p.233–239.
- Kretschmer, K. et al., 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nature Immunology*, 6(12), p.1219–1227.
- Lakkis, F.G. et al., 2000. Immunologic « ignorance » of vascularized organ transplants in the absence of secondary lymphoid tissue. *Nature Medicine*, 6(6), p.686–688.
- Larsen, C P, Morris, P J & Austyn, J.M., 1990. Migration of dendritic leukocytes from cardiac allografts into host spleens. A novel pathway for initiation of rejection. *The Journal of Experimental Medicine*, 171(1), p.307–314.
- Larsen, Christian P et al., 2010. Belatacept-based regimens versus a cyclosporine A-based regimen in kidney transplant recipients: 2-year results from the BENEFIT and BENEFIT-EXT studies. *Transplantation*, 90(12), p.1528–1535.
- Lerut, J. & Sanchez-Fueyo, A., 2006. An appraisal of tolerance in liver transplantation. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 6(8), p.1774–1780.
- Levine, M.H. & Abt, P.L., 2011. Treatment options and strategies for antibody mediated rejection after renal transplantation. *Seminars in Immunology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21940179> [Consulté janvier 25, 2012].
- Lewinski, M.K. et al., 2006. Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS Pathogens*, 2(6), p.e60.
- Li, Li et al., 2011. Adiponectin upregulates prolyl-4-hydroxylase $\alpha 1$ expression in interleukin 6-stimulated human aortic smooth muscle cells by regulating ERK 1/2 and Sp1. *PloS One*, 6(7), p.e22819.
- Li, Lingjie et al., 2010. Stk40 links the pluripotency factor Oct4 to the Erk/MAPK pathway and controls extraembryonic endoderm differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(4), p.1402–1407.
- Li, M.O., Wan, Y.Y. & Flavell, R.A., 2007. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity*, 26(5), p.579–591.
- Li, X.C. & Turka, L.A., 2010. An update on regulatory T cells in transplant tolerance and rejection. *Nature Reviews. Nephrology*, 6(10), p.577–583.
- Li, Y. et al., 2008. The presence of Foxp3 expressing T cells within grafts of tolerant human liver transplant recipients. *Transplantation*, 86(12), p.1837–1843.
- Liang, B. et al., 2008. Regulatory T cells inhibit dendritic cells by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 180(9), p.5916–5926.
- Liew, C.W. et al., 2010. The pseudokinase tribbles homolog 3 interacts with ATF4 to negatively regulate insulin exocytosis in human and mouse beta cells. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(8), p.2876–2888.
- Lima, A.F. et al., 2009. Acute exercise reduces insulin resistance-induced TRB3 expression and amelioration of the hepatic production of glucose in the liver of diabetic mice. *Journal of Cellular Physiology*, 221(1), p.92–97.
- Liu, W. et al., 2006. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(7), p.1701–1711.

- Liu, Y. et al., 2010. Basiliximab or antithymocyte globulin for induction therapy in kidney transplantation: a meta-analysis. *Transplantation Proceedings*, 42(5), p.1667–1670.
- Liu, Z. et al., 1998. Specific suppression of T helper alloreactivity by allo-MHC class I-restricted CD8+CD28- T cells. *International Immunology*, 10(6), p.775–783.
- Locke, J.E. et al., 2009. The use of antibody to complement protein C5 for salvage treatment of severe antibody-mediated rejection. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 9(1), p.231–235.
- Louis, S. et al., 2006. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation*, 81(3), p.398–407.
- Loupy, A. et al., 2011. Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA). *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 11(1), p.56–65.
- Madsen, K.L., 2001. Inflammatory bowel disease: lessons from the IL-10 gene-deficient mouse. *Clinical and Investigative Medicine. Médecine Clinique Et Experimentale*, 24(5), p.250–257.
- Maeda, Y. et al., 2005. Critical role of host gammadelta T cells in experimental acute graft-versus-host disease. *Blood*, 106(2), p.749–755.
- Malek, T.R. et al., 2008. IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. *Journal of Clinical Immunology*, 28(6), p.635–639.
- Maluf, D.G. et al., 2008. Molecular pathways involved in loss of kidney graft function with tubular atrophy and interstitial fibrosis. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 14(5-6), p.276–285.
- Mannon, R.B., 2010. Immune monitoring and biomarkers to predict chronic allograft dysfunction. *Kidney International. Supplement*, (119), p.S59–65.
- Mannon, R.B., 2011. Macrophages: contributors to allograft dysfunction, repair, or innocent bystanders? *Current Opinion in Organ Transplantation*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22157320> [Consulté janvier 2, 2012].
- Mantel, P.-Y. et al., 2006. Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 176(6), p.3593–3602.
- Martínez-Llordella, M. et al., 2007. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 7(2), p.309–319.
- Mas, V. et al., 2007. Establishing the molecular pathways involved in chronic allograft nephropathy for testing new noninvasive diagnostic markers. *Transplantation*, 83(4), p.448–457.
- Mata, J. et al., 2000. Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell*, 101(5), p.511–522.
- Matos, A. et al., 2010. Acute exercise reverses TRB3 expression in the skeletal muscle and ameliorates whole body insulin sensitivity in diabetic mice. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 198(1), p.61–69.
- Mauiyyedi, S. & Colvin, R.B., 2002. Humoral rejection in kidney transplantation: new concepts in diagnosis and treatment. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 11(6), p.609–618.

- Mayumi-Matsuda, K. et al., 1999. Identification of a novel kinase-like gene induced during neuronal cell death. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 258(2), p.260–264.
- McHugh, R.S. et al., 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity*, 16(2), p.311–323.
- Meier-Kriesche, H.-U., Schold, J.D. & Kaplan, Bruce, 2004. Long-term renal allograft survival: have we made significant progress or is it time to rethink our analytic and therapeutic strategies? *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 4(8), p.1289–1295.
- Mengel, M. et al., 2012. Banff 2011 Meeting Report: New Concepts in Antibody-Mediated Rejection. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22300494> [Consulté février 20, 2012].
- Mombaerts, P. et al., 1993. Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature*, 365(6441), p.53–56.
- Montgomery, R.A. et al., 2011. Desensitization in HLA-incompatible kidney recipients and survival. *The New England Journal of Medicine*, 365(4), p.318–326.
- Moraes-Vieira, P.M.M. et al., 2012. GATA3 and a dominant regulatory gene expression profile discriminate operational tolerance in human transplantation. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 142(2), p.117–126.
- Morgan, M.E. et al., 2005. Expression of FOXP3 mRNA is not confined to CD4+CD25+ T regulatory cells in humans. *Human Immunology*, 66(1), p.13–20.
- Morris, Peter J, 2004. Transplantation--a medical miracle of the 20th century. *The New England Journal of Medicine*, 351(26), p.2678–2680.
- Mueller, B.U. & Pabst, T., 2006. C/EBPalpha and the pathophysiology of acute myeloid leukemia. *Current Opinion in Hematology*, 13(1), p.7–14.
- Muthukumar, T. et al., 2005. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *The New England Journal of Medicine*, 353(22), p.2342–2351.
- Myburgh, J.A. et al., 2001. Tolerance in baboon kidney transplantation with total lymphoid irradiation (TLI) and anti-CD3/CD4-idarubicin conjugates. *Transplantation*, 72(6), p.1150–1152.
- Myburgh, J.A. et al., 1980. Transplantation tolerance in primates following total lymphoid irradiation and allogeneic bone marrow injection. II. Renal allografts. *Transplantation*, 29(5), p.405–408.
- Nadazdin, O. et al., 2011. Contributions of direct and indirect alloresponses to chronic rejection of kidney allografts in nonhuman primates. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 187(9), p.4589–4597.
- Naiki, T. et al., 2007. TRB2, a mouse Tribbles ortholog, suppresses adipocyte differentiation by inhibiting AKT and C/EBPbeta. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(33), p.24075–24082.
- Nakamura, K. et al., 2004. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(2), p.834–842.
- Nankivell, B.J. et al., 2003. The natural history of chronic allograft nephropathy. *The New*

- England Journal of Medicine*, 349(24), p.2326–2333.
- Nankivell, B.J. & Kuypers, D.R.J., 2011. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet*, 378(9800), p.1428–1437.
- Oderup, C. et al., 2006. Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4⁺ CD25⁺ regulatory T-cell-mediated suppression. *Immunology*, 118(2), p.240–249.
- Ohoka, N. et al., 2005. TRB3, a novel ER stress-inducible gene, is induced via ATF4-CHOP pathway and is involved in cell death. *The EMBO Journal*, 24(6), p.1243–1255.
- Ono, M. et al., 2007. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature*, 446(7136), p.685–689.
- Opelz, G. & Döhler, B., 2008. Influence of time of rejection on long-term graft survival in renal transplantation. *Transplantation*, 85(5), p.661–666.
- Ord, D. & Ord, T., 2005. Characterization of human NIPK (TRB3, SKIP3) gene activation in stressful conditions. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(1), p.210–218.
- Ord, D. & Ord, T., 2003. Mouse NIPK interacts with ATF4 and affects its transcriptional activity. *Experimental Cell Research*, 286(2), p.308–320.
- Orlando, G. et al., 2010. Clinical operational tolerance after renal transplantation: current status and future challenges. *Annals of Surgery*, 252(6), p.915–928.
- Ostertag, A. et al., 2010. Control of adipose tissue inflammation through TRB1. *Diabetes*, 59(8), p.1991–2000.
- Pallier, A. et al., 2010. Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney International*, 78(5), p.503–513.
- Pandiyani, P. et al., 2007. CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells. *Nature Immunology*, 8(12), p.1353–1362.
- Paroni, G. et al., 2011. Synergistic antitumor activity of lapatinib and retinoids on a novel subtype of breast cancer with coamplification of ERBB2 and RARA. *Oncogene*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22056878> [Consulté janvier 31, 2012].
- Pascual, M. et al., 2002. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *The New England Journal of Medicine*, 346(8), p.580–590.
- Pelzl, S. et al., 2003. Evaluation of posttransplantation soluble CD30 for diagnosis of acute renal allograft rejection. *Transplantation*, 75(3), p.421–423.
- Pelzl, S. et al., 2002. Soluble CD30 as a predictor of kidney graft outcome. *Transplantation*, 73(1), p.3–6.
- Penhale, W.J. et al., 1973. Spontaneous thyroiditis in thymectomized and irradiated Wistar rats. *Clinical and Experimental Immunology*, 15(2), p.225–236.
- Pestana, J.O.M. et al., 2012. Three-Year Outcomes From BENEFIT-EXT: A Phase III Study of Belatacept Versus Cyclosporine in Recipients of Extended Criteria Donor Kidneys. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 12(3), p.630–639.
- Pietra, B.A. et al., 2000. CD4 T cell-mediated cardiac allograft rejection requires donor but not host MHC class II. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(8), p.1003–1010.
- Pober, J S & Cotran, R.S., 1990. The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation*, 50(4), p.537–544.

- Poirier, N. et al., 2010. Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation. *Science Translational Medicine*, 2(17), p.17ra10.
- Polanczyk, M.J. et al., 2004. Cutting edge: estrogen drives expansion of the CD4+CD25+ regulatory T cell compartment. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 173(4), p.2227–2230.
- Popov, I.A. et al., 1995. Direct evidence for in vivo induction of CD8+ cytotoxic T cells directed to donor MHC class I peptides following mouse allotransplantation. *Transplantation*, 60(12), p.1621–1624.
- Puiffe, M.-L. et al., 2007. Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 9(10), p.820–829.
- Puskas, L.G. et al., 2005. Gene profiling identifies genes specific for well-differentiated epithelial thyroid tumors. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 51(2), p.177–186.
- Qi, L. et al., 2006. TRB3 links the E3 ubiquitin ligase COP1 to lipid metabolism. *Science (New York, N.Y.)*, 312(5781), p.1763–1766.
- Racusen, L.C. et al., 2003. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 3(6), p.708–714.
- Raulet, D.H., 1994. T-cell immunity. How gamma delta T cells make a living. *Current Biology: CB*, 4(3), p.246–248.
- Read, S., Malmström, V. & Powrie, F., 2000. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 192(2), p.295–302.
- Rebeaud, F. et al., 2008. The proteolytic activity of the paracaspase MALT1 is key in T cell activation. *Nature Immunology*, 9(3), p.272–281.
- Ren, X. et al., 2007. Involvement of cellular death in TRAIL/DR5-dependent suppression induced by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *Cell Death and Differentiation*, 14(12), p.2076–2084.
- Riethmüller, S. et al., 2010. Donor-specific antibody levels and three generations of crossmatches to predict antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Transplantation*, 90(2), p.160–167.
- Rödder, S. et al., 2009. Renal allografts with IF/TA display distinct expression profiles of metzincins and related genes. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 9(3), p.517–526.
- Roitt, I.M. & Cooke, A., 1987. The role of autoantigen in autoimmunity. *Immunology Letters*, 16(3-4), p.259–263.
- Roncarolo, M.G. et al., 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunological Reviews*, 212, p.28–50.
- Rørth, P., Szabo, K. & Texido, G., 2000. The level of C/EBP protein is critical for cell migration during *Drosophila* oogenesis and is tightly controlled by regulated degradation. *Molecular Cell*, 6(1), p.23–30.
- Rosenberg, A.S. & Singer, A., 1988. Evidence that the effector mechanism of skin allograft

- rejection is antigen-specific. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(20), p.7739–7742.
- Röthlisberger, B. et al., 2007. TRIB1 overexpression in acute myeloid leukemia. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 176(1), p.58–60.
- Roussey-Kesler, G. et al., 2006. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 6(4), p.736–746.
- Rücker, F.G. et al., 2006. Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 24(24), p.3887–3894.
- Ruland, J. et al., 2003. Differential requirement for Malt1 in T and B cell antigen receptor signaling. *Immunity*, 19(5), p.749–758.
- Rzymiski, T. et al., 2008. Multiple pathways are involved in the anoxia response of SKIP3 including HuR-regulated RNA stability, NF-kappaB and ATF4. *Oncogene*, 27(33), p.4532–4543.
- Saadi, S. & Platt, J.L., 2002. Humoral rejection and endothelial cell activation, 2001. *Xenotransplantation*, 9(4), p.239–241.
- Safinia, N. et al., 2010. T-cell alloimmunity and chronic allograft dysfunction. *Kidney International. Supplement*, (119), p.S2–12.
- Sagoo, P. et al., 2011. Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells. *Science Translational Medicine*, 3(83), p.83ra42.
- Sakaguchi, S. et al., 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 155(3), p.1151–1164.
- Sakaguchi, Shimon, 2004. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 22, p.531–562.
- Salama, A.D. et al., 2003. Regulatory CD25⁺ T cells in human kidney transplant recipients. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 14(6), p.1643–1651.
- Salomon, B. et al., 2000. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, 12(4), p.431–440.
- Sánchez-Fueyo, A. et al., 2002. Tracking the immunoregulatory mechanisms active during allograft tolerance. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 168(5), p.2274–2281.
- Sarris, M. et al., 2008. Neuropilin-1 expression on regulatory T cells enhances their interactions with dendritic cells during antigen recognition. *Immunity*, 28(3), p.402–413.
- Scherer, A. et al., 2003. Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies. *Transplantation*, 75(8), p.1323–1330.
- Schwarzer, R. et al., 2006. TRB3 is a PI 3-kinase dependent indicator for nutrient starvation. *Cellular Signalling*, 18(6), p.899–909.
- Scian, M.J. et al., 2011. MicroRNA profiles in allograft tissues and paired urines associate

- with chronic allograft dysfunction with IF/TA. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 11(10), p.2110–2122.
- Seddiki, N. et al., 2006. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(7), p.1693–1700.
- Seher, T.C. & Leptin, M., 2000. Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation. *Current Biology: CB*, 10(11), p.623–629.
- Serra, P. et al., 2003. CD40 ligation releases immature dendritic cells from the control of regulatory CD4+CD25+ T cells. *Immunity*, 19(6), p.877–889.
- Sharma, V.K. et al., 1996. Molecular executors of cell death--differential intrarenal expression of Fas ligand, Fas, granzyme B, and perforin during acute and/or chronic rejection of human renal allografts. *Transplantation*, 62(12), p.1860–1866.
- Sharova, L.V. et al., 2009. Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 16(1), p.45–58.
- Simon, T. et al., 2003. Serial peripheral blood perforin and granzyme B gene expression measurements for prediction of acute rejection in kidney graft recipients. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 3(9), p.1121–1127.
- Singh, N., 2005. Infectious complications in organ transplant recipients with the use of calcineurin-inhibitor agent-based immunosuppressive regimens. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 18(4), p.342–345.
- Sis, B. et al., 2010. Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 10(3), p.464–471.
- Sis, B. et al., 2007. Transplant glomerulopathy, late antibody-mediated rejection and the ABCD tetrad in kidney allograft biopsies for cause. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 7(7), p.1743–1752.
- Sis, B., Kaplan, B & Halloran, P.F., 2006. Histologic findings from positive crossmatch or ABO-incompatible renal allografts: accommodation or chronic allograft injury? *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 6(8), p.1753–1754.
- Smith, J.D. et al., 2000. Activation of NF-kappa B in human endothelial cells induced by monoclonal and allospecific HLA antibodies. *International Immunology*, 12(4), p.563–571.
- Smith, R N et al., 2006. Chronic antibody mediated rejection of renal allografts: pathological, serological and immunologic features in nonhuman primates. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 6(8), p.1790–1798.
- Smith, R N et al., 2008. Four stages and lack of stable accommodation in chronic alloantibody-mediated renal allograft rejection in *Cynomolgus* monkeys. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation*

- and the American Society of Transplant Surgeons, 8(8), p.1662–1672.
- Solez, K. et al., 2007. Banff « 05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy (»CAN'). *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 7(3), p.518–526.
- Solez, K. et al., 2008. Banff 07 classification of renal allograft pathology: updates and future directions. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 8(4), p.753–760.
- Solez, K. et al., 1993. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney International*, 44(2), p.411–422.
- de Souza, A.W.S. et al., 2010. Immune system: part III. The delicate balance of the immune system between tolerance and autoimmunity. *Revista Brasileira De Reumatologia*, 50(6), p.665–679.
- Spivey, T.L. et al., 2011. Gene expression profiling in acute allograft rejection: challenging the immunologic constant of rejection hypothesis. *Journal of Translational Medicine*, 9, p.174.
- Steele, D.J. et al., 1996. Two levels of help for B cell alloantibody production. *The Journal of Experimental Medicine*, 183(2), p.699–703.
- Storlazzi, C.T. et al., 2004. Identification of a commonly amplified 4.3 Mb region with overexpression of C8FW, but not MYC in MYC-containing double minutes in myeloid malignancies. *Human Molecular Genetics*, 13(14), p.1479–1485.
- Storlazzi, C.T. et al., 2006. MYC-containing double minutes in hematologic malignancies: evidence in favor of the episome model and exclusion of MYC as the target gene. *Human Molecular Genetics*, 15(6), p.933–942.
- Strober, S. et al., 1989. Acquired immune tolerance to cadaveric renal allografts. A study of three patients treated with total lymphoid irradiation. *The New England Journal of Medicine*, 321(1), p.28–33.
- Strober, S. et al., 2000. Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: studies of chimerism and anti-donor reactivity. *Transplantation*, 69(8), p.1549–1554.
- Süsal, C. et al., 2011. Posttransplant sCD30 as a predictor of kidney graft outcome. *Transplantation*, 91(12), p.1364–1369.
- Süsal, C., Döhler, B. & Opelz, G., 2009. Presensitized kidney graft recipients with HLA class I and II antibodies are at increased risk for graft failure: a Collaborative Transplant Study report. *Human Immunology*, 70(8), p.569–573.
- Sung, H Y et al., 2006. Regulation of expression and signalling modulator function of mammalian tribbles is cell-type specific. *Immunology Letters*, 104(1-2), p.171–177.
- Sung, Hye Youn et al., 2007. Human tribbles-1 controls proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells via MAPK signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(25), p.18379–18387.
- Sykes, M. & Sachs, D.H., 1988. Mixed allogeneic chimerism as an approach to transplantation tolerance. *Immunology Today*, 9(1), p.23–27.
- Tang, K. et al., 2000. Identification of 12-lipoxygenase interaction with cellular proteins by yeast two-hybrid screening. *Biochemistry*, 39(12), p.3185–3191.

- Taylor, P.A., Noelle, R.J. & Blazar, B.R., 2001. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *The Journal of Experimental Medicine*, 193(11), p.1311–1318.
- Thaunat, O., 2011. Humoral immunity in chronic allograft rejection: Puzzle pieces come together. *Transplant Immunology*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22108536> [Consulté janvier 21, 2012].
- Thornton, A.M. & Shevach, E.M., 1998. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *The Journal of Experimental Medicine*, 188(2), p.287–296.
- Ti, Y. et al., 2011. TRB3 gene silencing alleviates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetic rat model. *Diabetes*, 60(11), p.2963–2974.
- Toyoda, H. et al., 2010. Anti-Tribbles homolog 2 autoantibodies in Japanese patients with narcolepsy. *Sleep*, 33(7), p.875–878.
- Vella, J.P. et al., 1997. Indirect allorecognition of major histocompatibility complex allopeptides in human renal transplant recipients with chronic graft dysfunction. *Transplantation*, 64(6), p.795–800.
- Veronese, F. et al., 2007. Pathological and clinical correlates of FOXP3+ cells in renal allografts during acute rejection. *American Journal of Transplantation: Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 7(4), p.914–922.
- Vieira, P.L. et al., 2004. IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 172(10), p.5986–5993.
- Vitale, G., Mion, F. & Pucillo, C., 2010. Regulatory B cells: evidence, developmental origin and population diversity. *Molecular Immunology*, 48(1-3), p.1–8.
- Walsh, R.C. et al., 2010. Proteasome inhibitor-based primary therapy for antibody-mediated renal allograft rejection. *Transplantation*, 89(3), p.277–284.
- Wang, H. et al., 2007. Inhibition of terminal complement components in presensitized transplant recipients prevents antibody-mediated rejection leading to long-term graft survival and accommodation. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 179(7), p.4451–4463.
- Wang, J. et al., 2008. Polygenic determinants of severe hypertriglyceridemia. *Human Molecular Genetics*, 17(18), p.2894–2899.
- Wei, S.-C. et al., 2012. Tribbles 2 (Trib2) is a novel regulator of toll-like receptor 5 signaling. *Inflammatory Bowel Diseases*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22271508> [Consulté février 1, 2012].
- Weiner, H.L., 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunological Reviews*, 182, p.207–214.
- Weissglas-Volkov, D. et al., 2010. Investigation of variants identified in caucasian genome-wide association studies for plasma high-density lipoprotein cholesterol and triglycerides levels in Mexican dyslipidemic study samples. *Circulation. Cardiovascular Genetics*, 3(1), p.31–38.
- Wells, A.D. et al., 1999. Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nature Medicine*, 5(11), p.1303–1307.
- Wilkin, F. et al., 1997. Characterization of a phosphoprotein whose mRNA is regulated by the mitogenic pathways in dog thyroid cells. *European Journal of Biochemistry / FEBS*,

- 248(3), p.660–668.
- Wilkin, F. et al., 1996. Identification and characterization of novel genes modulated in the thyroid of dogs treated with methimazole and propylthiouracil. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(45), p.28451–28457.
- Willer, C.J. et al., 2008. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nature Genetics*, 40(2), p.161–169.
- Williams, G.M. et al., 1968. « Hyperacute » renal-homograft rejection in man. *The New England Journal of Medicine*, 279(12), p.611–618.
- Wood, K.J. & Goto, R., 2012. Mechanisms of rejection: current perspectives. *Transplantation*, 93(1), p.1–10.
- Wood, K.J. & Sakaguchi, Shimon, 2003. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nature Reviews. Immunology*, 3(3), p.199–210.
- Workman, C.J. et al., 2009. The development and function of regulatory T cells. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 66(16), p.2603–2622.
- Wouters, B.J. et al., 2007. Distinct gene expression profiles of acute myeloid/T-lymphoid leukemia with silenced CEBPA and mutations in NOTCH1. *Blood*, 110(10), p.3706–3714.
- Woywodt, A. et al., 2003. Elevated numbers of circulating endothelial cells in renal transplant recipients. *Transplantation*, 76(1), p.1–4.
- Wyburn, K.R. et al., 2005. The role of macrophages in allograft rejection. *Transplantation*, 80(12), p.1641–1647.
- Xie, S. et al., 2012. Upregulation of TRB2 induced by miR-98 in the early lesions of large artery of type-2 diabetic rat. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 361(1-2), p.305–314.
- Xu, J. et al., 2007. TRB3 interacts with CtIP and is overexpressed in certain cancers. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1770(2), p.273–278.
- Yamamoto, M. et al., 2007. Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *The Journal of Experimental Medicine*, 204(9), p.2233–2239.
- Yang, J. et al., 2003. Targeting of macrophage activity by adenovirus-mediated intragraft overexpression of TNFRp55-Ig, IL-12p40, and vIL-10 ameliorates adenovirus-mediated chronic graft injury, whereas stimulation of macrophages by overexpression of IFN-gamma accelerates chronic graft injury in a rat renal allograft model. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 14(1), p.214–225.
- Yokoyama, T. et al., 2010. Trib1 links the MEK1/ERK pathway in myeloid leukemogenesis. *Blood*, 116(15), p.2768–2775.
- Yokoyama, T. & Nakamura, T., 2011. Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation. *Cancer Science*, 102(6), p.1115–1122.
- Zanella, F. et al., 2010. Human TRIB2 is a repressor of FOXO that contributes to the malignant phenotype of melanoma cells. *Oncogene*, 29(20), p.2973–2982.
- Zeiser, R. et al., 2006. Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood*, 108(1), p.390–399.
- Zhang, C. et al., 2007. TNF-alpha suppresses prolyl-4-hydroxylase alpha1 expression via the ASK1-JNK-NonO pathway. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(8), p.1760–1767.
- Zhang, J., Wen, H., et al., 2011. TRB3 overexpression due to endoplasmic reticulum stress inhibits AKT kinase activation of tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*,

- 47(10), p.934–939.
- Zhang, Y., Davis, J.L. & Li, W., 2005. Identification of tribbles homolog 2 as an autoantigen in autoimmune uveitis by phage display. *Molecular Immunology*, 42(11), p.1275–1281.
- Zhang, Z., Tao, L., et al., 2011. Association of genetic loci with blood lipids in the Chinese population. *PloS One*, 6(11), p.e27305.
- Zhang, Z.X. et al., 2000. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nature Medicine*, 6(7), p.782–789.
- Zheng, Y. et al., 2010. Role of conserved non-coding DNA elements in the Foxp3 gene in regulatory T-cell fate. *Nature*, 463(7282), p.808–812.
- Zhou, X. et al., 2009. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nature Immunology*, 10(9), p.1000–1007.
- Zou, T. et al., 2011. TRB3 mediates homocysteine-induced inhibition of endothelial cell proliferation. *Journal of Cellular Physiology*, 226(11), p.2782–2789.
- Zou, Y. et al., 2007. Antibodies against MICA antigens and kidney-transplant rejection. *The New England Journal of Medicine*, 357(13), p.1293–1300.

Annexes

Annexe 1

IMMUNOBIOLOGY AND GENOMICS

Contrasted Blood and Intragraft Toll-Like Receptor 4 mRNA Profiles in Operational Tolerance Versus Chronic Rejection in Kidney Transplant Recipients

Cécile Braudeau,¹ Joanna Ashton-Chess,¹ Magali Giral,¹ Emilie Dugast,¹ Stephanie Louis,¹ Annaick Pallier,¹ Christophe Braud,¹ Anne Moreau,² Karine Renaudin,² Jean-Paul Souillou,^{1,3} and Sophie Brouard¹

Background. Deciphering the mechanisms of tolerance and chronic rejection (CR) remains a major goal in transplantation. Data in rodents suggest that Toll-like receptors (TLR), regulators of innate immune responses, play a role in determining graft outcome. However, few studies have focused on TLR expression in human kidney transplant recipients.

Methods. Here, we analyzed the expression of TLR4 in peripheral blood mononuclear cells from kidney recipients with contrasted clinical situations: operational tolerance and CR, compared with patients with stable graft function, non-transplant patients with renal failure and healthy volunteers.

Results. We report that myeloid differentiation factor 88 and TLR4 are significantly contrasted in the peripheral blood mononuclear cells, and in particular in monocytes, of patients with CR versus operational tolerance. Chronic rejection patients have significantly increased TLR4 and myeloid differentiation factor 88 compared with operationally tolerant patients, who resemble healthy volunteers and nontransplant patients with renal failure. Interestingly, analysis of TLR4 transcripts in graft biopsies from patients with normal histology or CR reflected the blood findings, with a significant increase of TLR4 in CR.

Conclusions. These data support a link between TLR4 expression and long-term graft outcome. Moreover, whereas absence of TLR signaling may be a feature of tolerance, increased TLR4 signaling may be implicated in CR.

Keywords: Chronic rejection, Kidney, Tolerance, Toll-like receptor.

(*Transplantation* 2008;86: 130–136)

Achieving “true” allograft tolerance is a major goal in the field of transplantation and is the subject of intense research in rodent models. This goal remains elusive in the clinical setting. In humans, the less stringent term “operational tolerance” is used to describe patients displaying well-functioning grafts for several years in the absence of any immunosuppressive medication (1). Operational tolerance has been observed in 20% of patients after immunosuppressive drug withdrawal in liver recipients (2) and to a much lesser extent in kidney graft recipients (1). This is probably a robust “model” of regulation because most of the kidney graft recipients who stop their immunosup-

pressive therapy reject their grafts. However, even patients who maintain their immunosuppression can experience late deterioration of graft function associated with histologic signs of graft scarring.

Graft scarring is frequently manifested as interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA) (3), a term that implies nonspecific graft injury (3, 4). However, when associated with particular histological features, IF/TA can contribute to specific diagnoses. For example, IF/TA can contribute to the diagnosis of nonimmune-mediated graft damage because of chronic calcineurin inhibitor toxicity (5) or functional overload (6). Interstitial fibrosis and tubular atrophy can also contribute to the diagnosis of alloimmune-mediated graft injury, that is, true chronic rejection (CR), such as when it is associated with capillary-endothelial deposition of the complement split product C4d in the graft together with circulating anti-donor antibodies (Ab) (3, 4). This particular form of CR is referred to as “chronic active Ab-mediated rejection” (CAMR) (3). Other morphological features of CAMR include duplication or “double contours” in glomerular basement membranes, referred to as transplant glomerulopathy (TG). Transplant glomerulopathy must be associated with both C4d deposition and circulating antidonor antibodies for the

This work was supported in part by the Fondation Progreffe. The first two authors contributed equally.

¹ INSERM, U643; CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT; Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France.

² CHU Nantes, Service d'Anatomie Pathologique, Nantes, France.

³ Address correspondence to: Jean-Paul Souillou, M.D., INSERM U643, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01 France.

E-mail: Jean-Paul.Souillou@univ-nantes.fr

Received 30 January 2008. Revision requested 15 February 2008.

Accepted 1 April 2008.

Copyright © 2008 by Lippincott Williams & Wilkins

ISSN 0041-1337/08/8601-130

DOI: 10.1097/TP.0b013e31817b8dc5

130

Transplantation • Volume 86, Number 1, July 15, 2008

Copyright © Lippincott Williams & Wilkins. Unauthorized reproduction of this article is prohibited.

diagnosis of CAMR to apply. The underlying mechanisms of this type of CR require further elucidation if more effective immunosuppressive therapy is to be administered.

Over recent years, there has been heightened interest in a newly discovered family of receptors believed to play a crucial role in the innate immune system. This family, known as Toll-like receptors (TLR), are responsible for the transmission of various inflammatory signals (7), typically after recognition of bacterial carbohydrate motifs. Toll-like receptors are expressed in immunocompetent cells (dendritic cells, monocytes, B cells, and T cells) at different stages of differentiation and activation (8, 9). A recent study has reported that endogenous innate immune ligands may be involved in nonbacteria-related inflammation by means of activation of TLR4 (10).

Toll-like receptor-4 signaling triggers the cell to induce transcription of inflammatory factors, a process mediated through the myeloid differentiation factor 88 (MyD88)-dependent intracellular pathway (7). Despite the sentinel role of innate immunity in driving and shaping adaptive immunity (7), its implication in graft rejection or acceptance remains a relatively unexplored field, particularly in human transplant recipients. Data in mice suggest that absence of MyD88 signaling promotes graft acceptance (11, 12) and low TLR4 expression by liver dendritic cells has been suggested to contribute to the tolerogenic environment of this organ. Recently, data in mice suggest that TLR4 induction in β cells is involved in β cell death and graft rejection after islet transplantation (13). On the other hand, it has been shown that TLR4 activation mediates kidney ischemia-reperfusion injury (14).

However, another study demonstrated that MyD88 signaling was important for dendritic cell function and Th1 responses during fully major histocompatibility complex-mismatched solid-organ transplantation, although graft rejection occurred independently of MyD88 (15). In addition, Samstein et al. (16) showed in mice that the absence of TLR4 did not delay the rejection of major histocompatibility complex-mismatched skin allografts.

In humans, some evidence suggests that TLR4 may play a role in cardiac graft rejection (17). Moreover, patients with TLR4 polymorphisms are reported to present a lower risk of posttransplantation atherosclerotic events and acute allograft rejection (18, 19). However, there is yet no report on TLR4 expression in kidney transplantation. Here, we thus investigated TLR4 expression in operational tolerance and CR of kidney allografts in humans.

PATIENTS, MATERIALS, AND METHODS

Study Cohorts

All patients who participated in this study gave informed consent, and the study was approved by the University Hospital Ethical Committee and the Committee for the Protection of Patients from Biological Risks. The study was performed on 74 blood samples and 26 biopsies.

Peripheral Blood Mononuclear Cell Cohort

The peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cohort consisted of 74 patients and healthy individuals (HV) assigned to the following subgroups. The clinical and demographic characteristics as well as the time period between the

last infection and the blood sample collection are provided in Table 1. Of note, none of the patients presented with an infection in the month preceding the blood sample.

- i. Immunosuppressive drug-free operationally tolerant (Op-Tol) recipients (n=8): operationally tolerant recipients were patients with a stable kidney graft function (blood creatinemia $<150 \mu\text{mol/L}$ and proteinuria $<1 \text{ g/24 hr}$) in the absence of immunosuppression for at least 1 year (range, 2–13 years). Immunosuppressive treatment was stopped because of noncompliance (n=6), posttransplant lymphoproliferative disorder (n=1), or calcineurin inhibitor toxicity (n=1). The clinical aspects of these patients have been described in detail elsewhere (1). Because they had normal and stable graft function, no biopsy was taken from these patients, as recommended by the University Hospital Ethical Committee and the Committee for the Protection of Patients from Biological Risks.
- ii. Patients with stable graft function under standard immunosuppression with normal graft histology (N; n=8): patients presented with stable graft function under standard immunosuppression (calcineurin inhibitor or rapamycin) with a creatinemia less than $150 \mu\text{mol/L}$ and proteinuria less than 1 g/24 hr . Biopsies from these recipients showed normal histology.
- iii. Patients with deteriorating graft function under standard immunosuppression and biopsy-proven CR (n=26): These patients presented with a creatinemia more than $150 \mu\text{mol/L}$ or proteinuria more than 1 g/24 hr or both and their histological lesions were classified according to the updated Banff classification criteria (3, 4) as chronic antibody-mediated rejection [n=26; TG, positive for C4d and circulating anti-human leukocyte antigen (HLA)] or “suspicious for chronic antibody-mediated rejection” (n=4; TG plus C4d or anti-HLA).
- iv. Nontransplanted patients with “nonimmune” renal failure (n=10; mean age: 36.5 ± 14): these patients were suffering from renal failure (creatinemia $615.3 \pm 202.7 \mu\text{mol/L}$ and proteinuria 4.4 ± 3.1) but had not yet been included in a chronic dialysis program or received a transplant. The causes of renal failure were polycystic kidneys (6/10 patients), renal dysplasia (2/10 patients), interstitial nephropathy (1/10 patients), and malformative uropathy (1/10 patients).
- v. Healthy volunteers (n=22; mean age: 45.8 ± 10): these were individuals with a normal blood formula and no infectious or other concomitant pathologic condition for at least 6 months before the study.

Biopsy Cohort

The biopsy cohort consisted of 36 kidney transplant biopsies classified according to the updated Banff classification criteria (3, 4) as displaying normal histology (N; n=8), TG without evidence of an active humoral component (absence of C4d and circulating anti-HLA; TG; n=10) or CR (n=18; all with TG and positive C4d staining together with circulating anti-HLA antibodies). The clinical and demographic characteristics as well as the time period between the last infection and the biopsy are provided in Table 2. Of note, only two patients presented with an infection in the month preceding the blood sample.

TABLE 1. Patient demographics and clinical data—PBMC cohort

Group	HV	NIRF	Kidney transplants		
			Op-Tol	N	CR
n	22	10	8	8	26
Recipient age years: median (range)	45.8 (25–66)	36.5 (21–61)	40 (24–74)	45.5 (33–52)	47.2 (27–76)
Gender ratio (M:F)	13:9	8:2	6:2	4:4	12:14
Time posttransplantation in years: median (range)	NA		15 (5–24)	0.8 (0.5–1)	8 (1–25)
Cockcroft creatinine clearance (mL/min): mean $\pm$ SD	NA	13 $\pm$ 4.8	72 $\pm$ 26	73.3 $\pm$ 15.6	32 $\pm$ 16.5
Proteinuria (g/24 hr): median (range)	NA	4.4 (0.97–1.02)	0.2 (0.11–0.53)	0.2 (0.07–0.51)	3.4 (0.13–11.52)
C4d+biopsy	NA	NA	ND	0/8	22/26
Anti-HLA	NA	NA	0/8	0/8	24/26
Banff ci score	NA	NA	ND	ND	Ib–IIIb
Time from last infection to blood sample (mo): median (range)	NA	(No prior infection reported)	42 (36–46) (Undetermined for five patients)	6 (3–10) (No prior infection reported for two patients)	18 (2–77) (No prior infection reported for five patients)
IS protocol		NA	None	Antimetabolite: MMF 8/8; azathioprine 0/8; CNI: CsA 0/8, FK 506 7/8; rapamycin: 1/8; steroids: 4/8	Antimetabolite: MMF 20/26; azathioprine: 1/26; CNI: CsA 4/26, FK 506 21/26; rapamycin: 0; steroids: 9/26

HV, healthy volunteers; NIRF, nontransplanted patients with nonimmune renal failure; Op-Tol, operationally tolerant patients; N, stable patients with normal graft histology; CR, chronic rejection patients; ND, not done; NA, not applicable; MMF, mycophenolate mofetil; CNI, calcineurin inhibitor; CsA, cyclosporin A; FK 506, prograf.

Blood Samples and Biopsies

Venous blood samples were collected in EDTA vacutainers and processed for analysis within 6 hr. Peripheral blood mononuclear cells were separated on a Ficoll layer (Eurobio, Les Ulis, France) and frozen in TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Human kidney transplant biopsies were taken with a 16- or 18-G needle, embedded in Tissue Tek (Miles, Elkhart, IN), snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C .

RNA Extraction and Preparation of cDNA

For PBMC, RNA was extracted using the TRIzol method (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA was removed by DNase treatment (Roche, Indianapolis, IN). RNA quality and quantity were determined using an Agilent 2100 BioAnalyzer (Palo Alto, CA). RNA was reverse transcribed into cDNA using polydT oligonucleotide and Maloney leukemia virus reverse transcription (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Biopsies were homogenized using a PT 3100 Polytron Rotor-Stator (Kinematica, AG, Luzern, Switzerland). RNA extraction was performed using the QIAGEN RNA microextraction kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) with on-column DNase treatment according to the manufacturer's instructions. RNA concentration and quality were determined as earlier. RNA was reverse transcribed into cDNA using an RT-Omniscript kit (QIAGEN, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions.

Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction

Real-time quantitative PCR (qPCR) was performed using commercially available primer and probe sets (hypoxanthine phosphoribosyl transferase [HPRT]: Hs99999909_m1, TLR4: Hs00152939_m1 and MyD88: Hs00182082_m1) from Applied Biosystems (Foster City, CA). Before any target gene measurement, all samples were tested for HPRT expression over three 5-fold dilutions so as to detect the presence of any PCR inhibitors. None of the samples included for study had detectable inhibitors. HPRT was used as an endogenous control to normalize RNA amounts. Relative expression between a given sample and a reference sample (human spleen from Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method (ABI PRISM 7900 user bulletin, PE Applied Biosystems, Foster City 2:11–24, 1997). All experiments were realized in duplicate.

Flow Cytometry

Peripheral blood mononuclear cell from renal transplant patients were incubated with PE-labeled antihuman TLR4 monoclonal antibody HTA125 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and fluorescein isothiocyanate-labeled antihuman CD14 monoclonal antibody (Becton Dickinson, San Jose, CA). Flow cytometry was performed on a BD LSRII analyzer with DIVA software (BD Biosciences, Mountain View, CA). Toll-like receptor values were expressed as percentage of positive CD14⁺ monocytes.

TABLE 2. Patient demographics and clinical data—biopsy cohort

Group	Normal	Transplant glomerulopathy	Chronic rejection	P
n	8	10	18	
Recipient age (yrs): median (range)	35 (18–61)	63 (45–75)	45 (24–71)	<0.01 (N vs. TG; CR vs. TG)
Gender ratio (M:F)	6:2	4:6	10:8	NS
Donor age (yrs): median (range)	34 (12–74)	58 (8–72)	35 (14–75)	<0.05 (TG vs. CR)
Time posttransplantation (yrs): median (range)	1 (1 yr protocol biopsies)	4 (1–14)	9 (1–18)	<0.001 (N vs. CR)
Cockcroft creatinine clearance (mL/min): mean±SD	76±17	27±18	27±16	<0.001 (N vs. TG; N vs. CR)
Proteinuria (g/24 hr): median (range)	0.12 (0.05–0.43)	1.1 (0.11–5.92)	1.86 (0.8–3.17)	<0.001 (N vs. CR)
C4d+biopsy+circulating anti-HLA antibodies	None	None	All	
Banff ci score	0	Ib–IIIb	Ib–IIIb	
Time from last infection to blood sample (mo): median (range)	10 (0.25–13) (No prior infection reported for four patients)	22 (0.5–58) (No prior infection reported for one patient)	17 (3–87) (No prior infection reported for seven patients, undetermined for one patient)	
IS protocol	Antimetabolite: aza 1/8, MMF 6/8; CNI: CsA 0, FK 506 7/8; rapamycin: 0; steroids: 1/8	Antimetabolite: aza 0/10, MMF 10/10; CNI: CsA 2/10, FK 506: 7/10; rapamycin: 1/10; steroids: 2/10	Antimetabolite: aza 2/18 MMF 9/18; CNI: CsA 8/18, FK 506 8/18; rapamycin: 0; steroids: 4/18	

NA, not applicable; Aza, azathioprine; MMF, mycophenolate mofetil; CNI, calcineurin inhibitor; CsA, cyclosporin A; FK 506, prograf; P, statistical P value.

Statistical Analysis

The nonparametric Mann-Whitney *U* test was used for comparison between two groups and the nonparametric Kruskal-Wallis test was used for comparison of more than two groups. Differences were defined as statistically significant when **P*<0.05, ***P*<0.01, or ****P*<0.001.

RESULTS

Contrasted Peripheral Blood Mononuclear Cell mRNA Profiles of the Toll-Like Receptor Signaling Adaptor Protein, MyD88, and Toll-Like Receptor-4 in Operationally Tolerant Patients and Patients With Chronic Rejection

The MyD88 was the first adaptive protein described as being critical for TLR signaling (7). Because MyD88 can associate all TLRs [except TLR3 (7)], we first evaluated the level of mRNA encoding MyD88 in PBMC from the different groups of patients using qPCR so as to determine any potential TLR modulation in kidney transplant recipients. Myeloid differentiation factor 88 transcripts were found to significantly accumulate in the PBMC of renal transplant patients presenting CR (1.23 ± 0.5) compared with Op-Tol recipients (0.57 ± 0.4 , *P*<0.01) and patients with stable graft function under immunosuppression with normal histology (N) (0.3 ± 0.19 , *P*<0.001) (Fig. 1A). Chronic rejection patients also presented with significantly higher MyD88 than HV

(0.83 ± 0.6 , *P*<0.05) and nontransplant patients with nonimmune renal failure (0.88 ± 0.3 , *P*<0.05) (Fig. 1A).

Given the differential regulation of MyD88 in these patients, we next explored the transcription of TLR4. As shown in Figure 1B and similar to MyD88 transcripts, TLR4 was also detected at significantly higher levels in the PBMC of patients with CR (1.88 ± 1.5) compared with Op-Tol recipients (0.4 ± 0.3) (*P*<0.05), patients with stable graft function under immunosuppression with normal histology (0.86 ± 0.78 , *P*<0.05) and HV (*P*<0.05) (Fig. 1B). A trend toward an increase in TLR4 transcripts was also observed in CR patients compared with nontransplant patients with nonimmune renal failure (*P*=0.06) (Fig. 1B). No correlation was detected between TLR4 mRNA expression in the CR patients and proteinuria or creatinine clearance (Spearman *r*=0.19; *P*=0.41 and Spearman *r*=0.19; *P*=0.40, respectively).

Finally, as expected, MyD88 and TLR4 mRNA levels correlated closely (Spearman *r*=0.5; *P*<0.0001; Fig. 1C). Neither the level of MyD88 nor TLR4 correlated with recipient age or time posttransplantation (NS). Moreover, increased TLR4 was not due to cytomegalovirus (CMV) infection because no differences were found in TLR4 mRNA levels between CMV+ or CMV− patients with chronic antibody-mediated rejection (*P*=0.72). Moreover, blood TLR4 levels were not influenced by concurrent infections because no patients presented with an infection episode in the month preceding the sample (Table 1). On the whole, these results show

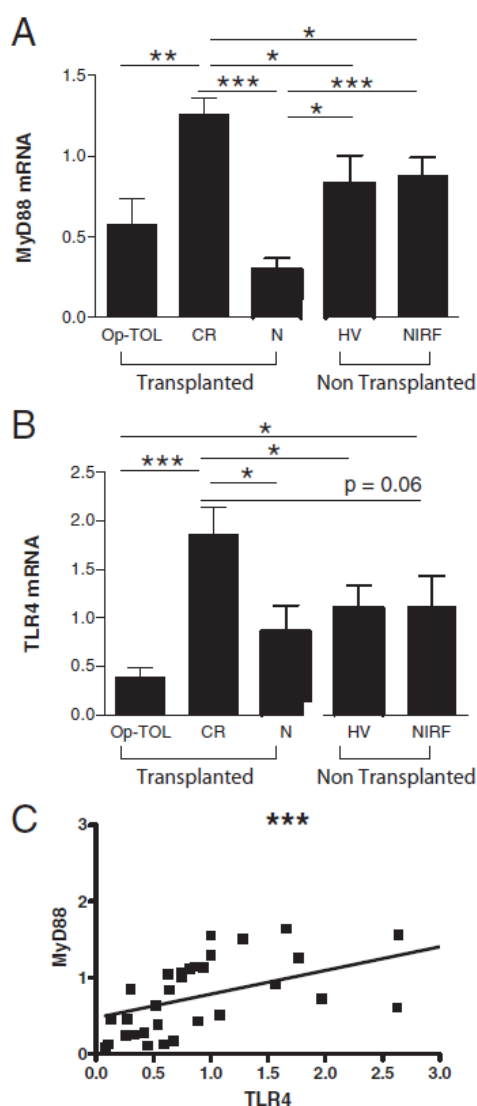


FIGURE 1. Myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and TLR4 mRNA expression in the PMBC of renal transplant patients. MyD88 (A) and TLR4 (B) mRNA expression and correlation between the two (C) in the PMBC of HV, recipients with good and stable graft function without immunosuppression (operational tolerance; Op-Tol), patients with good and stable graft function under standard immunosuppression with normal histology (N), patients with deteriorating graft function and biopsy-proven CR and patients with nonimmune renal failure as measured by qPCR. HPRT was used as an endogenous control to normalize RNA amounts. Transcript levels were calculated according to the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Results are shown as median+interquartile range. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.0001$.

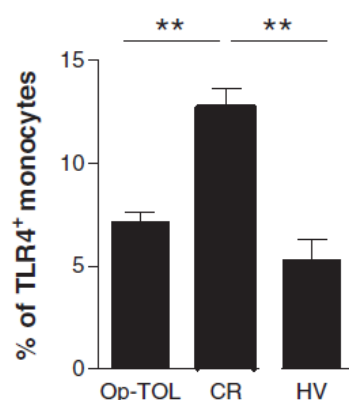


FIGURE 2. Toll-like receptors-4 expression in monocytes of renal transplant patients. Peripheral blood mononuclear cells from healthy individuals (HV; $n=5$), recipients with good and stable graft function without immunosuppression (operational tolerance; Op-Tol; $n=6$), and patients with chronic rejection ($n=9$) were analyzed by two-color flow cytometry. Monocytes were stained with PE-labeled antihuman Toll-like receptor TLR4 monoclonal antibody (mAb) HTA125 and fluorescein isothiocyanate-labeled antihuman CD14 mAb. Expression of TLR4 in monocytes is shown as median+interquartile range. ** $P < 0.01$.

that TLR4 modulation may be involved in graft outcome and suggest the involvement of a heightened innate response in CR and its absence in patients with operational tolerance, as in HV.

Contrasted Toll-Like Receptor-4 Protein Expression in Blood Monocytes Between Operational Tolerance and Rejection

Given that monocytes are the principle cell type within PBMC to express TLR4 (9) and given that Methe et al. (17) reported an increased expression of TLR4 in blood CD14⁺ monocytes in a cardiac transplant model, we next investigated whether the significant difference in TLR4 transcripts between patients with CR and operational tolerance of kidney allografts was also related to a difference in monocyte TLR4 expression. First, no significant difference in peripheral blood monocyte number was found between the Op-Tol recipients and patients with CR ($P=0.23$; data not shown) and no correlation was detected between total monocyte number and TLR4 expression ($P=0.24$; data not shown). However, as shown in Figure 2, patients with CR showed a significantly higher percentage of TLR4-expressing monocytes (12.7 ± 2.6) compared with Op-Tol patients (7.2 ± 1 ; $P=0.03$) and HV (5.3 ± 2.2 ; $P=0.03$). No differences were observed in TLR4 expression by peripheral blood T or B cells (data not shown).

Heightened Toll-Like Receptor-4 mRNA Expression in the Blood of Patients With Chronic Rejection Correlates With Heightened Toll-Like Receptor-4 mRNA Levels Within the Graft

To determine whether blood accumulation of TLR4 transcripts in patients with CR also reflects the phenomena

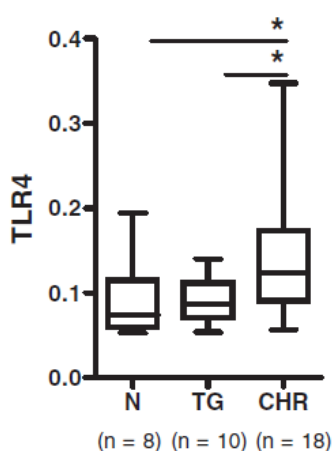


FIGURE 3. TLR4 mRNA transcription in kidney biopsies. TLR4 mRNA expression in kidney transplant biopsies showing normal histology (n=8), TG (negative for C4d and anti-HLA; n=10), or chronic rejection (n=18). Expression levels were measured by qPCR and results calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method after normalization to the housekeeping gene HPRT. * $P < 0.05$.

taking place within the graft itself, we next analyzed the TLR4 transcripts in renal transplant biopsies displaying normal histology (n=8) (no biopsy was taken from Op-Tol), TG without C4d and anti-HLA (n=10) or CR (n=18). As shown in Figure 3, significantly more TLR4 mRNA was detected in renal transplant biopsies with CR (0.14 ± 0.07) compared with those with TG (0.09 ± 0.03) and normal histology (0.09 ± 0.05) ($P < 0.05$). Toll-like receptor-4 levels within the graft were unlikely to be influenced by concurrent infections because only two patients presented with an infection episode in the month preceding the sample (Table 2).

DISCUSSION

Recent evidence in mice suggests a potential role for the innate immune system in controlling allograft acceptance and rejection by means of TLR signaling (11, 20). In the present study, we set out to explore the potential implication of the innate immune system in human kidney transplant recipients by analyzing expression of the key TLR signaling adaptor protein MyD88 and TLR4. We focused our research on the comparison of PBMCs of patients with CR (deteriorating graft function and histologically diagnosed chronic immune-mediated graft damage under standard immunosuppression) or operational tolerance (patients with well-functioning grafts in the absence of immunosuppression). Our results reveal contrasting peripheral blood expression of MyD88 and TLR4 between the two groups, with increased expression in CR at both the transcriptional and protein levels. According to flow cytometry analyses, this significantly different expression seemed to lie in differences in TLR4 expression by circulating monocytes, with no difference in absolute number of monocytes detectable in the blood. Finally, this significantly different profile was also observed within the graft itself because grafts displaying lesions of

CR also accumulated more TLR4 mRNA than those with TG without an active humoral component and those with normal histology. Thus blood TLR4 expression patterns reflect local graft TLR4 expression.

Our results are in agreement with previous experimental observations in mice where elevated TLR4 mRNA levels were detected in both acute and chronic heart rejection, and were associated with an increase in TLR4 expression by peripheral blood monocytes (17). Moreover, TLR4 polymorphisms have been described in the literature, and several studies have suggested their involvement in allograft rejection. For example, lung transplant recipients heterozygous for a specific TLR4 gene mutation have been shown to experience fewer acute rejection episodes (18, 19) and kidney transplant recipients with a TLR4 polymorphism present a lower risk of posttransplant atherosclerotic events and acute rejection (18).

The fact that MyD88 transcripts were significantly increased in CR compared with the "nontransplant" patients with renal failure and the same trend was observed for TLR4, together with the absence of correlation between TLR4 mRNA levels and renal function, suggests that this heightened MyD88 and TLR4 expression likely reflects a state of activation of innate immunity in kidney recipients with CR than inflammation associated with impaired renal function, although the latter cannot be definitively excluded. This is substantiated by the finding in heart allografts that TLR pathway activation can stimulate the production of a variety of inflammatory cytokines and chemokines by recipient leukocytes that recruit T lymphocytes to the allograft and activate effector cells (17). Contrastingly, patients with operational tolerance presented with low peripheral blood levels of both MyD88 and TLR4 mRNA, similar to those in HV, suggesting that an absence of innate signaling may be a characteristic of the operational tolerance phenotype. The hypothesis of an absence of TLR signaling in operational tolerance would be in agreement with the fact that TLR signaling in various immune-cell populations has also been implicated in the breakdown of self-tolerance (21). For example, the generation of Th1 cytokines induced by TLR signaling in cells of the innate immune system is a contributing factor to disease pathogenesis in models of diabetes (22) and Crohn's disease (23). Studies using models of multiple sclerosis (21) and systemic lupus erythematosus (24) have further documented a role for TLR signaling in the maturation of dendritic cells. Thus, for the first time in kidney transplantation, we provide data to support a link between TLR4 expression and long-term graft outcome. Our data suggest that whereas absence of TLR signaling may be a feature of operational tolerance to kidney grafts, heightened TLR4 may be associated with chronic immune-mediated rejection. The role of TLR and their endogenous ligands in mediating allograft rejection or acceptance warrant further investigation and could give rise to new strategies of therapeutic intervention.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank TcLand S.A., Nantes, France for technical assistance.

REFERENCES

1. Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A, et al. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 736.

2. Lerut J, Sanchez-Fueyo A. An appraisal of tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* 2006; 6: 1774.
3. Solez K, Colvin RB, Racusen LC, et al. Banff'05 meeting report: Differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ("CAN"). *Am J Transplant* 2007; 7: 518.
4. Racusen LC, Halloran PF, Solez K. Banff 2003 meeting report: New diagnostic insights and standards. *Am J Transplant* 2004; 4: 1562.
5. Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL, et al. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: Longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* 2004; 78: 557.
6. Giral M, Nguyen JM, Karam G, et al. Impact of graft mass on the clinical outcome of kidney transplants. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 261.
7. Kawai T, Akira S. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* 2007; 13: 460.
8. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol* 2004; 5: 987.
9. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, et al. Quantitative expression of Toll-like receptor 1–10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 2002; 168: 4531.
10. Tesar BM, Jiang D, Liang J, et al. The role of hyaluronan degradation products as innate alloimmune agonists. *Am J Transplant* 2006; 6: 2622.
11. Walker WE, Nasr IW, Camirand G, et al. Absence of innate MyD88 signaling promotes inducible allograft acceptance. *J Immunol* 2006; 177: 5307.
12. Goldstein DR, Tesar BM, Akira S, et al. Critical role of the Toll-like receptor signal adaptor protein MyD88 in acute allograft rejection. *J Clin Invest* 2003; 111: 1571.
13. Goldberg A, Parolini M, Chin BY, et al. Toll-like receptor 4 suppression leads to islet allograft survival. *Faseb J* 2007; 21: 2840.
14. Wu H, Chen G, Wyburn KR, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2007; 117: 2847.
15. Tesar BM, Zhang J, Li Q, et al. TH1 immune responses to fully MHC mismatched allografts are diminished in the absence of MyD88, a Toll-like receptor signal adaptor protein. *Am J Transplant* 2004; 4: 1429.
16. Samstein B, Johnson GB, Platt JL. Toll-like receptor-4 and allograft responses. *Transplantation* 2004; 77: 475.
17. Methe H, Zimmer E, Grimm C, et al. Evidence for a role of Toll-like receptor 4 in development of chronic allograft rejection after cardiac transplantation. *Transplantation* 2004; 78: 1324.
18. Ducloux D, Deschamps M, Yannaraki M, et al. Relevance of Toll-like receptor-4 polymorphisms in renal transplantation. *Kidney Int* 2005; 67: 2454.
19. Palmer SM, Burch LH, Davis RD, et al. The role of innate immunity in acute allograft rejection after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 168: 628.
20. Chen L, Wang T, Zhou P, et al. TLR engagement prevents transplantation tolerance. *Am J Transplant* 2006; 6: 2282.
21. Marshak-Rothstein A. Tolling for autoimmunity-prime time for 7. *Immunity* 2006; 25: 397.
22. Zipris D, Lien E, Xie JX, et al. TLR activation synergizes with Kilham rat virus infection to induce diabetes in BBDR rats. *J Immunol* 2005; 174: 131.
23. Kobayashi M, Kweon MN, Kuwata H, et al. Toll-like receptor-dependent production of IL-12p40 causes chronic enterocolitis in myeloid cell-specific Stat3-deficient mice. *J Clin Invest* 2003; 111: 1297.
24. Barrat FJ, Meeker T, Gregorio J, et al. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *J Exp Med* 2005; 202: 1131.

Customer Service Contact Information

All correspondence concerning business matters, including subscription information, orders, or changes of address, should be directed to:

Lippincott Wilkins & Williams
 16522 Hunters Green Parkway
 Hagerstown, MD 21740-2116
 Tel: 800-638-3030 (North America); +44 (0) 20-7981-0525 (Europe);
 1-301-223-2300 (RoW)
 Fax: 1-301-223-2400
 Email: customerservice@Wolterskluwer.com

Annexe 2

original article

<http://www.kidney-international.org>

© 2010 International Society of Nephrology

Immunoproteasome beta subunit 10 is increased in chronic antibody-mediated rejection

Joanna Ashton-Chess^{1,2,3,8}, Hoa Le Mai^{1,2,3,8}, Vojislav Jovanovic^{1,2,3,8}, Karine Renaudin⁴, Yohann Foucher^{1,2,3}, Magali Giral^{1,2,3}, Anne Moreau⁴, Emilie Dugast^{1,2,3}, Michael Mengel⁵, Maud Racapé^{1,2,3}, Richard Danger^{1,2,3}, Claire Usal^{1,2,3}, Helga Smit^{1,2,3}, Marina Guillet⁶, Wilfried Gwinner⁷, Ludmilla Le Berre^{1,2,3}, Jacques Dantal^{1,2,3}, Jean-Paul Souillou^{1,2,3,8} and Sophie Brouard^{1,2,3,8}

¹INSERM, U643, Nantes, France; ²CHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITER, Nantes, France; ³Faculté de Médecine, Université de Nantes, Nantes, France; ⁴CHU Nantes, Service d'Anatomie Pathologique, Nantes, France; ⁵Department of Laboratory Medicine and Pathology, University of Alberta, Edmonton, Canada; ⁶TcLand Expression, Nantes, France and ⁷Abteilung für Nephrologie, Medizinische Hochschule Hannover, Hannover, Germany

Chronic active antibody-mediated rejection is a form of late rejection with a poor prognosis. To identify specific markers of this, we analyzed several microarray studies in the literature and performed mRNA profiling of 65 biopsies and 165 blood samples of a large cohort of renal transplant patients with precisely characterized pathologies. Immunoproteasome beta subunit 10 was found to be specifically increased in the graft and blood samples during chronic active antibody-mediated rejection and was also significantly increased in rat cardiac allografts undergoing acute rejection as well as chronic active antibody-mediated rejection. This syndrome is characterized by chronic transplant vasculopathy associated with diffuse C4d staining and circulating donor-specific antibodies. Using this animal model, we found that administration of the proteasome inhibitor, Bortezomib, delayed acute rejection and attenuated the humoral response in both the acute phase and established state of this syndrome in a dose-dependent manner. Following treatment with this reagent, donor-specific antibodies and C4d deposition were reduced. These studies highlight the role of the proteasome in chronic rejection and identify this molecule as a marker of this syndrome.

Kidney International (2010) **77**, 880–890; doi:10.1038/ki.2010.15; published online 24 February 2010

KEYWORDS: chronic allograft rejection; gene transcription; kidney transplantation

Long-term graft loss remains the bane of kidney transplantation. More recently, much attention has been paid to the 'humoral' theory of chronic allograft rejection.¹ Evidence for the involvement of a humoral arm of the immune response to allografts has come from studies analyzing the impact of anti-human leukocyte antigen (HLA) antibodies on graft outcome,^{2,3} and evidence of complement cascade activation within kidney grafts diagnosed by intragraft deposition of the complement split product C4d.^{4,5} These data were recently reinforced when the definition of *chronic active antibody-mediated rejection* (CAMR) was introduced into the Banff classification of kidney graft injury as an association of specific histological lesions associated with diffuse C4d deposition in peritubular capillaries and circulating donor-specific anti-HLA (DSA) antibodies.⁶

Current therapies to combat the acute form of antibody-mediated rejection aim to reduce antibody titers through the use of intravenous immunoglobulin,⁷ plasmapheresis,⁸ or B-cell-targeting antibodies such as Rituximab,⁹ but these have not gained notoriety in the chronic form. Moreover, these strategies do not seem to have an effect on plasma cells, the source of antibodies. Thus, the development of more effective strategies would benefit patients suffering from this type of late graft rejection with such a poor prognosis.¹⁰ The identification of molecular markers associated with CAMR would not only facilitate its diagnosis, but could also help to understand the pathophysiology of CAMR and thus aid in the design of new therapeutic strategies. Currently, CAMR diagnosis depends on the triad of graft lesions together with intragraft C4d and DSA mentioned above. Neither one of these alone can diagnose CAMR; DSA are predictive of graft loss but have not yet been shown to tightly correlate with intragraft lesions, and C4d has recently been shown to be absent in up to 50% of CAMR cases.¹¹ Here, using a gene-set comparison approach, we describe the identification of a well-known molecule, the immunoproteasome- β subunit 10 (PSMB10, also known as MECL-1) as a potential marker of CAMR in humans.

Correspondence: Jean-Paul Souillou, INSERM U643, 30 Building Jean Monnet, Nantes Cedex 44093, France.
E-mail: Jean-Paul.Souillou@univ-nantes.fr

⁸These authors contributed equally to this work.

Received 19 July 2009; revised 12 November 2009; accepted 8 December 2009; published online 24 February 2010

Moreover, we obtained concordant results in a rat heart allograft model that we have recently described as a pertinent model of CAMR (histological lesions of chronic vascular damage, persisting antidonor antibodies and diffuse C4d deposits on the graft vasculature).¹² Here we show that, in this model, inhibition of the proteasome significantly prolongs allograft survival by preventing acute rejection, and also attenuates established humoral immune responses (decreases DSA and C4d deposition) in both short- and long-term surviving recipients. Our data suggest the implication of the immunoproteasome in CAMR with PSMB10 as a potentially useful marker and point toward proteasome inhibition as a means of treating both acute rejection and CAMR.

RESULTS

Identification of the inducible member of the immunoproteasome, PSMB10, as a potential intra-graft biomarker of chronic graft injury in human kidney transplantation

In order to identify potential diagnostic markers of chronic graft injury in humans, we compared several microarray data sets published in the literature in the context of human kidney transplant biopsies with chronic lesions (referred to as CAN or chronic rejection in the studies in question; Table 1). In total, less than 20 molecules were found to be common between at least two data sets (not shown). Among them, PSMB10 was found to be upregulated in chronic rejection in a study by Donauer *et al.*¹³ and in Banff grade 3 versus Banff grade 0 in a study by Flechner *et al.*¹⁴ PSMB10 was chosen from among the others because of its function as an instrumental member of the immunoproteasome and the availability of reagents to test it as a potential therapeutic target. In fact, the immunoproteasome was shown to be involved in antigen processing for presentation,¹⁵ and proteasome inhibition was shown to blunt antibody responses in mice.¹⁶ In healthy individuals, PSMB10 is expressed constitutively by the immune system (the spleen, peripheral blood, and lymph nodes; Supplementary Figure S1A) and by lymphocytes and monocytes, where its expression is regulated by cell activation (Supplementary Figure S1A and B). It can also be induced through exposure to interferon- γ .¹⁷

PSMB10 is upregulated in CAMR in human kidney transplant recipients

We analyzed PSMB10 in graft biopsies with different histological diagnoses (Table 2). As shown in Figure 1a, PSMB10 mRNA was specifically upregulated in biopsies with CAMR ($P < 0.001$). Of note, PSMB10 expression was not correlated with proteinuria ($r = -0.16$; $P = 0.63$). Receiver operator characteristic (ROC) curve analysis revealed that PSMB10 mRNA had an excellent capacity to discriminate CAMR from the other histological diagnoses, with an area under the curve of 0.92 ($P < 0.0001$, 95% confidence interval of 0.84–0.97). At a cut-off of 1.95, there was a sensitivity of 0.85 and a specificity of 0.83 (Figure 1b). Thus, PSMB10 shows potential as an intra-graft marker of CAMR in humans.

Given that ACR is becoming a rare phenomenon, we next focused on CAMR, to determine whether the specific regulation of PSMB10 was reflected in the peripheral blood. PSMB10 was analyzed in 150 kidney transplant recipients with stable graft function and 15 patients with CAMR (Table 3). As shown in Figure 2, patients with CAMR had significantly higher levels of PSMB10 than those with stable graft function ($P < 0.01$). Again, PSMB10 expression was not correlated with proteinuria ($r = -0.01$; $P = 0.98$).

To assess whether PSMB10 could potentially serve as a minimally invasive clinical decision-making tool, ROC curve analysis was performed. The results (Figure 2b) showed that this molecule analyzed in recipient blood could still discriminate CAMR from the other groups of patients well, albeit less than in the biopsies, with an area under the curve of 0.72 ($P < 0.01$; 95% confidence interval of 0.57–0.84). At a cut-off of 0.96, there was a sensitivity of 0.67 and a specificity of 0.64.

Potential confounding factors influencing the expression of PSMB10

We next performed a multivariate analysis on the 150 stable patients to evaluate the potential impact of clinical and demographic factors on the expression of PSMB10 in the peripheral blood (Table 3). Of all the parameters tested (legend to Figure 2), the statistically significant parameters identified as being associated with PSMB10 mRNA expression were recipient gender ($P < 0.05$) and time post-transplant ($P < 0.01$). Thus, creatinine clearance, proteinuria,

Table 1 | Studies used to identify common biomarkers of late graft injury

First author, journal/year	Subject	Sample	Microarray platform	Gene list
Hotchkiss, <i>Transplantation</i> /2006	'Chronic allograft nephropathy' (CAN)	Biopsies	Affymetrix	Selected upregulated genes in CAN (gene list published)
Flechner, <i>Am J Transplant</i> /2004	Banff grade 3 vs Banff 1	Biopsies	Affymetrix	Genes upregulated in Banff 3 vs Banff 01 (gene list available on the authors' website)
Scherer, <i>Transplantation</i> /2003	'Chronic Rejection' (CR)	Biopsies	Affymetrix	Genes upregulated in biopsies at 6 months which went on to develop CR at 1-year vs biopsies at 6 months with no CR at 1-year (exhaustive gene list kindly provided by the authors)
Donauer, <i>Transplantation</i> /2003	'Chronic Rejection' (CR)	Biopsies	'Homemade' according to Stanford protocol	Upregulated in CR vs normal and polycystic kidneys (gene list published)

Table 2 | Patients included in analysis of biopsies (Nantes and Hanover biopsies pooled; see Materials and Methods section).

Group	N	IF/TA	CNI tox	CAMR ^a	ACR ^b
<i>n</i>	13	16	14	13	9
Recipient age, years: median (range)	40.0 (18–69)	49.5 (24–66)	51.5 (29–66)	48 (24–71)	45 (25–61)
Recipient gender ratio (M/F)	9/4	9/7	8/6	7/6	5/4
Donor age, years: median (range)	35.0 (12–69)	51.0 (23–77)	41.5 (16–56)	34 (14–75)	34 (5–72)
Time post-transplant years: median (range) ^c	1	2 (1–3)	5 (1–11)	11 (1–18)	0.67 (0.08–5)
Donor gender ratio (M/F)	8/5	10/6	8/6	5/6 (n=2 NA)	8/1
HLA incompatibilities: mean ± s.d.	2.5 ± 1.7	2.5 ± 1.2	2.4 ± 1.4	3.5 ± 1.4	3.1 ± 1.1
% First transplant	100	100	79	92	78
Cockcroft creatinine clearance (ml/min): mean ± s.d.	75.9 ± 26.4	49.9 ± 17.0	52.4 ± 24.1	25.8 ± 16.7	32.6 ± 16.2
Proteinuria (g/24 h): median (range)	0.10 (0.03–0.43)	0.11 (0.01–6.37)	0.09 (0.03–4.47)	1.94 (0.80–4.00)	0.46 (0.21–0.49)
Banff c grade: mean ± s.d.	0.00 ± 0.00	1.25 ± 0.58	0.80 ± 1.03	2.27 ± 0.79	1.5 ± 0.53
Immunosuppression protocol (% of patients) at the time of biopsy	MMF: 69% Aza: 8% FK506: 62% CsA: 23% Rapa: 0%	MMF: 63% Aza: 13% FK506: 63% CsA: 13% Rapa: 13%	MMF: 64% Aza: 14% FK506: 29% CsA: 71% Rapa: 7%	MMF: 46% Aza: 15% FK506: 38% CsA: 54% Rapa: 0%	MMF: 78% Aza: 0% FK506: 67% CsA: 0% Rapa: 22%
	Steroids: 54%	Steroids: 69%	Steroids: 57%	Steroids: 23%	Steroids: 33%

Abbreviations: ACR, acute cellular rejection; Aza, azathioprine; CAMR, chronic antibody-mediated rejection; CNI tox, calcineurin inhibitor toxicity; CsA, cyclosporin A; FK 506, tacrolimus; DSA, donor-specific anti-HLA; HLA, human leukocyte antigen; IF/TA, interstitial fibrosis and tubular atrophy; MMF, mycophenolate mofetil; N, normal histology; TG, transplant glomerulopathy.

^aThe DSA were directed against class II (n=6), class I (n=2), or both (n=5).

^bThese were grade Ia (n=3), Ib (n=2), and grade IIa (n=4 with moderate intimal arteritis-vi) – all were C4d-negative and DSA-negative.

^cBiopsies for cause only.

donor and recipient age, number of HLA incompatibilities (A + B + DR), and maintenance immunosuppression were not confounders, neither were presence or absence of anti-HLA. Thus, PSMB10 is not simply a reflection of presence of anti-HLA antibodies. These data are modeled in Figure 2c, where predicted values of PSMB10 are expressed according to time post-transplant and recipient gender. PSMB10 was thus significantly higher in the peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of male recipients compared with female recipients ($P < 0.05$) and displayed a distinctive inverse bell-shaped relationship with time post-transplant. However, these potentially confounding factors could not explain the difference in PSMB10 between stable (STA) and CAMR, because there was no difference in time post-transplant or recipient gender between the STA and CAMR groups ($P = \text{not significant}$). Thus, overall these data show that PSMB10 may also be a peripheral blood biomarker of CAMR in humans, but some potential confounding factors may exist and need to be taken into consideration.

PSMB10 as an intra-graft and peripheral blood marker of acute rejection as well as CAMR in a rat cardiac allograft model

To determine whether we could reproduce the above data in a rodent model, PSMB10 mRNA was analyzed in the grafts and PBMCs of rat recipients of cardiac allografts undergoing acute rejection or CAMR. We found that PSMB10 was significantly increased in the cardiac allografts during both acute rejection (at day (D)7 post-transplant) and CAMR (analyzed at D100 post-transplant) compared with syngeneic controls (Figure 3a; $P < 0.01$ and $P < 0.0001$, respectively). A different expression profile was observed in the PBMCs, where PSMB10 displayed no change during acute rejection,

suggesting an effect of DST priming on PBMCs. Moreover, similar to in humans, a significant increase was observed during CAMR at D100 post-transplant (Figure 3b; $P < 0.05$). Thus, PSMB10 shows potential as an intra-graft and peripheral blood marker of CAMR in rats and humans.

The proteasome as a therapeutic target for AR: prolonged survival and attenuation of the humoral response during AR in a rat cardiac allograft model upon immunoproteasome inhibition with Bortezomib

Given this upregulation of PSMB10 in acute rejection and CAMR in this rodent model, we set out to determine whether proteasome inhibition could influence graft outcome. In the context of acute rejection, recipients of major histocompatibility complex (MHC)-mismatched cardiac allografts were treated with Bortezomib every other day from D0–D20. The data presented in Figure 4a show that Bortezomib dose-dependently prolonged cardiac allograft survival with an optimal effect at 0.1 mg/kg, giving a mean survival of 31.7 days ($n = 6$) (versus 6.3 days in untreated controls ($n = 4$); $P < 0.01$). Moreover, at D7, there were significantly lower circulating anti-donor MHC class I and II antibodies for total immunoglobulin G (IgG) ($P < 0.01$) as well as IgG1 ($P < 0.01$), and IgG2c ($P < 0.05$), with no reduction for IgG2a or IgG2b (Figure 4b).

The proteasome as a therapeutic target for CAMR: attenuation of the humoral response during CAMR in a rat cardiac allograft model upon immunoproteasome inhibition with Bortezomib

In the context of CAMR, Bortezomib was initially administered every other day from D80 to D100 at 0.1 mg/kg in rat recipients of cardiac allografts that had received DST before

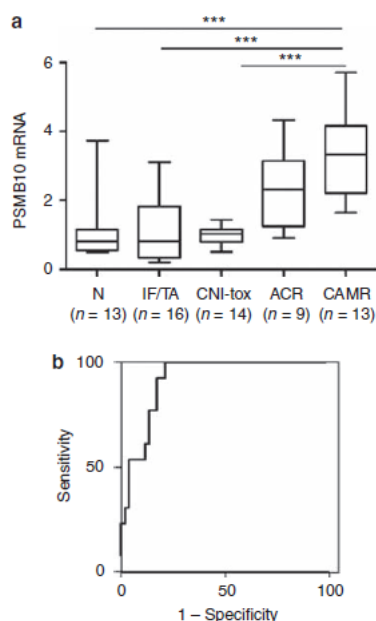


Figure 1 | Differential expression of mRNA for the immunoproteasome subunits PSMB10 and PSMB8 in renal transplant biopsies and their capacity to diagnose acute and chronic rejection. (a) Transcription of PSMB10 mRNA in renal transplant biopsies displaying normal histology, interstitial fibrosis and tubular atrophy (IF/TA) of unknown etiology, lesions evocative of calcineurin inhibitor toxicity (CNI tox), acute cellular rejection (ACR) and chronic antibody-mediated rejection (CAMR) (see Materials and Methods for precise definitions). Results represent pooled data for 6-month protocol biopsies and biopsies taken at ≥ 1 -year post-transplantation (similar results were found for the two cohorts). Statistical significance according to a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's Multiple Comparison test is indicated: *** $P < 0.001$. PSMB10 mRNA was measured by quantitative PCR using a TaqMan probe set (Hs00160620_m1). Expression levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method where the reference represents onefold expression, as previously described.⁴⁴ Hypoxanthine phosphoribosyl transferase (Hs99999909_m1) was used as an endogenous control to normalize RNA starting quantity. (b) Receiver operator characteristic (ROC) curve analysis of PSMB10 in the combined 6-month and ≥ 1 -year biopsy cohorts; its capacity to discriminate CAMR from all the other biopsies is analyzed.

transplantation and were surviving long-term. The DST + Bortezomib recipients had significantly reduced levels of circulating anti-donor MHC class I and II antibodies for total IgG as well as IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG2c (Figure 5a). Bortezomib-treated recipients tended to display less intra-graft complement deposition (Table 4). In fact, although the grafts of DST-treated animals displayed diffuse linear expression of C4d (Figure 5b, left-hand panel and magnified insert), two Bortezomib-treated animals showed only vague background staining, whereas the others displayed

Table 3 | Patients included in analysis of PBMCs

Group	STA	CAMR ^a
<i>n</i>	150	15
Recipient age in years: median (range)	53 (20–85)	51 (29–76)
Recipient gender (% males)	62	47
Donor age in years: median (range)	36 (9–69)	41 (14–74)
Donor gender (% males)	75	60
Time post-transplant in years: median (range)	8 (5–21)	6 (1–25)
HLA incompatibilities: mean $\pm$ s.d.	3.4 $\pm$ 1.3	3.5 $\pm$ 1.7
% First transplantations	100	80
Cockcroft creatinine clearance (ml/mn): mean $\pm$ s.d.	65.6 $\pm$ 14.2	34.3 $\pm$ 19.7
Proteinuria (g/24h): median (range)	0.16 (0.04–0.16)	2.61 (1.95–11.52)
IS protocol at blood sampling		
MMF: 51%		MMF: 60%
Aza: 26%		Aza: 7%
FK506: 26%		FK506: 67%
CsA: 72%		CsA: 20%
Steroids: 15%		Steroids: 27%

Abbreviations: Aza, azathioprine; CAMR, chronic antibody-mediated rejection; CNI, calcineurin inhibitor; CsA, cyclosporin A; DSA, donor-specific antibody; FK 506, Prograf; HLA, human leukocyte antigen; MMF, mycophenolate mofetil; NA, not applicable; PBMC, peripheral blood mononuclear cell.

^aThe DSAs were directed against class II ($n=11$), class I ($n=1$), or both ($n=3$).

minimal staining (Figure 5b, right-hand panel and magnified insert). There were no differences between the two groups in terms of infiltrate, fibrosis, vascular obstruction, vascular lesions, and number of affected arteries; however, myocyte necrosis was absent in four of the five animals in the Bortezomib-treated group (Table 4 and examples in Figure 5c, far left and middle panels). We thus performed further experiments in which treatment was initiated earlier at D60 and continued until D100. Again, a significant decrease in circulating anti-donor MHC class I and II antibodies for total IgG as well as for three of the four IgG subtypes tested was noted at D100 post-transplant in the Bortezomib-treated recipients (Figure 5d). This decrease was not simply a time-dependent effect, because recipients had significantly less DSA after the 40-day treatment versus before treatment, whereas DSA levels were unchanged in untreated animals over the same time period (Figure 5e). C4d staining at D100 in this group was heterogeneous (Table 4). A histological analysis at D100 showed that there was a tendency toward reduced vascular lesions and a significant reduction in fibrosis compared with the untreated DST group ($P < 0.05$; Table 4 and an example Figure 5c, far right panel). Thus, in this model and at the dose and schedules studied, Bortezomib is able to significantly attenuate the humoral immune response in graft recipients undergoing CAMR with a reduction in fibrosis and a tendency to reduce the histological lesions of transplant vasculopathy.

Finally, as PSMB10 expression did not correlate with proteinuria in the blood or graft of humans, we wished to confirm this in a rat model. For this purpose, we analyzed PSMB10 in Buffalo/Mna rats, a well-known rat model of proteinuria due to spontaneous idiopathic nephritic syndrome of unknown origin (see Materials and Methods

original article

J Ashton-Chess et al.: Proteasome expression/inhibition in transplantation

section for details). As shown in the Figure 6, PSMB10 was not significantly differentially expressed between rats with or without proteinuria, despite radical differences in proteinuria.

DISCUSSION

Here we used a literature gene-set comparison approach and identified PSMB10 as a potential biomarker of chronic graft injury. Further profiling by quantitative PCR in biopsies and PBMCs of renal transplant recipients revealed this molecule to be specifically increased in the graft and blood in CAMR. PSMB10 was also significantly increased in rat cardiac allograft models with acute or chronic rejection. In the acute model, administration of the proteasome inhibitor

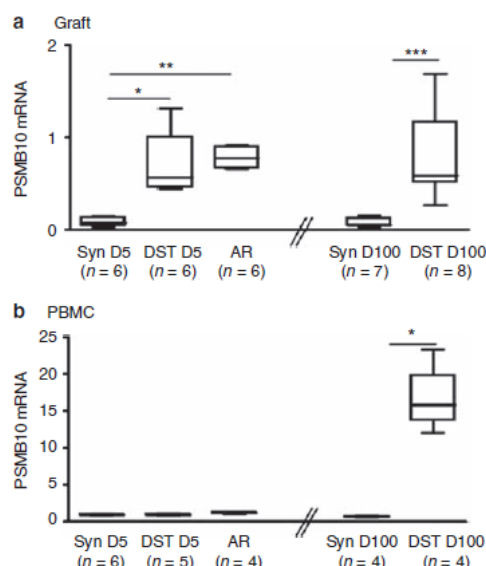
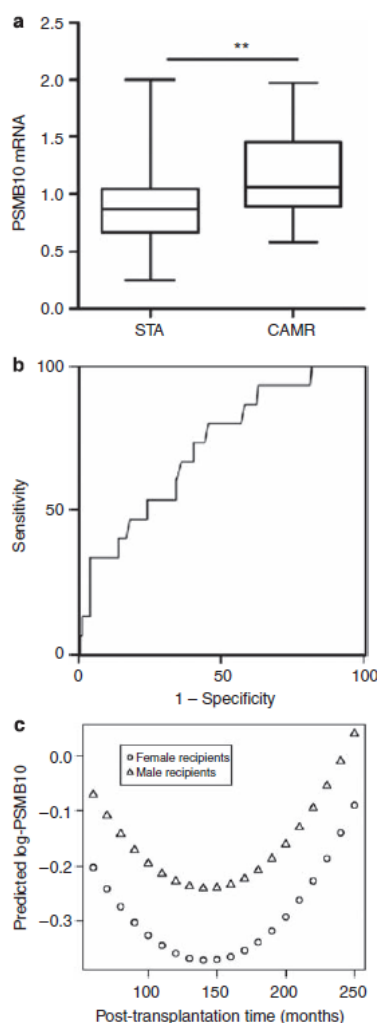


Figure 3 | PSMB10 mRNA profiles in the allografts and PBMCs of rat recipients of MHC-mismatched heart grafts displaying acute and chronic rejection. PSMB10 mRNA transcription in the grafts and PBMCs of rat recipients of MHC-mismatched and DST-treated or syngeneic cardiac transplants. Analyses were performed at D5 and D100 post-transplant as well as during acute rejection (mean 6.3 days post-transplant). PSMB10 was measured by quantitative PCR as described in the legend to Figure 1 using TaqMan probes for rat PSMB10 (Rn01432424_g1) and rat HPRT (Rn01527838_g1). Statistical significance according to a Kruskal-Wallis test followed by a Dunn's Multiple Comparison test is indicated: *** $P < 0.001$; ** $P < 0.01$ and * $P < 0.05$. In this model, DST treatment induces long-term survival but with histologic lesions of chronic transplant vasculopathy⁴⁰ associated with deposition of the complement split product C4d and circulating donor-specific antibodies.¹²

Figure 2 | Differential expression of PSMB10 mRNA in the peripheral blood mononuclear cells of renal transplant patients, its capacity to diagnose chronic rejection and its interaction with confounding factors. (a) PSMB10 mRNA expression in patients with stable graft function under standard immunosuppression (STA; $n = 150$) and chronic antibody-mediated rejection (CAMR; $n = 15$) (see Materials and Methods section for precise definitions). Statistical significance according to a Mann-Whitney test is indicated: ** $P < 0.01$. PSMB10 mRNA was measured by quantitative PCR as described in the legend to Figure 1. (b) Receiver operator characteristic (ROC) curve analysis of PSMB10 in the PBMCs of renal transplant patients. The capacity of PSMB10 to discriminate CAMR from the other transplant groups is analyzed. (c) Results of a multivariate linear regression analysis on log-transformed PSMB10 values. Statistical modeling of the relationship between PSMB10 mRNA values, time post-transplant and donor gender is illustrated. Parameters analyzed included donor and recipient age and gender, time post-transplant, creatinine clearance, proteinuria, number of HLA incompatibilities (A + B + DR), presence or absence of anti-HLA, and maintenance immunosuppression (presence/absence of steroids, high versus low trough level CsA (< 125 versus ≥ 125 ng/ml) versus high and low trough level FK-506 (< 5 versus ≥ 5 ng/ml)).

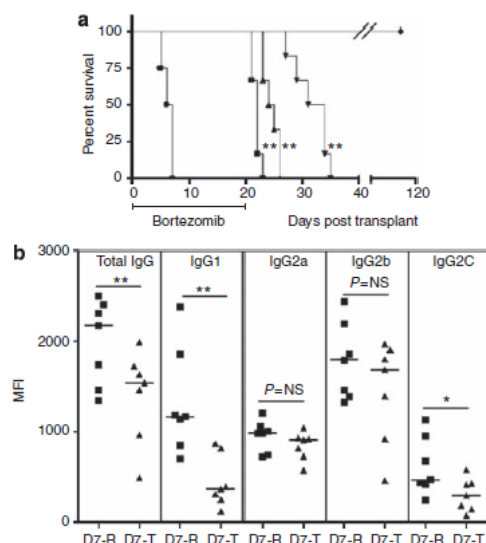


Figure 4 Induction treatment in rat recipients of MHC-mismatched cardiac allografts with Bortezomib. (a) Kaplan-Meier survival analysis of cardiac allograft recipients untreated (●) or treated every other day for 20 days with Bortezomib at 0.025 (■), 0.05 (▲), or 0.1 (▼) mg/kg. Statistical significance is indicated ** $P < 0.01$. (b) Measurement (as described in the Materials and Methods section) of anti-donor MHC class I and II IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG2c subtypes in the serum of MHC-mismatched cardiac allograft recipients at D7 post-transplant treated with Bortezomib (D7-T) or without Bortezomib treatment and thus undergoing rejection (D7-R). Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI). Statistical significance is indicated * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Bortezomib not only dose-dependently delayed acute rejection but also attenuated the humoral response. In the chronic model with established CAMR, Bortezomib treatment decreased DSA and C4d deposition and improved some aspects of the chronic tissue injury. These data thus suggest PSMB10 as a potential marker and the proteasome as a therapeutic target for CAMR.

Proteasomes are large protease complexes located in cytoplasm and nuclei that degrade cellular proteins in a ubiquitin-dependent and adenosine triphosphate-dependent manner present in immune cells.¹⁸ In response to interferon- γ , the three catalytic subunits are replaced by their homologous subunits, PSMB 8, 9, and 10, to form the so-called immunoproteasome, which is essential for processing antigenic peptides for presentation through the class I MHC complex.¹⁵ Immunoproteasomes have additional effects that are independent to class I processing, for example, they inhibit T-cell proliferation, as T cells lacking immunoproteasome subunits hyperproliferate *in vitro* and *in vivo*, and KO mice have higher numbers of central memory CD8⁺ cells.¹⁹

Experiments in KO mice have revealed that PSMB10 is involved in controlling homeostatic equilibrium between T-cell subsets,²⁰ thereby controlling the T-cell repertoire.²¹

Given the expression of PSMB10 by lymphocytes and monocytes, it is possible that the increase in PSMB10 in the graft in CAMR may be the result of specific infiltration of these cells. B cells in particular may be involved in this because patients with chronic rejection undergo lymphoid neogenesis with the development of intra-graft B-cell germinal centers.²² Likewise, increased PSMB10 expression may come from locally present activated monocytes or mature dendritic cells, as the immunoproteasome is known to be increased in these cells.²³ Given that the proteasome decreases during late phase plasma cell differentiation,²⁴ it is unlikely that the increase in PSMB10 in the peripheral blood stems from an increase in plasma cells in chronic rejection. ROC curve analysis suggested that the level of PSMB10 in the blood of graft recipients could be useful to diagnose CAMR, although it may not be sufficient as a stand-alone marker and could be combined with other markers to improve its diagnostic performance. Moreover, we found PSMB10 levels to be influenced by recipient gender and time post-transplant (but not presence of anti-HLA or renal function), highlighting the need to take confounding factors into account in biomarker analyses. Thus, PSMB10 is not simply a reflection of DSA or poor renal function, but rather of histological lesions together with C4d and DSA. Future analyses on simultaneous biopsy blood samples, which were not possible here because of lack of material, could be considered to directly compare intra-graft and peripheral blood diagnostic performance.

The intra-graft upregulation of PSMB10 we observed in CAMR in both humans and rats prompted us to test the proteasome inhibitor Bortezomib in the rat models of both acute rejection and CAMR. Currently, Bortezomib is used in the clinic for multiple myeloma and solid tumors.²⁵ However, a limited number of studies have analyzed the effect of this drug on acute rejection in murine models of transplantation, showing a preventative effect on both heart²⁶ and islet²⁷ allograft acute rejection. On the basis of blood biochemistry, Bortezomib was also associated with side effects, but these were reversible upon cessation of treatment.²⁷ Our data in a rat model of acute heart rejection are similar to those reported in the mouse, with a similar survival prolongation observed in both models. In the chronic model, diminution of some aspects of chronic injury was observed. The preventative effect on acute rejection is compatible with the hypothesis that proteasome inhibition reduces alloantigenicity by reducing class I presentation. Moreover, we observed a significant decrease in antibody production, suggesting an attenuating effect on the humoral response. Very recent data showed that proteasome inhibition specifically induces death of activated T cells,²⁸ and suppresses essential immune function of CD4⁺ T cells upon activation by allogeneic dendritic cells.²⁹ Moreover, proteasome inhibition has been shown to modulate toll-like receptor4-induced dendritic cell activation,³⁰ which could have a role here, as we recently

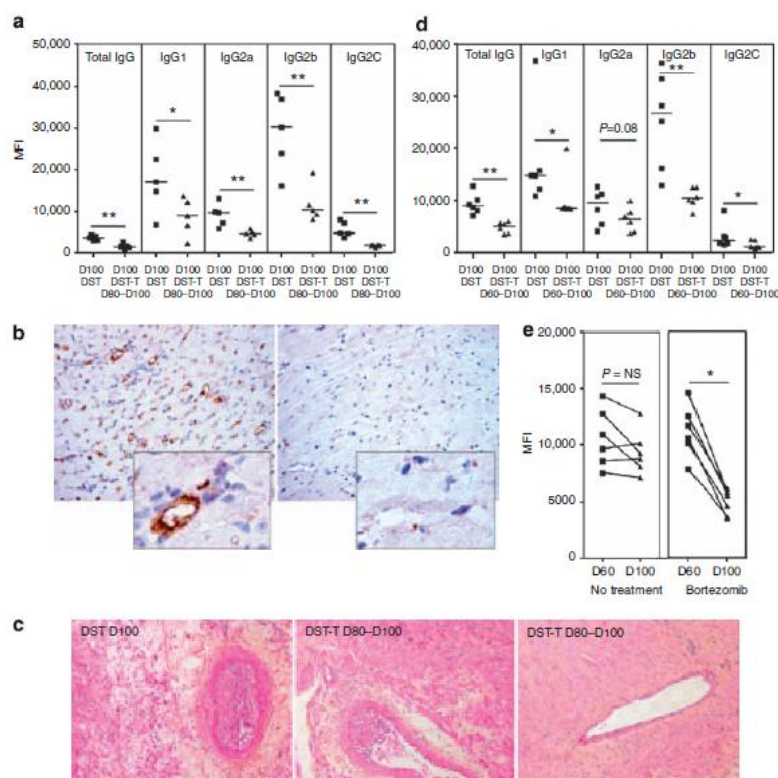


Figure 5 | Maintenance treatment in rat recipients of MHC-mismatched cardiac allografts with Bortezomib. (a) Measurement (as described in the Materials and Methods section) of anti-donor MHC class I and II total IgG and IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG2c subtypes in the serum of MHC-mismatched cardiac allograft recipients treated with DST or with DST followed by Bortezomib from D80–D100, at D100 post-transplantation. Results are expressed as mean fluorescence intensity (MFI). Statistical significance is indicated: * $P < 0.05$. (b) Immunoperoxidase staining of C4d at D100 post-transplantation in recipients of MHC-mismatched cardiac allografts treated with DST alone (left-hand panel and insert) or with DST followed by Bortezomib from D80 to D100 (right-hand panel and insert) (see Materials and Methods section for details). (c) Histology (hematoxylin and eosin) at D100 post-transplantation in recipients of MHC-mismatched cardiac allografts treated with DST alone (far left panel) or with DST followed by Bortezomib from D80 to D100 (middle panel) or from D60 to D100 (far right panel) at $\times 100$ magnification. (d) Measurement (as described in the Materials and Methods section) of anti-donor MHC class I and II total IgG and IgG1, IgG2a, IgG2b, and IgG2c subtypes in the serum of MHC-mismatched cardiac allograft recipients treated with DST or with DST followed by Bortezomib from D60 to D100, at D100 post-transplantation. (e) Paired measurement of anti-donor MHC class I and II total IgG at D60 and D100 in untreated recipients and recipients treated with Bortezomib from D60 to D100.

found toll-like receptor 4 to be increased in the graft and blood of CAMR patients.³¹

We also found that in a rat model of CAMR, Bortezomib decreased the humoral immune response by significantly reducing DSA. These data are in accordance with a recent report that proteasome inhibition blunts Ab responses following *in vivo* B-cell activation in mice, by promoting apoptosis.¹⁶ In the latter study, immunoproteasome sub-components decreased during B-cell differentiation, in parallel with increased immunoglobulin synthesis. More recently, Bortezomib was shown to rapidly and efficiently deplete both short- and long-lived plasma cells in the spleens

and bone marrow in a murine model of lupus-like disease, leading to reduced autoantibody development.³² Moreover, Bortezomib has recently been shown to induce apoptosis of plasma cells, to block anti-HLA Ab secretion *in vitro*, and to transiently decrease plasma cells *in vivo* in renal transplant recipients.^{33,34} However, in the latter studies in humans, Bortezomib was used in combination with other immunosuppressors and plasma exchange making it difficult to pinpoint the specific role of Bortezomib among the treatment arsenal. Moreover, its effect on graft histology has yet to be determined. In our model, we show a clear-cut effect of Bortezomib monotherapy on DSA and C4d, significantly

Table 4 | Histological analysis of DST-treated animals (D7 and D14 before transplantation) subsequently untreated or treated every other day from D80 to D100 or from D60 to D100 (CAMR lesions already established) with Velcade at 0.1 mg/kg

Rat	Group	Graft infiltrate	Fibrosis	Necrosis	Vascular lesions	Vascular obstruction	No. of affected arteries (art/section)	C4d
1	DST	2	3*	+	2	2	3 (28)	+++
2	DST	2	3	+	0	0	0	+++
3	DST	3	4*	+	2	4	13 (16)	+++
4	DST	2-3	2	+	2	1	1 (21)	+++
5	DST	2-3	3	+	1	1	3 (19)	+++
1	DST+Bortezomib D80-D100	2-3	3-4*	+	1-3	4	13 (33)	+
2	DST+Bortezomib D80-D100	2	3	—	2	4	8 (48)	—
3	DST+Bortezomib D80-D100	1-2	3-4	—	0	0	0	—
4	DST+Bortezomib D80-D100	1-2	3	—	2	4	7 (38)	++
5	DST+Bortezomib D80-D100	1-2	3*	—	1	1	2 (16)	++
1	DST+Bortezomib D60-D100	2	1*	+	0	0	0	+++
2	DST+Bortezomib D60-D100	2-3	2*	+	0	0	0	++
3	DST+Bortezomib D60-D100	1-2	3	Focal	3	3	7 (31)	+++
4	DST+Bortezomib D60-D100	2	1	Focal	1	1	3 (8)	+++
5	DST+Bortezomib D60-D100	1-2	2	—	0	0	0	—
6	DST+Bortezomib D60-D100	2	2	Focal	0	0	0	—

P=NS P<0.05 P=NS P=NS P=NS

Abbreviations: CAMR, chronic antibody-mediated rejection; DST, donor-specific antibody; NS, not significant. Infiltrate was graded from 0 to 4 (0, absence; 1, minimum; 2, discrete; 3, moderate; 4, abundant). Fibrosis was graded from 0 to 4 (0, absence; 1, focal; 2, diffuse-minimal; 3, diffuse-moderate; 4, diffuse-abundant; *, edema). Vascular obstruction was graded from 0 to 4 (0, 0; 1, <20%; 2, 20-50%; 3, 50-80%; 4, >80%). Vascular lesions were graded from 0 to 3 (0, normal; 1, leuco-intimal adhesion; 2, inflammatory endarteritis; 3, fibrous endarteritis). C4d was graded from - to +++ (-, <20%; +, 20-50%; ++, 50-75%; and +++, >75%). Necrosis was graded as presence (+) or absence (-) of myocyte damage. Statistical significance was measured using a non-parametric Kruskal-Wallis test with Dunn's Multiple Comparison test.

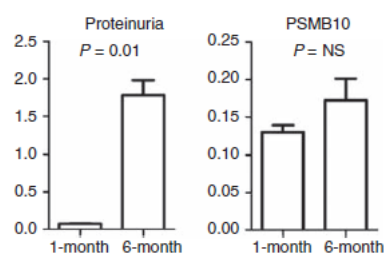


Figure 6 | PSMB10 and proteinuria in a rat model of idiopathic nephritic syndrome. Proteinuria (left-hand graph) and PSMB10 expression (right-hand graph) in Buffalo/Mna rats at 1-month of age and 6 months of age (see Materials and Methods section for details).

reduced allograft fibrosis and a tendency toward reduced vascular lesions. Therefore, early treatment with Bortezomib may be pivotal to prevent irreversible chronic lesions. Further analyses in a rodent model of kidney transplantation would also be interesting, although for the moment there are no true models of CAMR in the kidney. Indeed, in the Fischer to Lewis kidney transplant model of chronic allograft nephropathy (reviewed by Marco³⁵), our own experience revealed chronic pyelonephritis with no vascular lesions (data not shown).

On the whole, our data point toward PSMB10 as a potentially useful intra- and peripheral blood marker for

CAMR, with immunoproteasome inhibition as a valuable treatment strategy for antibody-mediated rejection.

MATERIALS AND METHODS

Gene-set comparison

With the aim of identifying relevant biomarkers of late graft injury, we compared the gene sets from four microarray studies of late kidney graft injury published in the literature^{13,14,36,37} (see Table 1). To overcome the problem of a single gene having numerous denominations, accession numbers, and so on, all genes were converted into a single common identifier, the 'gene ID,' using the gene ID conversion tool available on the DAVID Bioinformatic Resources 2006 website (<http://www.david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>). Gene IDs from the different studies representing were sorted in Microsoft Excel and repeats of the same ID identified.

Human kidney transplant recipients

Study groups. All patients who participated in this study gave informed consent, and the study was approved by the University Hospital Ethical Committee and the Committee for the Protection of Patients from Biological Risks. The study was performed on 65 biopsies and 165 blood samples. Samples were included prospectively on the basis of histological or clinical criteria.

(a) **Biopsies** were collected at two centers, Nantes, France ($n=45$) and Hanover, Germany ($n=20$). Of the total

65 biopsies, 29 were protocol biopsies at 6 months or 1 year and the remaining 36 were biopsies for cause. All were classified according to the updated Banff classification criteria,⁶ as displaying normal histology (N- C4d-negative and DSA-negative; $n=13$) or lesions of interstitial fibrosis and tubular atrophy of unknown etiology (IF/TA-C4d-negative and DSA-negative; $n=16$) or lesions of calcineurin inhibitor toxicity (tox-C4d-negative and DSA-negative; $n=14$), or lesions of acute cellular rejection (ACR; $n=9$) or CAMR (defined by the presence of circulating DSA associated with transplant glomerulopathy and deposition of C4d in peritubular capillaries ($n=13$)). C4d staining was performed on frozen sections with >50% staining being considered as positive. The demographic and clinical data for all of these patients are provided in Table 2.

- (b) *Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)* were prepared from the blood of 165 kidney transplant patients (largely independent from those included in the biopsy analysis) whose statuses were defined on a histological and/or clinical basis: Stable graft function (patients under standard immunosuppression with stable graft function (creatinemia <150 $\mu\text{mol/l}$ and proteinuria <1 g/24h for at least 3 years including over the two previous 6-month follow-up appointments with <20% change between the two time points: STA; $n=150$), or CAMR as defined above ($n=15$). The demographic and clinical data for these patients are provided in Table 3.

Rodent transplant models

Study groups. Inbred male adult rats (200–250 g) of the LEW.1A (RT1a) and LEW.1W (RT1u) MHC-incompatible congenic strains were purchased from Janvier (Le Genest-Saint-Isle, France) and maintained in an animal facility under standard conditions according to the European and Institutional Guidelines.

- (a) *Acute rejection of heart allografts.* LEW.1A rats received heterotopic heart allografts from LEW.1W donors as previously described³⁸ and received no immunosuppressive treatment. Rejection (cessation of heart beating assessed by daily abdominal palpation) occurs at a mean of 6.3 days post-transplant.
- (b) *Chronic antibody-mediated rejection of heart allografts.* LEW.1A rat recipients were transfused intravenously with 1 ml of blood from a LEW.1W donor 14 and 7 days before heterotopic LEW.1W cardiac transplantation as described.³⁹ Graft function was evaluated as above. In this strain combination, donor-specific transfusion induces long-term graft survival but does not inhibit the indirect pathway of allorecognition, resulting in histological lesions of chronic transplant vasculopathy⁴⁰ associated with deposition of the complement split product C4d and circulating DSAs.¹²
- (c) *Bortezomib treatment for the prevention of acute rejection.* Heart allograft recipients received Bortezomib (Velcade,

Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA, USA) intraperitoneally from the day of transplantation and every other day until day (D) 20. Three different doses were tested: 0.025, 0.05, and 0.1 mg/kg.

- (d) *Bortezomib treatment of CAMR in the context of DST-induced long-term allograft survival.* Heart allograft recipients were treated with DST as described above and received Bortezomib intraperitoneally at 0.1 mg/kg every other day either from D80 until D100 or from D60 until D100. At this time, all allografts present vascular lesions with diffuse C4d deposits and circulating anti-DSA.

Rodent proteinuria model

The Buffalo/Mna rat strain maintained in our laboratory was provided by Dr Saito (Central Experimental Institute, Yokohama, Kawasaki, Japan). These rats have spontaneous idiopathic nephritic syndrome of unknown origin as previously described.⁴¹ They do not have proteinuria at 1 month of age but develop significant proteinuria by 6 months of age. Animal care was in accordance with our institutional guidelines. The rats were placed in metabolic cages for 24 h and total urinary protein concentration (g/l) was measured by a colorimetric method using a Hitachi autoanalyzer (Boehringer, Reims, France). Proteinuria was expressed according to the formula proteinuria (g/mmol) = urinary proteins (g/l)/urinary creatinine (mmol/l), and it was considered to be abnormal at values >0.2 g/mmol.

Sample preparation

Human kidney transplant biopsies were processed as described.⁴² Rat heart transplant or kidney tissue was processed as described.⁴⁰ Human and rat peripheral blood was collected in EDTA vacutainers and PBMCs separated by density centrifugation using Lymphosep, lymphocyte separation media (Bio West, Nuaille, France). PBMCs were stored in TRIzol (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) at -80°C until use.

RNA extraction and reverse transcription. Human biopsies were processed as described in detail.⁴² Rat heart allografts and rat and human PBMCs were processed using the TRIzol method (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA quality and quantity was determined using an Agilent 2100 BioAnalyzer (Palo Alto, CA, USA). Genomic DNA was removed by DNase treatment (Roche, Indianapolis, IN, USA). RNA was reverse transcribed into cDNA using polydT oligonucleotide and Maloney leukemia virus reverse transcription (Invitrogen).

Real-time quantitative PCR. Real-time quantitative PCR was performed in an Applied Biosystems GenAmp 7700 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as described in detail,⁴² using commercially available primer and probe sets (Applied Biosystems).

Rat cardiac allograft histological analyses and C4d immunostaining. Heart allografts were prepared as described by

Ballet *et al.*¹² and analyzed by a pathologist (KR) (see also Table 4 and legend). C4d deposition was localized as described by Ballet *et al.*¹² using an affinity-purified polyclonal rabbit antibody to C4d kindly provided by Baldwin and group⁴³ (department of pathology, Johns Hopkins Medical Institutions, Baltimore, MD, USA).

Measurement of circulating anti-donor antibodies in rat recipients of cardiac allografts. Anti-donor class I and II total IgG and subtypes in the sera of untreated or Bortezomib-treated recipients at D7 post-transplantation, and in DST-treated and DST + Bortezomib-treated animals at D60 and D100 post-transplantation were measured as described by Ballet *et al.*¹²

Statistical analyses

The non-parametric Mann-Whitney test was used for comparison between two groups. Note that there was an imbalance in sample size between the CAMR and STA patients ($n = 15$ versus 150); this was because we preferred to use all available STA samples to better reflect the relatively low prevalence of CAMR and to use all samples that were used for the other analyses (multivariate analyses and ROC). Such an imbalance is authorized within the context of the non-parametric Mann-Whitney test. The non-parametric Kruskal-Wallis test was performed for comparison of three or more groups, followed by Dunn's multiple comparisons test. ROC curve analysis was performed to determine the cut-off point of PSMB10 in biopsies and/or blood that yielded the highest combined sensitivity and specificity in diagnosing CAMR (see Figure 1 legend for explanation). Note that the $n = 15$ CAMR were compared with a large number of STA patients ($n = 150$) in order to better reflect the relatively low prevalence of CAMR in this diagnostic test. The effect of the different clinical and demographic parameters on the expression of PSMB10 in patients with stable graft function, a multivariate linear regression analysis, was performed following log transformation of the data taking into account the various parameters (see legend to Figure 2). The statistical software used was GraphPad prism 5.

DISCLOSURE

Several authors hold a patent for PSMB10 expression as a biomarker of CAMR. JA-C and MG are currently employees of TcLand Expression, Nantes France, a company developing blood biomarkers in transplantation.

ACKNOWLEDGMENTS

This research was funded by a grant from the 'Foundation Progreffe' (Nantes, France). The 164 stable patients were recruited in Nantes in the context of the Genhomme PHRC. This work is also part of a French Transplantation Research Network (RTRS) supported by the 'Fondation de Coopération Scientifique' CENTAURE. We thank Dr W Baldwin (Cleveland Clinic, OH, USA) for kindly providing the anti-rat C4d antibody.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. PSMB10 mRNA expression within the immune system and various cell subtypes of healthy individuals.

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/ki>

REFERENCES

1. Terasaki PI. Humoral theory of transplantation. *Am J Transplant* 2003; **3**: 665-673.
2. Terasaki PI, Ozawa M. Predicting kidney graft failure by HLA antibodies: a prospective trial. *Am J Transplant* 2004; **4**: 438-443.
3. Terasaki PI, Ozawa M. Predictive value of HLA antibodies and serum creatinine in chronic rejection: results of a 2-year prospective trial. *Transplantation* 2005; **80**: 1194-1197.
4. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S *et al.* Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol* 2001; **12**: 574-582.
5. Regele H, Bohmig GA, Habicht A *et al.* Capillary deposition of complement split product C4d in renal allografts is associated with basement membrane injury in peritubular and glomerular capillaries: a contribution of humoral immunity to chronic allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2002; **13**: 2371-2380.
6. Solez K, Colvin RB, Racusen LC *et al.* Banff05 Meeting report: Differential Diagnosis of Chronic Allograft Injury and Elimination of Chronic Allograft Nephropathy ('CAN'). *Am J Transplant* 2007; **7**: 518-526.
7. Jordan SC, Vo AA, Toyoda M *et al.* Post-transplant therapy with high-dose intravenous gammaglobulin: applications to treatment of antibody-mediated rejection. *Pediatr Transplant* 2005; **9**: 155-161.
8. Akalin E, Dinavahi R, Friedlander R *et al.* Addition of plasmapheresis decreases the incidence of acute antibody-mediated rejection in sensitized patients with strong donor-specific antibodies. *Clin J Am Soc Nephrol* 2008; **3**: 1160-1167.
9. Faguer S, Kamar N, Guilbeaud-Frugier C *et al.* Rituximab therapy for acute humoral rejection after kidney transplantation. *Transplantation* 2007; **83**: 1277-1280.
10. David-Neto E, Prado E, Beutler A *et al.* C4d-positive chronic rejection: a frequent entity with a poor outcome. *Transplantation* 2007; **84**: 1391-1398.
11. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S *et al.* Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant* 2009; **9**: 2312-2323.
12. Ballet C, Renaudin K, Degauque N *et al.* Indirect CD4+ TH1 response, antidonor antibodies and diffuse C4d graft deposits in long-term recipients conditioned by donor antigens priming. *Am J Transplant* 2009; **9**: 697-708.
13. Donauer J, Rumberger B, Klein M *et al.* Expression profiling on chronically rejected transplant kidneys. *Transplantation* 2003; **76**: 539-547.
14. Flechner SM, Kurian SM, Solez K *et al.* De novo kidney transplantation without use of calcineurin inhibitors preserves renal structure and function at two years. *Am J Transplant* 2004; **4**: 1776-1785.
15. Tanaka K, Kasahara M. The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28. *Immunol Rev* 1998; **163**: 161-176.
16. Cascio P, Oliva L, Cerruti F *et al.* Dampening Ab responses using proteasome inhibitors following *in vivo* B cell activation. *Eur J Immunol* 2008; **38**: 658-667.
17. Van den Eynde BJ, Morel S. Differential processing of class-I-restricted epitopes by the standard proteasome and the immunoproteasome. *Curr Opin Immunol* 2001; **13**: 147-153.
18. Adams J. The proteasome: structure, function, and role in the cell. *Cancer Treat Rev* 2003; **29**(Suppl 1): 3-9.
19. Caudill CM, Jayarapu K, Elenich L *et al.* T cells lacking immunoproteasome subunits MECL-1 and LMP7 hyperproliferate in response to polyclonal mitogens. *J Immunol* 2006; **176**: 4075-4082.
20. Zaiss DM, de Graaf N, Sijts AJ. The proteasome immunosubunit multicatalytic endopeptidase complex-like 1 is a T-cell-intrinsic factor influencing homeostatic expansion. *Infect Immun* 2008; **76**: 1207-1213.
21. Basler M, Moebius J, Elenich L *et al.* An altered T cell repertoire in MECL-1-deficient mice. *J Immunol* 2006; **176**: 6665-6672.
22. Thaumatzis O, Field AC, Dai J *et al.* Lymphoid neogenesis in chronic rejection: evidence for a local humoral alloimmune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 14723-14728.
23. Whiteside TL, Stanson J, Shurin MR *et al.* Antigen-processing machinery in human dendritic cells: up-regulation by maturation and down-regulation by tumor cells. *J Immunol* 2004; **173**: 1526-1534.

24. Cenci S, Mezghrani A, Cascio P *et al*. Progressively impaired proteasomal capacity during terminal plasma cell differentiation. *EMBO J* 2006; **25**: 1104–1113.
25. Adams J, Kauffman M. Development of the proteasome inhibitor Velcade (Bortezomib). *Cancer Invest* 2004; **22**: 304–311.
26. Luo H, Wu Y, Qi S *et al*. A proteasome inhibitor effectively prevents mouse heart allograft rejection. *Transplantation* 2001; **72**: 196–202.
27. Wu Y, Han B, Luo H *et al*. Dipeptide boronic acid, a novel proteasome inhibitor, prevents islet-allograft rejection. *Transplantation* 2004; **78**: 360–366.
28. Wang X, Luo H, Chen H *et al*. Role of proteasomes in T cell activation and proliferation. *J Immunol* 1998; **160**: 788–801.
29. Berges C, Habersack H, Fuchs D *et al*. Proteasome inhibition suppresses essential immune functions of human CD4+ T cells. *Immunology* 2008; **124**: 234–246.
30. Nencioni A, Schwarzenberg K, Brauer KM *et al*. Proteasome inhibitor bortezomib modulates TLR4-induced dendritic cell activation. *Blood* 2006; **108**: 551–558.
31. Braudeau C, Ashton-Chess J, Giral M *et al*. Contrasted blood and intragraft toll-like receptor 4 mRNA profiles in operational tolerance versus chronic rejection in kidney transplant recipients. *Transplantation* 2008; **86**: 130–136.
32. Neubert K, Meister S, Moser K *et al*. The proteasome inhibitor bortezomib depletes plasma cells and protects mice with lupus-like disease from nephritis. *Nat Med* 2008; **14**: 748–755.
33. Perry DK, Burns JM, Pollinger HS *et al*. Proteasome inhibition causes apoptosis of normal human plasma cells preventing alloantibody production. *Am J Transplant* 2009; **9**: 201–209.
34. Trivedi HL, Terasaki PI, Feroz A *et al*. Abrogation of anti-HLA antibodies via proteasome inhibition. *Transplantation* 2009; **87**: 1555–1561.
35. Marco ML. The Fischer-Lewis model of chronic allograft rejection – a summary. *Nephrol Dial Transplant* 2006; **21**: 3082–3086.
36. Hotchkiss H, Chu TT, Hancock WW *et al*. Differential expression of profibrotic and growth factors in chronic allograft nephropathy. *Transplantation* 2006; **81**: 342–349.
37. Scherer A, Krause A, Walker JR *et al*. Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies. *Transplantation* 2003; **75**: 1323–1330.
38. Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1969; **57**: 225–229.
39. Souillou JP, Blandin F, Gunther E *et al*. Genetics of the blood transfusion effect on heart allografts in rats. *Transplantation* 1984; **38**: 63–67.
40. Heslan JM, Renaudin K, Thebault P *et al*. New evidence for a role of allograft accommodation in long-term tolerance. *Transplantation* 2006; **82**: 1185–1193.
41. Le Berre L, Godfrin Y, Gunther E *et al*. Extrarenal effects on the pathogenesis and relapse of idiopathic nephrotic syndrome in Buffalo/Mna rats. *J Clin Invest* 2002; **109**: 491–498.
42. Ashton-Chess J, Giral M, Mengel M *et al*. Tribbles-1 as a novel biomarker of chronic antibody-mediated rejection. *J Am Soc Nephrol* 2008; **19**: 1116–1127.
43. Minami K, Murata K, Lee CY *et al*. C4d deposition and clearance in cardiac transplants correlates with alloantibody levels and rejection in rats. *Am J Transplant* 2006; **6**(5 Part 1): 923–932.
44. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{−(Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001; **25**: 402–408.

Annexe 3

Revue soumise dans Current molecular medicine

The Tribbles-1 protein in Humans: roles and functions in health and disease

Emilie Dugast^{1,2,4}, Endre Kiss-Toth³, Jean-Paul Soulillou^{1,2,5,6}, Sophie Brouard^{1,2,5,6*} and Joanna Ashton-Chess^{4*}

1 UMR643, INSERM, Nantes 44000 France

2 Faculté de Médecine Université de Nantes, Nantes 44000 France

3 Department of Cardiovascular Science, University of Sheffield, Sheffield, United Kingdom

4 TcLand Expression, 21 rue de la Noue Bras de Fer, 44200 Nantes, France

5 Institut de Recherche en Transplantation, ITUN, Nantes 44000, France

6 CHU de Nantes, Nantes 44000, France

* These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: J Ashton-Chess, TcLand Expression, 21 rue de la Noue Bras de Fer, 44200 Nantes, France, email: jashtonchess@tcland-expression.com

Abstract:

This review describes the key role of the serine-threonine kinase like protein Tribbles-1 in health as well as in diverse human pathologies. Tribbles-1 is a homolog protein of the *Drosophila* Tribbles. In *Drosophila*, the Tribbles protein is involved in the cell-cycle progression during mitosis and in mammals initial data showed TRIB1 to be involved in cell proliferation. In mammals, TRIB1 lacks a catalytic domain and thus acts as an adaptor protein by interacting with several partners. The activity of TRIB1 seems to be very specific to the environment and the cells type in which it is expressed, and a role for this molecule has been mainly described in several pathological states including various cancers such as acute myeloid leukemia and ovarian cancer. Further evidence has also linked TRIB1 to the control of plasmalipid homeostasis thus indicating the role of this molecule as a risk factor for myocardial infarction. Finally, TRIB1 is shown to be up-regulated during inflammatory events such as chronic inflammation of atherosclerotic arteries or chronic antibody-mediated rejection of transplanted organs. Here we provide a review of the current state of the scientific

literature for TRIB1, highlighting its role in diverse pathologies and inflammatory states. A better understanding of the role of this protein as both a target as well as a biological marker in diseases should drive the development of new therapeutic strategies.

Keywords: cancer, disease, transplant, tribbles, triglycerides

Main text:

The Tribbles Family

The Tribbles proteins were first described in *Drosophila* where they were shown to play a role in gastrulation [1]. In *Drosophila*, Tribbles act as a mitotic inhibitor, depending on the balance between Tribbles and String (a phosphatase essential for the G2/M progression during mitotic activity) [2]. Furthermore, over-expression of Tribbles has been shown to induce String degradation by the proteasome pathway and to slow down the G2 phase of mitosis [2]. In mitosis, the Tribbles proteins have an impact on the ventral furrow formation of *Drosophila*. As such, in *Drosophila*, Tribbles are key in controlling cell-cycle progression during mitosis and consequently in morphogenesis [1][2][3]. Tribbles have also been reported to negatively regulate Slbo, a *Drosophila* homolog of the C/EBP family of basic region-leucine zipper transcription factor [4]. Tribbles act by stimulating the ubiquitination of Slbo, leading to degradation of the protein by the proteasome in the border cells of *Drosophila* during oogenesis [4]. This regulatory role appears to be conserved in mammals; indeed, degradation of C/EBP (Ccaat-enhancer-binding protein) was shown to be controlled by Tribbles proteins in human and mouse myeloid cells [5][6][7].

Tribbles proteins exist in invertebrates but also in vertebrates and a sequence homology study revealed that the kinase-like domain is highly conserved during evolution, contrary to the N- and C-terminal domains which are less conserved, with the exception of a few amino acids [8]. Effectively, both in *Drosophila* and in human, Tribbles, which are kinase-like proteins, have a partial homology to serine-threonine kinases but lack the necessary residue for kinase activity in their kinase-like domain. The absence of a kinase activity has led to the classification of Tribbles proteins as scaffold proteins, because of their reported role as adaptator proteins in MAPK (Mitogen-activated protein kinase) signaling [9]. In support of this, a study of scaffold protein function proposed a regulation by activation or inhibition of

the MAPK signaling pathway, depending on the scaffold protein concentration and more precisely depending on the balance between the scaffold protein concentration and the MAPK concentration [10]. Many of these proteins have also been reported to play a role by interacting with MAPKs, MAPKKs (MAPK kinase) or MAPKKKs (MAPKK Kinase).

In Humans, three different homologues of the *Drosophila* Tribbles exist: Tribbles homologue 1, 2 and 3 (TRIB1, TRIB2 and TRIB3). The central kinase-like domain of these proteins does not seem to have kinase activity due to the absence of specific motifs found generally in all kinases with catalytic activity, like that required for ATP (Adenosine triphosphate) binding. Nevertheless, the kinase-like domain is believed to be responsible for some interactions with other proteins [11]. The N-terminus domain, which has 60 to 80 residues [12] and is rich in serine and proline amino acids, confers a short half-life for the protein by influencing its degradation, and is also responsible for the nuclear localization of the protein, especially for TRIB1 and TRIB3. On the contrary, TRIB2 seems to be preferentially expressed in the cytoplasm. Finally, the C-terminus domain, which is made up of about 25 residues [12], also seems to be crucial as it is responsible for other protein-protein interactions, which has been shown to facilitate their stabilization [9]. The C-terminus domain was also shown to contain the COP1 (E3 ubiquitin-protein ligase) binding domain in all three mammalian Tribbles [13]. This COP1 binding domain enables Tribbles-2 to degrade C/EBP- α [14] or Tribbles-3 to ubiquitinate ACC (acetyl-coenzyme carboxylase 1) [13].

In this review we will focus on the mammalian TRIB1 protein by describing its potential functions in pathological states and its interaction with other molecules that plays a role in these pathologies.

Tribbles-1 structure and mode of action

Human Tribbles-1, also known as C8FW, GIG2, TRB1, SKIP1 and TRIB1, is encoded by a gene located on chromosome 8 at the 8q24.13 locus. TRIB1 is expressed in many tissues, including skeletal muscle, thyroid gland, pancreas, peripheral blood mononuclear cells, bone marrow [9] and adipose tissue [15].

The current data show that TRIB1 is a molecule with complex behavioral patterns that are highly dependent on both the environment and the cell type. First, the activity of TRIB1 appears to occur at very specific times, because its mRNA has been reported as being transiently up-regulated in a variety of cell-types in response to inflammatory stimuli but its

expression profile varies according to the type of cells [16]. Reinforcing the fact that TRIB1 is a highly regulated protein, a study performed on mouse embryonic stem cells (mouse tribbles nucleotide sequences show 89% homology with human sequences) showed that TRIB1 mRNA (messenger ribonucleic acid) had a half-life shorter than 1 hour [17]. A short mRNA half-life is often indicative of a role at a precise time and thus probably a role in cell-cycle, development, growth, differentiation or signaling [17]. This short half-life for the TRIB1 mRNA could justify its classification as a scaffold protein, i.e. proteins that interact with several members of a signaling pathway and tether them into complexes to enable the signaling process to take place [18]. This is further supported by the fact that unlike common kinase proteins, TRIB1 lacks a catalytic domain. TRIB1 acts by interacting with many different proteins, and the functions of these proteins vary widely [9][19][20]. These interactions therefore have a multitude of effects, depending on the cell-type but also depending on the species and the environment [9].

An organism-specific action of TRIB1 has also been reported by several groups. For example, one study in the human cell line HeLa showed that, contrary to what has been reported in *Drosophila*, Tribbles proteins had no effect on cell cycle progression in this cell line [9]. Likewise, Trib1-deficient female mice in adulthood are infertile [20] while *Drosophila* deficient in Tribbles can still generate mutant flies, of which 14% survive to adulthood [2]. However, some similarities can be observed between *Drosophila* and man, such as the interaction of Tribbles with Slbo (a *Drosophila* homolog of the C/EBP family) in *Drosophila* and the interaction of TRIB1 (like TRIB2 and TRIB3) with C/EBP α [5]. This interaction is thought to induce C/EBP α degradation and thereby induce leukemia.

There have been several lines of evidence pointing towards TRIB1 as a contributor to a variety of pathological states. For example, via its interactions with other molecules, TRIB1 had been shown to be a key player in various forms of cancer [21]. Moreover, a link has also been made between TRIB1 and triglycerides/myocardial infarction [22][23][24], as well as between TRIB1 and chronic antibody-mediated rejection after kidney transplantation [25][26]. Below we discuss the role of TRIB1 in these various pathologies and endeavor to understand whether and how modulating TRIB1 could be a potential means of therapeutic intervention.

TRIB1: Role in pathology

TRIB1 and Cancer

Some viruses integrate their DNA (deoxyribonucleic acid) into the DNA of host cells in specific sites called retroviral integration sites. According to the site of the viral integration, the viral gene expression is favored or not. The integration of a viral gene could lead to tumorigenesis by increasing expression of proto-oncogenes [27]. Besides being the site for retroviral integration [28], many studies have reported the TRIB1 gene to be over-expressed in acute myeloid leukemia [5][28][29][30]. Indeed, in some cases of this disease, there is chromosomal abnormality which appears in the form of double minutes, an extrachromosomal circular DNA that derives from the excision of a chromosomal fragment [31][32][33] or LEE (large extrachromosomal element) [34]. In Acute myeloid leukemia (AML), the amplified segment of DNA partly corresponds to the chromosome 8 at the 8q24 locus including the MYC gene and has a size of about 4.3Mb. Several studies have shown that in AML with double minutes, the TRIB1 gene is often amplified, contrary to the MYC gene which is present but not amplified [31] [32], suggesting a role for TRIB1 but not MYC in the development of AML. In other studies TRIB1 has been found to be overexpressed but without any mention of double minutes being present, primarily in the pathogenesis of AML [29] [30] but also in follicular [35] and ovarian cancer [36]. It could be interesting to find the origin of the over-expression of TRIB1 in these cases of cancer. On the other hand, one study showed that in several cases of esophageal cancer, there was no amplification of the TRIB1 gene and the protein was not up-regulated either [37]. Intriguingly, transcriptomic analysis of 285 AML cases vs. a small number of healthy controls revealed that a number of AML cases, clustered together based on their expression profile, showed a markedly reduced expression of TRIB1 [7] Thus, TRIB1 over-expression seems to be specific to a subset of cancers and TRIB1 may have a role only in this subset, without being a general marker of cancer.

In addition to its implication in cancer via the amplification of the gene, TRIB1 also plays a role by interacting with many proteins from various pathways, including the MEK/ERK (MAP kinase kinase 1/MAP kinase 1) pathway [38]. The first molecule in this pathway reported to interact with TRIB1 is 12-lipoxygenase [39], the interaction being demonstrated in human epidermoid carcinoma A431 cells. 12-lipoxygenase (12-LOX) is an iron-containing enzyme that catalyses the dioxygenation of polyunsaturated fatty acids into lipids and is also expressed in many types of human tumors, with a potential role in tumor progression and metastasis. 12-lipoxygenase activity produces metabolites including 12-HETE (12-hydroxyeicosatétraénoïques), which phosphorylates ERK and thereby induces cell survival

and proliferation [40], both of which are the major processes in cancer. Furthermore, TRIB1 has been described to activate ERK [9], so, it is plausible that TRIB1 may play a role in cancer in cooperation with 12-LOX by activating the ERK pathway. This role for TRIB1 remains to be formally proven.

Some studies have attempted to understand the role of TRIB1 in cancer pathologies and principally in AML. Nakamura and his team worked on mouse leukemic cells or primary bone marrow cells and showed that TRIB1 enhances MAPK signaling upon inflammatory stimuli via cytokines to promote growth potency and inhibit apoptosis [28]. The influence of TRIB1 on the MAPK pathway has already been reported by several other studies where in normal conditions; TRIB1 has been shown to interact with MEK-1 and MKK4 (MAP kinase kinase 4), thereby stabilizing TRIB1 and inhibiting AP-1 (activator protein 1) activity [9].

In pathological conditions, the interaction between TRIB1 and MEK-1 occurs via the C-terminus domain of TRIB1 and leads to ERK phosphorylation, self-renewal activity in murine bone-marrow cells and enhanced proliferative activity in Hox9/Meis1-expressing bone-marrow cells [9][35][36]. Jin et al. demonstrated that Trib1 is a cooperating gene that co-activates Hox9/Meis1- induced AML and accelerates disease progression [28]. They later reported that it is the TRIB1 motif that mediates the interaction with MEK1 which is necessary for ERK phosphorylation and indirectly, for induction of AML [38]. Mes-Masson's team confirmed that TRIB1 plays a role in cell invasion via ERK activation in ovarian cancer, with a detrimental impact on cancer progression [36]. Based on these data, TRIB1 thus seems to be an important molecule for the induction of specific types of cancer, with a major action on the MAPK pathway and especially the MEK-1/ERK pathway.

The different actions of TRIB1 between normal and pathological conditions could be related to the local concentration of its protein. For example, in *Drosophila*, Tribbles activity was found to be very dependent on the balance between Tribbles and String, and in mammals, activation or inhibition of the MAPK pathway is also dependant on the ratio of scaffold protein/MAPK [41]. It is therefore plausible that in cancer, as the TRIB1 gene is over-expressed, there is an increase in the protein level that reverses the balance and therefore activates the ERK pathway instead of inhibiting it.

AML induction is known to be brought about by many different pathways. In addition to the implication of the MEK/ERK pathway, the C/EBP pathway is also thought to play a role in this pathology. Indeed, as reported before, a decrease in C/EBP α was found to be associated

with AML [42]. Furthermore, a study performed by Dedhia *et al.* showed that, in a mouse myeloid cell line, TRIB1 binds C/EBP α and induces its degradation via the proteasome which inhibits myeloid differentiation [5]. These data were confirmed by a study by Yokoyama *et al.* where TRIB1 interact with MEK1, resulting in phosphorylation of ERK and thereby inducing degradation of C/EBP α that also binds TRIB1 via the N-terminal end of its kinase like molecule [38]. Again, this interaction was described in another study that further demonstrated that the interaction takes place in the nucleus, and an *in silico* analysis showed that the TRIB1 promoter contains several putative C/EBP α binding sites [7]. However this last study performed by E. Kiss-Toth and colleagues showed that TRIB1 seems to inhibit the proliferation of the Me-1 leukemic cell line by a pro-apoptotic activity via the inhibition of the JNK (c-Jun N-terminal kinase 1) pathway. Consequently, in the latter conditions, TRIB1 seemed to be a tumor suppressor and did not induce AML [7]. The same group also demonstrated that an increase in the key myeloid transcription factor C/EBP α in HEL (Human erythroleukemia) cells also induced an increase in TRIB1 expression, probably via the fixation of C/EBP α to its binding sites on the TRIB1 promoter. Thus, C/EBP α induces TRIB1 expression and then TRIB1 inhibits the JNK pathway which consequently prevents AML [7].

The differences observed between these studies could be explained by the fact that TRIB1 is a molecule with a specific regulation depending on the cell-type in which it is expressed. Moreover, the expression of TRIB1 is transient after stimulation and the protein has a very short half-life. As such, studies using constitutive expression of TRIB1 could generate biased results. Overall, data from the different studies should be interpreted carefully, taking into account not only the species and the cell type used, but also the technique. Further studies using silencing techniques to act on endogenous TRIB1 should help to further elucidate its true role in cancer cell proliferation and differentiation. Finally, a study focusing on the human HEK293 (Human embryonic kidney) T-cell line demonstrated that TRIB1 has a COP1-binding motif and thus binds COP1, an E3 ubiquitin ligase [13] which is also a negative regulator of p53 [43]. Moreover, when the p53 gene is mutated, the p53 protein loses its anti-proliferative and apoptotic functions, leading to cancer neogenesis [44]. One can thus hypothesize that the interaction between TRIB1 and COP1, which inhibits p53, has the same impact as the mutation of the gene, and could therefore be accountable for the origin of some forms of cancer.

When looking at the literature concerning the role of TRIB1 in cancer, there are many studies showing that this molecule participates in cancer by inducing cell proliferation and inhibition

of apoptosis. Furthermore, the interaction between TRIB1 and MEK1 appears to be central to this pathology, whereas the other interactions with TRIB1 may only be of secondary importance. A schematic representation of the potential role of TRIB1 in cancer via its interactions with other molecules is provided in Figure 1.

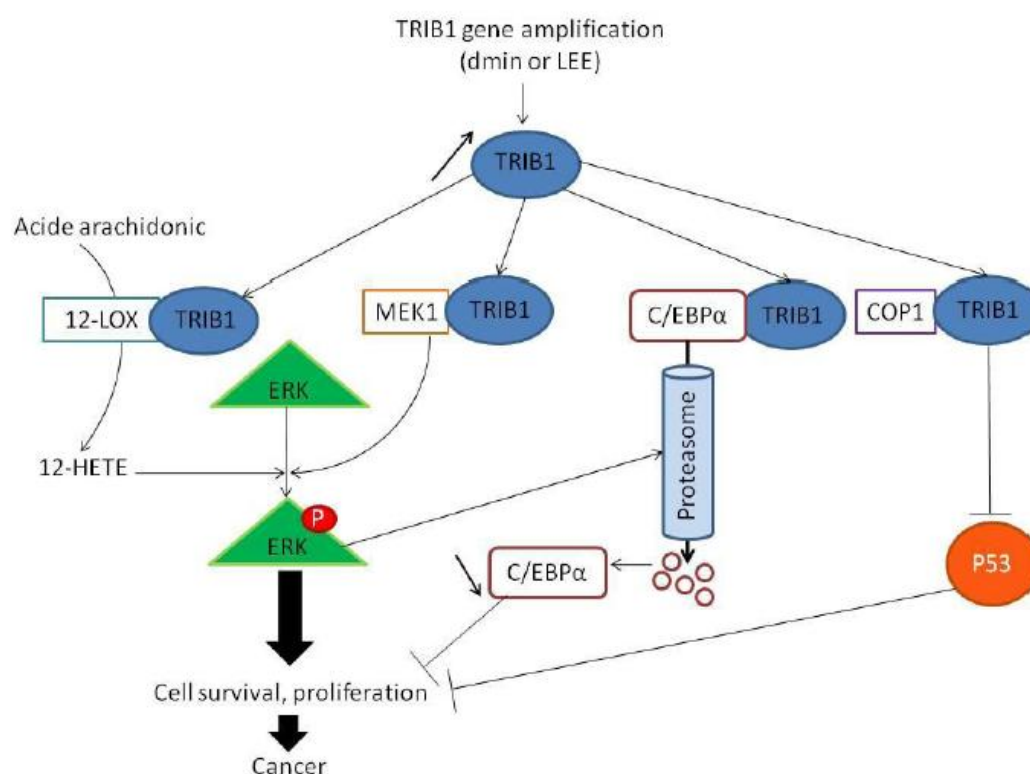


Figure 1: Schematic representation of the hypothesized involvement of TRIB1 in cancer via its interaction with multiple molecules.

TRIB1, Triglycerides and Myocardial Infarction

In addition to the above discussed links to cancer, TRIB1 has recently been linked to the control of plasmalipid homeostasis and been reported as a risk factor in Myocardial Infarction in several Genome-Wide Association Studies (GWAS). The first link between TRIB and lipid levels was reported by Kathiresan et al. [22], where they demonstrated that a SNP (rs2954029), close to the TRIB1 locus, is associated with dysregulated triglyceride levels. This initial observation was confirmed in a number of subsequent, independent reports [23][45][46] and the association was also extended to plasma cholesterol levels [24][47][48]. Whilst the molecular mechanisms by which TRIB1 exerts its control function in lipid

homeostasis are still ill defined, some experimental proof is already available to underpin the above mentioned genetic work. Burkhardt and colleagues have recently demonstrated that liver-specific overexpression of TRIB1 in mice lowers plasma triglyceride and VLDL levels. Conversely, TRIB1 knockout mice appear to have elevated TG (Triglycerides) and VLDL (very low density lipoprotein) compared to wild type littermates [49].

TRIB1 and other Pathologies

There is emerging data showing that TRIB1 may also play a role in pathologies with an inflammatory component. We and others have shown that the TRIB1 mRNA expression was increased in the blood of human kidney transplant recipients displaying chronic antibody-mediated rejection [25][26], a phenomenon known to involve an infiltration of the graft by monocytes/macrophages with accompanying inflammation [50]. In normal peripheral blood, TRIB1 was expressed primarily by monocytes, CD8⁺ T cells and B cells and its expression was up-regulated by stimulation with inflammatory molecules such as LPS (Lipopolysaccharide) and TNF α (Tumor necrosis factor α) in both myeloid cells and endothelial cells [25]. TRIB1 therefore appears to be a marker of inflammation.

In another context of inflammation, it has been shown that TRIB1 is also over-expressed in chronically inflamed human atherosclerotic arteries [11]. Furthermore, TRIB1 is also transiently up-regulated by LPS treatment in hASMC (human aortic smooth muscle cells) and play a role in proliferation and chemotaxis of these cells via the MAPK pathway [11]. Whether it promotes inflammation or rather is part of a negative regulatory loop remains to be determined. Further studies using knockdown or transfection of TRIB1 during inflammatory responses should help understand whether TRIB1 is a potential therapeutic target.

Our team have screened different immune compartments and found Tribbles-1 to be principally expressed by peripheral blood cells. Within the myeloid lineage, Tribbles-1 was highly expressed by activated monocytes and dendritic cells [25] which suggest TRIB1 to play a role in active immune response.

Conclusion

Based on the current literature, TRIB1 is emerging as a player in various forms of pathologies, specifically those involving proliferation and inflammation. Although its precise

role is not yet fully understood, as more data emerge new therapeutic strategies aimed at specifically targeting TRIB1 may be elaborated. The potential of the molecule as a biomarker of disease stage, subtype or outcome also needs to be explored.

Acknowledgements:

ED is a recipient of a CIFRE funding N° 717/2008. SB is a recipient of an ANR grant ANR-07-1215-0101

References:

- [1] Seher TC, Leptin M. Tribbles, a cell-cycle brake that coordinates proliferation and morphogenesis during *Drosophila* gastrulation. *Curr. Biol.* 2000 juin 1;10(11):623–9.
- [2] Mata J, Curado S, Ephrussi A, Rørth P. Tribbles coordinates mitosis and morphogenesis in *Drosophila* by regulating string/CDC25 proteolysis. *Cell.* 2000 mai 26;101(5):511–22.
- [3] Grosshans J, Wieschaus E. A genetic link between morphogenesis and cell division during formation of the ventral furrow in *Drosophila*. *Cell.* 2000 mai 26;101(5):523–31.
- [4] Rørth P, Szabo K, Texido G. The level of C/EBP protein is critical for cell migration during *Drosophila* oogenesis and is tightly controlled by regulated degradation. *Mol. Cell.* 2000 juill;6(1):23–30.
- [5] Dedhia PH, Keeshan K, Uljon S, Xu L, Vega ME, Shestova O, et al. Differential ability of Tribbles family members to promote degradation of C/EBPalpha and induce acute myelogenous leukemia. *Blood.* 2010 août 26;116(8):1321–8.
- [6] Keeshan K, He Y, Wouters BJ, Shestova O, Xu L, Sai H, et al. Tribbles homolog 2 inactivates C/EBPalpha and causes acute myelogenous leukemia. *Cancer Cell.* 2006 nov;10(5):401–11.
- [7] Gilby DC, Sung HY, Winship PR, Goodeve AC, Reilly JT, Kiss-Toth E. Tribbles-1 and -2 are tumour suppressors, down-regulated in human acute myeloid leukaemia. *Immunol. Lett.* 2010 mai 4;130(1-2):115–24.
- [8] Hegedus Z, Czibula A, Kiss-Toth E. Tribbles: novel regulators of cell function; evolutionary aspects. *Cell. Mol. Life Sci.* 2006 juill;63(14):1632–41.
- [9] Kiss-Toth E, Bagstaff SM, Sung HY, Jozsa V, Dempsey C, Caunt JC, et al. Human tribbles, a protein family controlling mitogen-activated protein kinase cascades. *J. Biol. Chem.* 2004 oct 8;279(41):42703–8.
- [10] Levchenko A, Bruck J, Sternberg PW. Scaffold proteins may biphasically affect the levels of mitogen-activated protein kinase signaling and reduce its threshold properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000 mai 23;97(11):5818–23.
- [11] Sung HY, Guan H, Czibula A, King AR, Eder K, Heath E, et al. Human tribbles-1 controls proliferation and chemotaxis of smooth muscle cells via MAPK signaling pathways. *J. Biol. Chem.* 2007 juin 22;282(25):18379–87.
- [12] Hegedus Z, Czibula A, Kiss-Toth E. Tribbles: a family of kinase-like proteins with potent signalling regulatory function. *Cell. Signal.* 2007 févr;19(2):238–50.
- [13] Qi L, Heredia JE, Altarejos JY, Screaton R, Goebel N, Niessen S, et al. TRB3 links the E3 ubiquitin ligase COP1 to lipid metabolism. *Science.* 2006 juin 23;312(5781):1763–6.

- [14] Keeshan K, Bailis W, Dedhia PH, Vega ME, Shestova O, Xu L, et al. Transformation by Tribbles homolog 2 (Trib2) requires both the Trib2 kinase domain and COP1 binding. *Blood*. 2010 déc 2;116(23):4948–57.
- [15] Bi X-ping, Tan H-wei, Xing S-shan, Wang Z-hao, Tang M-xiong, Zhang Y, et al. Overexpression of TRB3 gene in adipose tissue of rats with high fructose-induced metabolic syndrome. *Endocr. J.* 2008 août;55(4):747–52.
- [16] Sung HY, Francis SE, Crossman DC, Kiss-Toth E. Regulation of expression and signalling modulator function of mammalian tribbles is cell-type specific. *Immunol. Lett.* 2006 avr 15;104(1-2):171–7.
- [17] Sharova LV, Sharov AA, Nedorezov T, Piao Y, Shaik N, Ko MSH. Database for mRNA half-life of 19 977 genes obtained by DNA microarray analysis of pluripotent and differentiating mouse embryonic stem cells. *DNA Res.* 2009 févr;16(1):45–58.
- [18] Good MC, Zalatan JG, Lim WA. Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science*. 2011 mai 6;332(6030):680–6.
- [19] Ostertag A, Jones A, Rose AJ, Liebert M, Kleinsorg S, Reimann A, et al. Control of adipose tissue inflammation through TRB1. *Diabetes*. 2010 août;59(8):1991–2000.
- [20] Yamamoto M, Uematsu S, Okamoto T, Matsuura Y, Sato S, Kumar H, et al. Enhanced TLR-mediated NF-IL6 dependent gene expression by Trib1 deficiency. *J. Exp. Med.* 2007 sept 3;204(9):2233–9.
- [21] Yokoyama T, Nakamura T. Tribbles in disease: Signaling pathways important for cellular function and neoplastic transformation. *Cancer Sci.* 2011 juin;102(6):1115–22.
- [22] Kathiresan S, Melander O, Guiducci C, Surti A, Burt NP, Rieder MJ, et al. Six new loci associated with blood low-density lipoprotein cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol or triglycerides in humans. *Nat. Genet.* 2008 févr;40(2):189–97.
- [23] Wang J, Ban MR, Zou GY, Cao H, Lin T, Kennedy BA, et al. Polygenic determinants of severe hypertriglyceridemia. *Hum. Mol. Genet.* 2008 sept 15;17(18):2894–9.
- [24] Willer CJ, Sanna S, Jackson AU, Scuteri A, Bonnycastle LL, Clarke R, et al. Newly identified loci that influence lipid concentrations and risk of coronary artery disease. *Nat. Genet.* 2008 févr;40(2):161–9.
- [25] Ashton-Chess J, Giral M, Mengel M, Renaudin K, Foucher Y, Gwinner W, et al. Tribbles-1 as a novel biomarker of chronic antibody-mediated rejection. *J. Am. Soc. Nephrol.* 2008 juin;19(6):1116–27.
- [26] Alvarez CM, Opelz G, Garcia LF, Süsal C. Expression of regulatory T-cell-related molecule genes and clinical outcome in kidney transplant recipients. *Transplantation*. 2009 mars 27;87(6):857–63.
- [27] Lewinski MK, Yamashita M, Emerman M, Ciuffi A, Marshall H, Crawford G, et al. Retroviral DNA integration: viral and cellular determinants of target-site selection. *PLoS Pathog.* 2006 juin;2(6):e60.
- [28] Jin G, Yamazaki Y, Takuwa M, Takahara T, Kaneko K, Kuwata T, et al. Trib1 and Evi1 cooperate with Hoxa and Meis1 in myeloid leukemogenesis. *Blood*. 2007 mai 1;109(9):3998–4005.
- [29] Röthlisberger B, Heizmann M, Bargetzi MJ, Huber AR. TRIB1 overexpression in acute myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2007 juill 1;176(1):58–60.
- [30] Rücker FG, Bullinger L, Schwaenen C, Lipka DB, Wessendorf S, Fröhling S, et al. Disclosure of candidate genes in acute myeloid leukemia with complex karyotypes using microarray-based molecular characterization. *J. Clin. Oncol.* 2006 août 20;24(24):3887–94.
- [31] Storlazzi CT, Fioretos T, Paulsson K, Strömbeck B, Lassen C, Ahlgren T, et al. Identification of a commonly amplified 4.3 Mb region with overexpression of C8FW, but not MYC in MYC-containing double minutes in myeloid malignancies. *Hum. Mol. Genet.* 2004 juill 15;13(14):1479–85.

- [32] Storlazzi CT, Fioretos T, Surace C, Lonoce A, Mastrorilli A, Strömbeck B, et al. MYC-containing double minutes in hematologic malignancies: evidence in favor of the episome model and exclusion of MYC as the target gene. *Hum. Mol. Genet.* 2006 mars 15;15(6):933–42.
- [33] Kamath A, Tara H, Xiang B, Bajaj R, He W, Li P. Double-minute MYC amplification and deletion of MTAP, CDKN2A, CDKN2B, and ELAVL2 in an acute myeloid leukemia characterized by oligonucleotide-array comparative genomic hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2008 juin;183(2):117–20.
- [34] Hirano T, Ike F, Murata T, Obata Y, Utiyama H, Yokoyama KK. Genes encoded within 8q24 on the amplicon of a large extrachromosomal element are selectively repressed during the terminal differentiation of HL-60 cells. *Mutat. Res.* 2008 avr 2;640(1-2):97–106.
- [35] Puskas LG, Juhasz F, Zarva A, Hackler L, Farid NR. Gene profiling identifies genes specific for well-differentiated epithelial thyroid tumors. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)*. 2005 sept 5;51(2):177–86.
- [36] Puiffe M-L, Le Page C, Filali-Mouhim A, Zietarska M, Ouellet V, Tonin PN, et al. Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer. *Neoplasia*. 2007 oct;9(10):820–9.
- [37] Huang X-P, Rong T-H, Wang J-Y, Tang Y-Q, Li B-J, Xu D-R, et al. Negative implication of C-MYC as an amplification target in esophageal cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 2006 févr;165(1):20–4.
- [38] Yokoyama T, Kanno Y, Yamazaki Y, Takahara T, Miyata S, Nakamura T. Trib1 links the MEK1/ERK pathway in myeloid leukemogenesis. *Blood*. 2010 oct 14;116(15):2768–75.
- [39] Tang K, Finley RL Jr, Nie D, Honn KV. Identification of 12-lipoxygenase interaction with cellular proteins by yeast two-hybrid screening. *Biochemistry*. 2000 mars 28;39(12):3185–91.
- [40] Agarwal S, Achari C, Praveen D, Roy KR, Reddy GV, Reddanna P. Inhibition of 12-LOX and COX-2 reduces the proliferation of human epidermoid carcinoma cells (A431) by modulating the ERK and PI3K-Akt signalling pathways. *Exp. Dermatol.* 2009 nov;18(11):939–46.
- [41] Ferrell JE. What do scaffold proteins really do? *Sci. STKE*. 2000 oct 3;2000(52):pe1.
- [42] Mueller BU, Pabst T. C/EBPalpha and the pathophysiology of acute myeloid leukemia. *Curr. Opin. Hematol.* 2006 janv;13(1):7–14.
- [43] Dornan D, Wertz I, Shimizu H, Arnott D, Frantz GD, Dowd P, et al. The ubiquitin ligase COP1 is a critical negative regulator of p53. *Nature*. 2004 mai 6;429(6987):86–92.
- [44] Goh AM, Coffill CR, Lane DP. The role of mutant p53 in human cancer. *J. Pathol.* 2011 janv;223(2):116–26.
- [45] Nakayama K, Bayasgalan T, Yamanaka K, Kumada M, Gotoh T, Utsumi N, et al. Large scale replication analysis of loci associated with lipid concentrations in a Japanese population. *J. Med. Genet.* 2009 juin;46(6):370–4.
- [46] Nakayama K, Lkhagvasuren M, Yanagisawa Y, Utsumi N, Kumada M, Gotoh T, et al. Comparative study of polymorphisms on genes associated with lifestyle related diseases in Asian and Pacific populations. *Asia Pac J Public Health*. 2008 oct;20 Suppl:173–9.
- [47] Tai ES, Sim XL, Ong TH, Wong TY, Saw SM, Aung T, et al. Polymorphisms at newly identified lipid-associated loci are associated with blood lipids and cardiovascular disease in an Asian Malay population. *J. Lipid Res.* 2009 mars;50(3):514–20.
- [48] Edmondson AC, Braund PS, Stylianou IM, Khera AV, Nelson CP, Wolfe ML, et al. Dense genotyping of candidate gene loci identifies variants associated with high-density lipoprotein cholesterol. *Circ Cardiovasc Genet.* 2011 avr;4(2):145–55.

- [49] Burkhardt R, Toh S-A, Lagor WR, Birkeland A, Levin M, Li X, et al. Trib1 is a lipid- and myocardial infarction-associated gene that regulates hepatic lipogenesis and VLDL production in mice. *J. Clin. Invest.* 2010 déc 1;120(12):4410–4.
- [50] Fahim T, Böhmig GA, Exner M, Huttary N, Kerschner H, Kandutsch S, et al. The cellular lesion of humoral rejection: predominant recruitment of monocytes to peritubular and glomerular capillaries. *Am. J. Transplant.* 2007 févr;7(2):385–93.

Annexe 4

Production scientifique:

Autres publications:

The involvement of SMILE/TMTC3 in endoplasmic reticulum stress response.

Racapé M, Duong Van Huyen JP, Danger R, Giral M, Bleicher F, Foucher Y, Pallier A, Pilet P, Tafelmeyer P, Ashton-Chess J, **Dugast E**, Pettré S, Charreau B, Soulillou JP, Brouard S. PLoS One. 2011;6(5):e19321.

Identification of a gene expression profile associated with operational tolerance among a selected group of stable kidney transplant patients.

Brouard S, Le Bars A, Dufay A, Gosselin M, Foucher Y, Guillet M, Cesbron-Gautier A, Thervet E, Legendre C, **Dugast E**, Pallier A, Guillot-Gueguen C, Lagoutte L, Evanno G, Giral M, Soulillou JP.

Transpl Int. 2011 Jun;24(6):536-47.

Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype.

Pallier A, Hillion S, Danger R, Giral M, Racapé M, Degauque N, **Dugast E**, Ashton-Chess J, Pettré S, Lozano JJ, Bataille R, Devys A, Cesbron-Gautier A, Braudeau C, Larrose C, Soulillou JP, Brouard S.

Kidney Int. 2010 Sep;78(5):503-13.

Communications orales:

9th International Conference on New Trends in Immunosuppression and Immunotherapy (Genève le 5 février 2010)

“Tribbles-1 is expressed by regulatory T cells and interacts with FOXP3”

XXIII International Congress of The transplantation Society (Vancouver le 16 août 2010)

Représenté par J.P. Soulillou

“Tribbles-1 is expressed by regulatory T cells and interacts with FoxP3”

Posters:

American Transplant Congress 2010 (San Diego, le 2 mai 2010)

“Tribbles-1 is expressed by regulatory T cells and interacts with FoxP3”

American Transplant Congress 2012 (Boston, le 4 juin 2012)

“Tribbles-1 is expressed by regulatory T cells and interacts with FOXP3”

Etude des biomarqueurs en transplantation et plus particulièrement de Tribbles-1

Le rejet chronique humoral actif (RCHA) est une des dysfonctions chroniques qui aboutit à la perte du greffon. Malheureusement, les traitements actuels ne sont pas efficaces pour traiter ce rejet. L'identification de cette pathologie du greffon ne se fait actuellement que par l'analyse de biopsies associée à une recherche d'anticorps anti-donneur et le diagnostic n'est ainsi fait que lorsque la dysfonction est irréversible. L'identification de nouveaux biomarqueurs non invasifs de ce type de rejet serait d'un grand intérêt afin de définir des molécules pronostiques ou diagnostiques du RCHA. Ainsi, notre étude sur Tribbles-1 a montré que cette molécule était potentiellement un biomarqueur sanguin et tissulaire du RCHA. De plus, une autre étude comparant diverses dysfonctions chroniques a montré que la molécule Granzyme B est également surexprimée au cours du RCHA dans le sang et le greffon comparé à d'autres dysfonctions chroniques. Ainsi, nous avons identifié plusieurs biomarqueurs du RCHA. En étudiant plus précisément Tribbles-1, nous avons observé que cette molécule est plus fortement exprimée dans les lymphocytes T régulateurs en comparaison des lymphocytes T CD4⁺CD25⁻ chez les volontaires sains. L'étude plus poussée de Tribbles-1 dans les lymphocytes T régulateurs a montré que cette molécule interagissait avec la molécule qui confère aux Treg leurs capacités suppressives, FoxP3. Ces résultats montrent qu'il existe des biomarqueurs du RCHA et que Tribbles-1 a peut être un rôle à jouer dans cette pathologie via les lymphocytes T régulateurs.

Mots-clés : Tribbles-1, FoxP3, GrzB, Transplantation, Rejet chronique humoral actif, Cellules T régulatrices

Study of Biomarkers in Transplantation and especially Tribbles-1

Chronic antibody-mediated rejection (CAMR) is an immune chronic dysfunction leading to graft loss. Unfortunately, current treatments are not effective in treating this rejection. The identification of this pathology of the graft is being done by the analysis of biopsies associated with anti-donor antibody and the diagnosis is made only when the dysfunction is irreversible. Thus, the identification of new non-invasive biomarkers of such rejection would be of great interest to define molecular prognostic or diagnostic of RCHA. For this purpose, our study on the Tribbles-1 molecule as shown that it was potentially a blood and graft biomarker of RCHA. In addition, another study comparing various chronic dysfunctions showed that the molecule Granzyme B is also overexpressed in the RCHA in the blood and the graft compared with other chronic dysfunctions. Thus, we identified several biomarkers of RCHA. By studying more precisely Tribbles-1, we observed that this molecule is highly expressed in regulatory T cells compared to CD4⁺ CD25⁻ T cells of healthy volunteers. The advancement of Tribbles-1 in regulatory T cells has shown that this molecule interacts with the molecule that gives the suppressive capacities of Tregs, FoxP3. These results show that there are biomarkers of RCHA and one of these is Tribbles-1 which could maybe play a role in this disease through regulatory T cells.

Keywords: Tribbles-1, FoxP3, GrzB, Tbet, Transplantation, Chronic active antibody-mediated rejection, Regulatory T cells

DUGAST Emilie
INSERM UMR1064 – Equipe 4
30, Bvd Jean Monnet
44093 Nantes, cedex 01