

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE-SANTE

ANNEE 2011

Expression des microARN dans le sang de patients transplantés rénaux

THESE DE DOCTORAT

Discipline : Science de la Vie et de la Santé

Spécialité : Immunologie

Présentée et soutenue publiquement par :

Richard DANGER

Le 12 Octobre 2011, devant le jury ci-dessous :

Président du jury : Rémi Houlgatte, Directeur de Recherche, Nantes

Rapporteurs : Dominique Baeten, Professeur, Amsterdam
Eric Thervet, Professeur, Paris

Examineurs : Dany Anglicheau, Docteur, Paris
Jean-Marie Bach, Docteur, Nantes

Directeur de thèse : Sophie Brouard, Directeur de Recherche, Nantes

Sommaire

Remerciements	Erreur ! Signet non défini.
Sommaire	ii
Abréviations.....	iv
Table des illustrations.....	vi
Introduction	1
I/ Transplantation rénale et tolérance	1
1) Définition de la tolérance : un ou des états	1
2) L'induction de la tolérance.....	2
a) La tolérance centrale	3
b) La tolérance périphérique	5
3) La tolérance partielle	9
4) La tolérance opérationnelle	10
a) Contraintes méthodologiques des patients opérationnellement tolérants.....	10
i. Le problème de la population contrôle	10
ii. Méthodologie utilisée	11
iii. Choix du compartiment à analyser.....	11
b) Analyses phénotypiques des cellules périphériques des patients opérationnellement tolérants.....	13
c) Etudes du transcriptome des patients opérationnellement tolérants	18
II/ Le Rejet Chronique Humoral Actif en transplantation rénale	23
5) Définition du RCHA	24
6) Diagnostic précoce du RCHA.....	26
7) Traitement du RCHA	30
III/ Les petits nouveaux dans le contrôle d'expression des gènes : les microARN.....	32
1) Découverte des miARN	32
2) Biogénèse des miARN	34
a) Transcription des gènes codant les miARN	34
b) Maturation du miARN	35
3) Mesure des miARN.....	36
4) Mécanismes d'action des miARN.....	38
a) Reconnaissance de la cible du miARN	38
b) Choix du brin guide.....	40
c) Répression de la traduction protéique	41
d) Dégradation des ARNm cibles	41
e) Activation de la traduction protéique	42
f) Rôle de leurre	43
5) Intérêts cliniques de l'étude des miARN	43
a) Les miARN comme biomarqueurs	43
b) Intérêt thérapeutique des miARN	44
6) Importance des miARN dans le contrôle de l'immunité	45
a) L'oncomiR-21 dans l'immunité	47
b) miR-155, l'exemple du miARN multifonctionnel	47

c) miR-142-3p, fortement exprimé dans les PBMC	49
7) Implications des miARN en transplantation rénale	50
a) miARN et physiopathologie du rein.....	50
b) miARN et immunité de la transplantation.....	52
Objectifs	55
I/ Objectifs de l'étude 1.....	55
II/ Objectifs de l'étude 2.....	56
III/ Objectifs de l'étude 3.....	57
Résultats	58
I/ Résultats de l'étude 1	58
II/ Résultats de l'étude 2	70
III/ Résultats de l'étude 3	115
Discussion générale.....	117
Perspectives.....	122
I/ Implication des lymphocytes B dans la tolérance opérationnelle.....	122
1) Analyse de la différenciation lymphocytaire B	122
2) Etude des propriétés suppressives des lymphocytes B	122
II/ Analyse de l'expression des miARN chez les patients transplantés	123
1) Rôle du miR-142-3p dans la tolérance opérationnelle	123
a) Implication du miR-142-3p dans la voie de signalisation du TGFβ1.....	123
b) Répression de la production d'Il-6 par miR-142-3p	124
c) Rôle de miR-142-3p sur la fonction des lymphocytes B	124
d) Implications <i>in vivo</i> de miR-142-3p	125
2) Implications de miR-142-5p dans le RCHA.....	125
a) Identification des cellules responsables de la surexpression de miR-142-5p	125
b) Implications <i>in vivo</i> de miR-142-5p dans le RCHA.....	125
c) Confirmation du potentiel biomarqueur de miR-142-5p	126
III/ Comparaison rein-foie	127
Bibliographie.....	128
Annexes	145
Annexe 1.....	145
Annexe 2.....	147
Annexe 3.....	148
Annexe 4.....	150
Annexe 5.....	151

Abréviations

Ac : Anticorps

ADN : Acide DesoxyriboNucleique

AKT : *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*

Ag : Antigène

AMPc : Adénosine monophosphate cyclique

ADCY9 : Adénylate cyclase 9

ARN : Acide RiboNucleique

ARNm : ARN messenger

AT1R : Récepteur de type 1 de l'angiotensine

ATG : Globulines antithymocytes polyclonales

AUC: Aire sous la courbe (*Area Under the Curve*)

BANK1 : *B-cell scaffold protein with ANKyrin repeats 1*

C4d : *Complement component 4 d*

CAN :Néphropathie chronique d'allogreffe (*Chronic Allograft Nephropathy*)

CD : Cluster de Différenciation

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène

CTLA-4 : *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*

DAG : Diacylglycérol

ENDAT : *Endothelial-Associated Transcripts*

Fab : *Fragment antigen binding*

Fc : Fragment cristallisable

FOXP3 : *Forkhead Box P3*

GVHD : Réaction du greffon contre l'hôte (*Graft Versus Host Disease*)

GFP : Protéine fluorescente verte (*Green Fluorescent Protein*)

HLA : système des antigènes des leucocytes humains (*Human Leucocyte Antigens*)

HO-1 : Hème Oxygénase 1

IDO : Indoléamine 2,3-dioxygénase

IFN γ : Interféron γ

Il : Interleukine

Ig : Immunoglobuline

IOT : *Indice Of Tolerance*

IS : Immunossuppression

ITN : *Immune Tolerance Network*

IVIg : Immunoglobulines Intraveineuses

JAK3 : *Janus Kinase 3*

miARN : microARN

MMP7: *Matrix Metalloproteinase-7*

MRE: sites de reconnaissance à l'ARNm du miARN (*miARN Recognition Elements*)

mTOR : *mammalian Target of Rapamycine*

NF- κ B : *Nuclear factor κ B*

PBMC : Cellules mononuclée du sang périphérique (*Peripheral Blood Mononuclear Cell*)

PBT: *Pathogenesis-Based Transcript Sets*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

RCHA : Rejet Chronique Humoral Actif

RFP : Protéine fluorescente rouge (*Red Fluorescent Protein*)

PI-3K: Phospho-Inositol-3 Kinase

PKC : Protéine Kinase C

PLC : Phospholipase C

PSMB10 : *Proteasome Subunit, Beta type, 10*

qPCR : PCR quantitative

polyA: poly Adénylé

ROC : *Receiver Operating Curve*

STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription*

TCR : *T Cell Receptor*

TGF β 1 : *Transforming Growth Factor β 1*

TGFBR1 : TGF β 1 Récepteur 1

Th1 : Lymphocyte T helper 1

TLR4 : *Toll-Like Receptor 4*

Treg : Lymphocyte T régulateur

TRIB1: *Tribbles-1*

ZAP-70 : *Zeta-chain (TCR) Associated Protein kinase 70kDa*

Table des illustrations

Figure 1: Représentation des étapes de l'activation lymphocytaire T, issu de Thervet, <i>et al.</i> 2011.	7
Figure 2: Illustration des gènes mis en évidence par l'étude de Lozano <i>et al.</i> (Lozano, <i>et al.</i> 2011)....	21
Figure 3: Survie du greffon rénal selon la période de la greffe (ABM, 2009).....	23
Figure 4: Causes tardives de perte du greffon rénal inspiré de Pascual, <i>et al.</i> 2002.	24
Figure 5: Caractéristiques histologiques du RCHA (Giral, <i>et al.</i> 2010a)	25
Figure 6: Augmentation de la protéinurie chez des patients transplantés rénaux présentant des DSA <i>de novo</i> (Fotheringham, <i>et al.</i> 2011).....	28
Figure 7: Validation du score prédictif de la perte de greffon avec 48 biopsies indépendantes (Einecke, <i>et al.</i> 2010).....	29
Figure 8: Représentation des sept sites de fixation du miARN <i>lin-4</i> au gène <i>lin-14</i>	32
Figure 9 : Croissance du nombre de séquences dans la base <i>miRBase</i> et du nombre d'articles publiés citant le mot « microRNA » dans PubMed (Kozomara and Griffiths-Jones 2011).....	33
Figure 10: Biogénèse et mécanismes d'action des miARN, issu de Inui, <i>et al.</i> 2010	35
Figure 11: Principe de dosages par PCR quantitative des miARN	37
Figure 12: Trois grands types de structures secondaires de duplexe miARN/ARNm (Maziere and Enright 2007).....	39
Figure 13: Fluctuations d'expression de miR-150-5p et -3p dans différentes populations lymphocytaires (Kuchen, <i>et al.</i> 2010)	40
Figure 14: Profil d'expression de miARN en fonction du type cellulaire analysé (Liang, <i>et al.</i> 2007)...	46
Figure 15: Exemples de fonctions de miR-155 dans des cellules immunitaires (Schott and Stoecklin 2010)	48
Figure 16 : miARN différemment exprimés dans des biopsies de patients transplantés rénaux en épisode de rejet aigu et dans des biopsies normales (Anglicheau, D., <i>et al.</i> 2009a).....	53
Figure 17: Hypothèse de rétrocontrôle négatif de la signalisation du TGFβ1 par miR-142-3p dans les lymphocytes B.....	119
Figure 18: Expression de miR-142-3p dans des lymphocytes B naïfs, mémoires et régulateurs triés à partir de PBMC d'individus sains (n=2).	120
Figure 19: Concentration du TGFβ1 dans le plasma de patients stables et opérationnellement tolérants.....	124
Figure 20: Expression de miR142-5p et miR-21 dans les reins de rats syngéniques et DST à J100	126
Figure 21: Regroupement hiérarchique des 5 miARN différentiels mis en évidence entre transplantés hépatiques opérationnellement tolérants (TOL) et non tolérants (nonTOL).	127
Tableau 1: Etudes décrivant des patients opérationnellement tolérants.....	14

Introduction

I/ Transplantation rénale et tolérance

Le but en transplantation, voire le Graal pour certains, est l'établissement durable d'une allogreffe d'un organe solide sans recours à un traitement immunosuppresseur à vie. Mais, face aux nombreux échecs, le fait d'outrepasser la barrière immunologique entre deux individus non identiques génétiquement semble difficile (Starzl 2000). Pourtant, quelques exemples de tolérance chez l'Homme permettent d'envisager la possibilité d'induire une tolérance aux allogreffes. L'établissement d'une tolérance permettrait de s'affranchir des nombreux effets secondaires des immunosuppresseurs tels que l'augmentation de l'incidence des infections opportunistes (Singh 2005), de cancers (Stallone, *et al.* 2005; Dantal, *et al.* 1998) ou, paradoxalement de néphrotoxicités (Nankivell, *et al.* 2003; Bennett, *et al.* 1996). Ainsi, la prévalence de néphrotoxicités associées aux inhibiteurs de calcineurine est de 96,8% à 10 ans (Nankivell, *et al.* 2003). La tolérance permettrait également de réduire les coûts à long terme de la transplantation rénale ainsi que de s'affranchir des problèmes de non-observance des traitements par le patient qui s'accompagnent le plus souvent de la perte du greffon.

1) Définition de la tolérance : un ou des états

C'est en 1953 que Billingham, Brent et Medawar démontrèrent la possibilité d'induire une tolérance à une allogreffe de peau chez la souris par exposition du receveur aux antigènes du donneur de la greffe à un stade fœtal (Billingham, *et al.* 1953). A partir de ces expériences, la définition de tolérance « vraie » a été établie consistant en « une greffe fonctionnelle sans lésion histologique de rejet, en absence d'immunosuppression (IS), chez un hôte immunocompétent ». Cette tolérance est spécifique du donneur puisque le receveur accepte une seconde greffe du même donneur alors qu'il rejette une greffe d'un tiers.

Cette définition, établie chez l'animal, n'est pas transposable chez l'Homme où la greffe d'un organe tiers n'est pas envisageable pour prouver un état de tolérance spécifique. Ansari et Sayegh ont défini la tolérance chez l'Homme par l'absence de réaction immunitaire dirigée contre l'allogreffe, avec une fonction stable du greffon en l'absence d'IS (Ansari and Sayegh 2004). Plusieurs autres critères peuvent compléter la définition de tolérance incluant l'absence d'anticorps anti-donneur (DSA pour *donor specific antibody*) pour certains protocoles, l'absence d'infiltration du

greffon par des lymphocytes agressifs et une faible réponse dirigée contre le donneur *in vitro*, alors que la réponse immune contre les cellules d'une tierce personne est conservée (Fehr and Sykes 2004). Les protocoles d'induction de tolérance incluent un suivi du patient et des prélèvements qui peuvent permettre de répondre à cette définition.

De façon intéressante, dans certains cas rares, un état de tolérance spontanée est observé, principalement par non observance du traitement immunosuppresseur par le patient (Orlando, *et al.* 2010). Dans ces cas, l'accès au greffon est souvent impossible, par refus du patient, ou parce que prélever une biopsie chez ces patients présentant une bonne fonction rénale ne semble pas éthique face aux risques encourus. La définition de la tolérance ne se base alors que sur des critères fonctionnels et l'on parle alors de tolérance « opérationnelle » (Roussey-Kesler, *et al.* 2006). Plus précisément, nous l'avons définie par l'absence de traitements immunosuppresseurs depuis plus d'un an, avec une créatinémie inférieure à 150 μ mol/L et une protéinurie inférieure à 1g/24h (Roussey-Kesler, *et al.* 2006). L'arrêt des traitements immunosuppresseurs peut aussi être une décision médicale lorsque la survenue de cancers ou d'infections virales engage le pronostic vital du patient.

Enfin, un état partiel de tolérance ou « prope » tolérance est défini comme le maintien d'une fonction du greffon satisfaisante avec un traitement immunosuppresseur minimal dans le but de diminuer le risque de toxicité médicamenteuse et les complications infectieuses et tumorales (Calne, *et al.* 1998).

Ainsi, la réduction voire l'interruption des traitements immunosuppresseurs est une option envisageable pour l'amélioration du devenir du greffon ainsi que du patient lui-même en s'affranchissant de leurs effets secondaires. Les critères d'éligibilité de patients transplantés rénaux pour l'interruption de traitements à base d'inhibiteurs de calcineurine sont le sujet d'une revue rédigée en 2008 présentée en annexe 2 (p.147): Rationale and criteria of eligibility for calcineurin inhibitor interruption following kidney transplantation ; Danger R, Giral M, Souillou JP, Brouard S. *Curr Opin Organ Transplant.*, 2008.

2) L'induction de la tolérance

Depuis le travail pionnier de Medawar et de ses collègues, beaucoup de protocoles d'induction ont été développés dans des modèles de rongeurs (Jovanovic, *et al.* 2008) mais peu sont efficacement transposables chez des primates non-humains et encore moins chez l'Homme ; nous nous focaliserons donc sur les protocoles cliniques testés chez l'Homme. Ces protocoles se basent sur la compréhension des mécanismes de tolérance qui peuvent être distingués en deux types : la tolérance centrale et la tolérance périphérique.

a) La tolérance centrale

La tolérance centrale implique des mécanismes de délétion centrale thymique analogues à la tolérance au soi foetal qui se déroule dans le thymus où une sélection négative des lymphocytes T autoréactifs, reconnaissant le soi, est déclenchée par apoptose (Billingham, *et al.* 1953). Pour exploiter ce mécanisme dans le cadre de la transplantation d'organe, les lymphocytes T préexistants doivent d'abord être éliminés. Ensuite, l'expression des antigènes du donneur dans le thymus doit être obtenue pour rééduquer le thymus afin d'éliminer les lymphocytes réactifs envers les antigènes du donneur.

Chez l'Homme, le premier exemple de tolérance centrale a été décrit en 1991 chez deux patients ayant reçu une greffe de moelle osseuse présentant des antigènes des leucocytes humains (HLA pour *Human Leucocyte Antigens*) identiques suite à une leucémie aigüe. Ces deux patients ont reçu une allogreffe rénale du même donneur que la moelle quelques années après, pour traiter une dysfonction rénale (Sayegh, *et al.* 1991). Ces deux patients ont alors toléré leur greffe rénale sans IS et ont présenté un chimérisme, défini par la présence simultanée de cellules vivantes ayant des fonds génétiques différents dans un même organisme. Par la suite, différentes études ont rapporté des résultats similaires de tolérance rénale après transplantation de moelle osseuse (Helg, *et al.* 1994; Sellers, *et al.* 2001; Butcher, *et al.* 1999; Hamawi, *et al.* 2003; Jacobsen, *et al.* 1994; Sorof, *et al.* 1995; Gajewski, *et al.* 2002). Dans ces cas, la tolérance centrale est obtenue grâce à des traitements myélo-ablatifs, par irradiation totale ou par chimiothérapie, afin d'éliminer toutes les cellules hématopoïétiques dont les lymphocytes T matures, suivie d'une reconstitution de la moelle osseuse, par transplantation, qui assure la colonisation du thymus par des cellules souches (Delis, *et al.* 2004). Il faut noter que la transplantation de moelle osseuse dans ces cas est indiquée pour le traitement de leucémie, de lymphome ou de syndrome myélodysplasique prolifératif, et que les traitements myélo-ablatifs sont trop toxiques pour être utilisés chez des patients atteints de maladies rénales (Bolling, *et al.* 2011).

Les traitements non myélo-ablatifs ont aussi été utilisés pour induire une tolérance lors de greffe rénale. Dans ce cas, le but est d'induire un chimérisme mixte, c'est-à-dire un état où les cellules hématopoïétiques du donneur et du receveur coexistent. Ainsi, au *Massachusetts General Hospital*, six patients présentant une dysfonction rénale à la suite de myélomes multiples ont reçu une greffe combinée de rein et de moelle osseuse HLA identique (Spitzer, *et al.* 1999; Buhler, *et al.* 2002; Fudaba, *et al.* 2006). Tous les receveurs ont développé un chimérisme mixte, devenant indétectable 100 jours après la greffe pour quatre d'entre eux. Une rémission complète du myélome fut effective pour 3 de ces 6 patients malgré la perte de chimérisme pour deux d'entre eux. Les immunosuppresseurs furent arrêtés avec succès pour ces 4 patients avec un chimérisme mixte transitoire. Un autre patient avec un chimérisme mixte stable présenta une fonction rénale stable

sans IS pendant plus de trois ans. Ainsi, ce traitement non myélo-ablatif semble envisageable dans le cas de dysfonction rénale suite à un myélome.

Par la suite, le même groupe a rapporté la transplantation combinée de rein et de moelle osseuse entre des donneurs vivants avec une incompatibilité HLA (Kawai, *et al.* 2008). Les 5 individus ont reçu un traitement non myélo-ablatif (cyclophosphamide, anticorps (Ac) monoclonal anti-CD2, irradiation thymique) et deux d'entre eux ont aussi reçu des corticoïdes et du Rituximab, un Ac déplétant dirigé contre le CD20 exprimé par les lymphocytes B. Les auteurs ont arrêté le traitement IS (cyclosporine A) chez 4 des 5 patients pendant une période de 1,2 à 4,6 ans avec une fonction stable du greffon. Porcheray *et al.* ont montré que 2 de ces patients ont développé des DSA *de novo* sans pour autant rejeter leur greffon (Porcheray, *et al.* 2009). La production de ces Ac coïncide avec la reconstitution du compartiment B, notamment de B transitionnels, sans compromettre cette tolérance. Ces protocoles de greffes combinées permettent donc d'aboutir à l'induction de tolérance dans certains cas, mais bien que la greffe de moelle osseuse soit régulièrement réalisée pour des patients atteints de cancers, le risque mortel de réaction du greffon contre l'hôte (ou GVHD pour *graft versus host disease*) empêche l'utilisation en routine des greffes de moelle osseuse pour ce type d'application (Barton-Burke, *et al.* 2008).

L'utilisation de cellules hématopoïétiques souches périphériques CD34⁺ à la place des cellules de moelle osseuse a aussi été réalisée lors de deux essais avec 4 et 6 patients (Millan, *et al.* 2002; Scandling, *et al.* 2008). Ces deux études démontrent qu'il est alors possible d'induire un chimérisme mixte sans GVHD mais l'arrêt des IS a été obtenu seulement dans deux cas. La même équipe a présenté une étude similaire où 15 patients ont reçu une transplantation rénale avec des donneurs vivants HLA compatibles intrafamiliaux, suivie d'un traitement d'induction d'irradiation lymphoïde totale, de globulines antithymocytes polyclonales (ATG), puis d'une injection de cellules CD34⁺ et CD3⁺ du donneur (Busque, *et al.* 2011). Un chimérisme mixte a été observé chez 12 des 15 patients, et 8 ont pu être sevrés d'immunosuppresseurs sans rejet. Les biopsies protocolaires à un an ne montraient aucun signe de rejet alors que la fonction rénale était excellente. Et aucun patient n'a présenté de GVHD, arguant encore le risque minoré de ce protocole par rapport à des protocoles de transplantation de moelle osseuse (Busque, *et al.* 2011). Cette nouvelle étude d'induction de tolérance semble donc prometteuse au moins dans le cadre de donneur HLA-compatibles vivants.

Ainsi, ces résultats montrent que la tolérance peut être induite par la greffe combinée de cellules hématopoïétiques et d'un rein. Cependant, parmi tous ces essais, peu de patients sont devenus durablement tolérants, la plupart avec des donneurs vivants HLA-compatibles. De plus, ce type de protocole est difficilement applicable en routine, de par son coût, et des risques pour le receveur.

b) La tolérance périphérique

Les mécanismes naturels de tolérance périphérique permettent le contrôle des cellules T matures qui ont échappé à la délétion centrale thymique durant le développement fœtal et qui présentent un risque potentiel d'auto-immunité. Plusieurs mécanismes ont été exploités pour induire cette tolérance périphérique :

- la déplétion lymphocytaire T : puisque le rejet d'allogreffe est un processus dépendant des lymphocytes T, la déplétion des lymphocytes T du receveur avant la transplantation a été testée pour induire une tolérance. Ainsi, Strober *et al.* ont décrit un protocole d'induction de tolérance par irradiation lymphoïde totale associée à l'injection d'ATG (Strober, *et al.* 1989; Strober, *et al.* 2000). Mais parmi les 28 patients testés, seul un patient avait encore une fonction rénale normale en absence d'IS plus de 12 ans après l'arrêt des traitements. Par ailleurs, ce patient présentait une forte réponse anti-donneur dans un test de réaction lymphocytaire mixte, suggérant que, dans ce cas au moins, la délétion clonale n'était pas le mécanisme d'induction de tolérance. L'approche de déplétion lymphocytaire T semble une approche logique pour éliminer les lymphocytes T allorésistants mais semble insuffisante pour induire une tolérance durable, d'après cet essai. Dans l'idée que cette déplétion n'était pas assez profonde, l'utilisation de l'alemtuzumab (Ac monoclonal anti-CD52 déplétant ou Campath-1) a été réalisée pour induire une tolérance chez 7 patients, mais sans succès (Kirk, *et al.* 2003). Ainsi, des mécanismes autres que la déplétion clonale T semblent nécessaires pour induire une tolérance.

Malgré une déplétion lymphocytaire, la présence de cellules T mémoires est possible et peut être responsable de rejet d'allogreffe (Valujskikh and Lakkis 2003). En effet, ces cellules sont résistantes à certaines stratégies immunosuppressives incluant une résistance au blocage de costimulation (Yang, *et al.* 2007), une résistance aux thérapies de déplétion par les Ac (Gallon, *et al.* 2006), une résistance à l'apoptose (Wu, Z., *et al.* 2004) et des réponses de réactivation à l'antigène exacerbées qui nécessitent une costimulation minimale, voire nulle (Cho, *et al.* 2000). Ainsi, Nadazdin *et al.* ont récemment montré chez le primate non humain que le taux de lymphocytes T mémoires avant transplantation était plus important chez les animaux rejetant leur greffon que ceux devenus tolérants (Nadazdin, *et al.* 2011). De plus, malgré la présence de lymphocytes T mémoires chez les 2 groupes de singes, seuls ceux rejetant leur greffon présentaient une augmentation de la fréquence de lymphocytes T mémoires spécifiques au donneur. Le ciblage de cette population cellulaire semble une stratégie nécessaire pour l'induction efficace d'une tolérance. Ainsi, il pourrait être possible d'inhiber spécifiquement les cellules mémoires en ciblant leurs molécules d'adhésion, par exemple par l'Ig anti-LFA3 (alefacept, ciblant le CD2) qui a montré son efficacité contre les cellules T mémoires-effectrices chez le primate non humain (Weaver, *et al.* 2009). La différence de fréquence de cellules mémoires entre l'Homme ou des primates non humains et des animaux de laboratoire qui

sont très peu soumis à des antigènes et ont donc une faible fréquence de lymphocytes T mémoires avant la transplantation peut, en partie, expliquer l'échec de protocoles d'induction de tolérance chez l'Homme ou le primate non humain qui réussissent dans des modèles de rongeurs (Nadazdin, *et al.* 2011).

Une approche originale a récemment été testée par l'équipe de Terasaki, où les patients, avant l'induction d'une déplétion par un traitement non myélo-ablatif avec addition de Bortézomib, furent immunisés soit par des transfusions sanguines et l'injection de cellules souches hématopoïétiques du donneur soit par l'injection de cellules souches hématopoïétiques seules (Trivedi, *et al.* 2010). Dans cet essai, et avec un suivi moyen de 9,3 mois seulement, tous les patients présentaient une fonction stable de leur greffon dont 4 en l'absence d'IS, 7 avec des faibles doses de corticoïdes et 7 avec un traitement conventionnel. Cet essai, basé sur l'immunisation avant la transplantation, est prometteur mais un suivi plus long est nécessaire.

- le blocage de la costimulation : l'activation des lymphocytes T nécessite la présentation antigénique par une molécule de CMH et aussi un signal de costimulation délivré par l'interaction de CD28 avec B7-1/2 (CD80/CD86) présent sur les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) ; l'absence de ce signal de costimulation conduit à l'anergie des cellules T (figure 1). Par ailleurs, l'interaction CTLA4 avec B7-1/2 se fait avec une affinité plus forte, empêchant l'induction du signal CD28/B7-1/2. D'autres voies de costimulation ont un rôle important dans l'activation lymphocytaire et pourraient être utilisées pour induire une transplantation rénale (PD1, ICOS, BTLA,...) (figure 1). Pour l'heure, la stimulation ou le blocage de ces voies n'ont pas été décrits dans des protocoles d'induction de tolérance chez l'Homme mais pour le maintien de la greffe rénale en option des traitements actuels.

L'utilisation du Belatacept, une protéine de fusion entre le fragment cristallisable (Fc) de l'IgG1 humaine et le domaine extracellulaire de CTLA4 qui bloque par compétition la costimulation dépendante du CD28 est en évaluation en transplantation rénale (Larsen, *et al.* 2005). Ainsi, une étude de phase III a montré que le Belatacept permettait une survie du greffon et du patient similaire à la cyclosporine A alors que la fonction rénale à 2 ans était meilleure dans le groupe Belatacept tout comme le profil de risque cardiovasculaire (Larsen, *et al.* 2010). Par ailleurs, Bestard *et al.* ont montré que l'utilisation du Belatacept, en association avec le sirolimus, un inhibiteur de la voie mTOR (*mammalian target of rapamycin*), augmentait le nombre de lymphocytes T régulateurs (Treg) par rapport aux lymphocytes T mémoires (Bestard, *et al.* 2011). Ces résultats préliminaires montrent que l'association d'agents agissant selon plusieurs mécanismes, ici la déplétion T par l'ATG, le blocage de costimulation et l'utilisation d'inhibiteurs de la voie mTor, peuvent promouvoir une meilleure acceptation du greffon par l'inhibition de la réponse allospécifique contre le donneur (Bestard, *et al.* 2011).

De même, Poirier *et al.* ont récemment montré que l'utilisation d'un Ac humain chimérique antagoniste monovalent anti-CD28, sc28AT, qui se fixe au CD28 sans induire de signal de costimulation et ne bloque pas l'interaction CTLA4/B7-1/2, agissait en synergie avec des inhibiteurs de calcineurine pour promouvoir l'acceptation d'une greffe rénale ou cardiaque chez le primate non humain (Poirier, *et al.* 2010). De plus, cette équipe a montré que le blocage sélectif de CD28 affectait directement les cellules T effectrices tout en induisant une augmentation du nombre de lymphocytes T reg, le CTLA4 et d'autres molécules immunorégulatrices telles que l'enzyme IDO, l'hème oxygénase 1 (HO-1) et le *transforming growth factor* β 1 (TGF β 1).

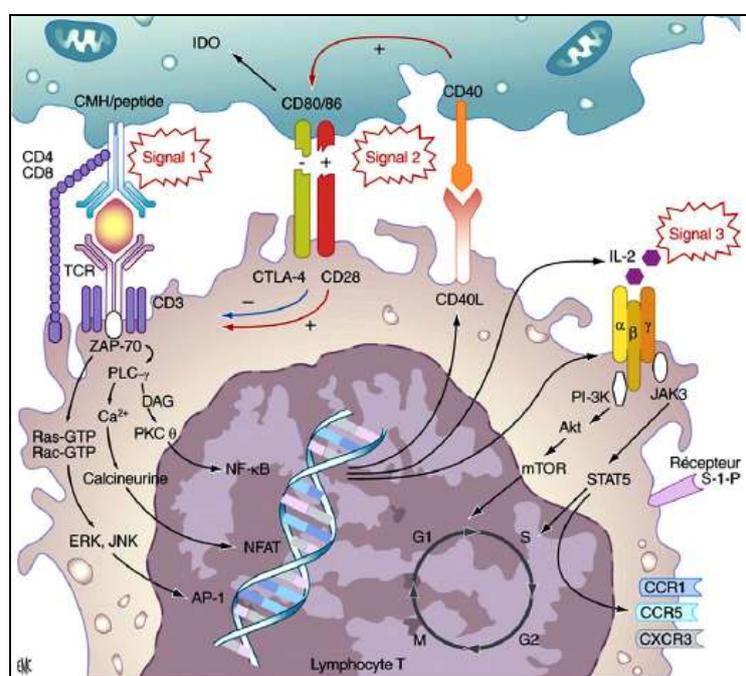


Figure 1: Représentation des étapes de l'activation lymphocytaire T, issu de Thervet, *et al.* 2011.

Le premier signal est issu de la reconnaissance du récepteur des lymphocytes T (TCR) avec son ligand (CMH). Des voies de signalisation pro-inflammatoires sont alors mises en jeu, incluant la participation des facteurs de transcription NF- κ B, NFAT et AP-1. Le second signal est délivré par la liaison des molécules de costimulation (CD28, *Inducible costimulator-ligand* (ICOS-L), CD40L). Le troisième signal est induit par la fixation de l'IL-2 sur son récepteur, CD25. Celui-ci délivre un message permettant la prolifération, la sécrétion de cytokines et de chémokines, ainsi que des signaux protégeant de la mort par apoptose. IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase ; ZAP-70 : protéine tyrosine-kinase; PLC : phospholipase C; CTLA-4 : *Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4*; DAG : Diacylglycérol; PKC : Protéine Kinase C; PI-3K : Phospho-Inositol-3 Kinase; Akt : protéine kinase; STAT : *Signal Transducer and Activator of Transcription*; mTOR : *mammalian Target of Rapamycine*; G1-S-G2-M : phases du cycle cellulaire; JAK3 : *Janus Kinase 3*.

- la régulation lymphocytaire : les lymphocytes Treg qui régulent ou suppriment l'activation T peuvent être des acteurs du maintien d'une tolérance périphérique. Actuellement, aucune étude n'a rapporté l'utilisation de ces cellules en clinique, mais une étude européenne, « the ONE study », est en cours de lancement. Cette étude est basée sur une méthode d'enrichissement des Treg spécifiques du donneur et de résultats obtenus chez la souris où l'utilisation de ces cellules diminue le rejet de greffe de peau (Sagoo, *et al.* 2011). Etant donné leur capacité à inhiber les réactions allogéniques, cette stratégie semble intéressante et les résultats de cette étude sont très attendus. Cependant, l'utilisation de ces cellules est risquée, notamment par la plasticité cellulaire où des Treg peuvent se comporter en lymphocytes T effecteurs et produire des cytokines pro-inflammatoires (Zhou, *et al.* 2009).

Puisque les cellules T anergiques ont des activités suppressives sur les lymphocytes T, notamment en inhibant la prolifération de lymphocytes T dans le cadre de rejet de greffe de peau chez la souris (Chai, *et al.* 1999), leur utilisation est envisageable. Ainsi, une étude a montré l'obtention d'une tolérance d'une allogreffe rénale de plus d'un an chez 3 primates non humains sur 6 après transfusion de cellules T anergiques générées *ex vivo* (Bashuda, *et al.* 2005). L'hypothèse des auteurs est que les lymphocytes T alloréactifs naïfs ont été inactivés dans le greffon par transfert adaptatif. Mais malgré qu'un seul des 6 animaux développa un rejet aigu, des signes de rejet chronique furent observés chez les animaux devenus tolérants.

Pour finir, les lymphocytes T ont longtemps été considérés comme les seules cellules à cibler pour établir une tolérance par leur rôle prépondérant lors de rejet d'allogreffe chez l'Homme alors que les lymphocytes B étaient considérés comme des cellules auxiliaires. Or, plusieurs études montrent que les lymphocytes B exercent aussi des fonctions immuno-régulatrices (Vitale, *et al.* 2010). En effet, des souris déficientes en lymphocytes B ne sont pas capables de maîtriser l'inflammation dans un modèle d'encéphalite expérimentale auto-immune (EAE) (Wolf, *et al.* 1996). Tous les lymphocytes B ne possèdent pas cette capacité et Fillatreau *et al.* ont montré dans un modèle murin que les lymphocytes B impliqués dans le contrôle de l'inflammation sont ceux produisant de l'interleukine 10 (Il-10) et sont appelés des lymphocytes B10 (Fillatreau, *et al.* 2002). Chez l'Homme, Blair *et al.* ont décrit une population de lymphocytes B, qui en réponse à une stimulation par le CD40, empêche la différenciation des lymphocytes T activés en lymphocytes T helper 1 (Th1) via la sécrétion d'Il-10 mais pas de TGFβ1 (Blair, *et al.* 2010). Ces lymphocytes B produisant de l'Il-10 semblent être des lymphocytes B immatures, caractérisés par le phénotype CD19⁺CD24^{high}CD38^{high}. Ces lymphocytes B régulateurs (Breg) expriment aussi fortement le CD1d et le CD5 suggérant que les propriétés des Breg et B10 précédemment décrits dans des modèles animaux sont communes aux Breg décrits chez l'Homme (Blair, *et al.* 2010).

Par ailleurs, l'implication de la fonction des lymphocytes B en transplantation a été montrée par Deng *et al.* dans un modèle de transplantation cardiaque chez des souris déficientes en cellules B (Deng, *et al.* 2007). Le greffon est immédiatement rejeté et insensible à la tolérance induite par un Ac anti-CD45RB. De plus, des lymphocytes B activés par le CD40 sont responsables, via la stimulation du CD80 et du CD86, de la conversion de lymphocytes T effecteurs en Treg (Zheng, *et al.* 2010; Tu, *et al.* 2008). Bien que la production d'Il-10 ou encore de TGF β 1 n'est pas attribuée à ces lymphocytes B, ces études démontrent aussi des capacités régulatrices des lymphocytes B.

Ces cellules n'étant pas très bien caractérisées, notamment chez l'Homme, aucun essai d'induction de tolérance utilisant ces cellules n'est en cours en clinique. Mais ces cellules présentent un fort potentiel d'immunorégulation en transplantation.

Les résultats de certaines de ces approches sont encourageants puisque l'état de tolérance peut être obtenu intentionnellement dans certains cas. Mais soit les protocoles sont trop lourds pour être mis en place en routine, soit les résultats sont aléatoires, et donc trop risqués pour les patients. Il est alors indispensable d'améliorer nos connaissances des mécanismes immunologiques qui se déroulent après la greffe ou de développer d'autres stratégies.

3) La tolérance partielle

Face à la difficulté d'établir une tolérance vraie, Roy Calne suggéra que la déplétion en lymphocytes T pourrait permettre la survie à long terme de la greffe en association à des doses réduites d'immunosuppresseurs et appela cet état la « prope tolérance » (Calne, *et al.* 1998), ou tolérance partielle (Cortesini and Suciu-Foca 2004). Plusieurs protocoles cliniques ont permis l'établissement d'un tel état permettant le maintien d'une fonction du greffon satisfaisante avec un traitement immunosuppresseur minimal dans le but de diminuer le risque de toxicité médicamenteuse et les complications infectieuses et tumorales, mais les bénéfices à long-terme de cette approche restent à éclaircir (Calne and Watson 2011; Watson, *et al.* 2005). De plus, pour envisager une réduction progressive des traitements immunosuppresseurs, il est nécessaire d'identifier les patients à faible risque immunologique. L'utilisation de biomarqueurs de faible risque immunologique ou de tolérance permettrait de réduire les risques encourus par les patients.

4) La tolérance opérationnelle

Alors qu'aucun protocole pour induire une tolérance à une greffe rénale n'est vraiment établi et que seulement peu de cas de tolérance induite ont été rapportés, plusieurs cas de tolérance spontanée ont été décrits (Orlando, *et al.* 2010). En transplantation rénale, ces cas de tolérance sont rares et font souvent suite à un arrêt des traitements sur décision du patient lui-même, par non-observance. Mais l'occurrence de ces cas de tolérance spontanée pourrait être sous-estimée puisque la non-observance du traitement est plus fréquente qu'elle n'est avouée (Greenstein and Siegal 1998; Germani, *et al.* 2011). Comme précisé précédemment (« définition de la tolérance : un ou des états », p.1), puisque l'accès au greffon est souvent impossible chez ces patients, la tolérance est définie comme opérationnelle par des critères fonctionnels, c'est-à-dire une survie prolongée d'une allogreffe d'organe avec une fonction stable du greffon en l'absence de traitement immunosuppresseur chez un receveur immunocompétent (Ansari and Sayegh 2004).

L'établissement de biomarqueurs de la tolérance opérationnelle permettrait d'identifier parmi les patients stables sous immunosuppression ceux qui pourraient potentiellement présenter un état de tolérance et bénéficier d'une diminution ou d'un arrêt des traitements immunosuppresseurs (Ashton-Chess, J., *et al.* 2009). Nous allons détailler les études phénotypiques et transcriptionnelles conduites dans le but de mieux comprendre les mécanismes de tolérance. Mais tout d'abord, il est nécessaire de rappeler certaines contraintes méthodologiques liées à ces études.

a) Contraintes méthodologiques des patients opérationnellement tolérants

i. Le problème de la population contrôle

Depuis que les premiers cas de patients ayant une fonction stable de leur greffon sans IS ont été décrits en clinique (Roussey-Kesler, *et al.* 2006), le choix d'un groupe contrôle reste problématique. Ce paradoxe est dû à la situation clinique de ces patients qui présentent une fonction stable du transplant mais ne reçoivent plus d'IS.

Les patients dits « stables » présentent une fonction stable de leur greffon, selon les mêmes caractéristiques fonctionnelles que les patients opérationnellement tolérants. De plus, ce groupe de patients semble être le plus cliniquement pertinent puisque ce sont ces individus qui seront considérés comme « candidats » à une diminution de l'IS. Cependant, ces patients sont sous IS contrairement aux patients tolérants. Il est donc important de comparer également ces patients à des individus témoins, par définition sans IS, tout en gardant à l'esprit que ces patients ne sont pas greffés, ce qui établit également un biais important dans ce contrôle.

Un autre contrôle possible est celui des patients présentant des lésions de rejet chronique humoral actif (RCHA) (p. 23). Toutefois ces patients sont sous IS et présentent une dégradation de

leur fonction, absente par définition chez les patients tolérants. Cependant, en l'absence de biopsies rénales, il est difficile d'exclure la présence d'une forme de rejet « subclinique » dans le greffon des patients opérationnellement tolérants. Il semble donc intéressant d'utiliser les patients en RCHA comme contrôles. Ce groupe permet ainsi de faire la différence entre marqueurs spécifiques de tolérance et marqueurs de rejet ou tout du moins de lésions tissulaires.

L'utilisation de plusieurs groupes contrôles semble donc nécessaire dans les études de caractérisation des patients tolérants afin d'éviter d'associer des facteurs confondants à l'état de tolérance (présence d'IS, de lésions tissulaires, ...).

ii. Méthodologie utilisée

L'approche transcriptionnelle est l'approche utilisée par notre équipe pour identifier des biomarqueurs et tenter de comprendre les mécanismes de la tolérance. En effet, cette approche a l'avantage de pouvoir se baser sur les outils à haut débit que sont les puces à ADN pour mesurer l'ensemble des gènes transcrits à un temps donné, alors que l'approche protéique est pour l'instant plus limitée. Même si il existe des outils pour l'analyse à haut débit du protéome, ces outils sont plus récents et la validation des résultats est plus lourde à mettre en place, voire plus limitée. Dans le cadre des puces à ADN, même si le problème de faux positifs reste un problème majeur, la validation individuelle des résultats de puces à ADN par PCR quantitative permet d'éliminer les faux-positifs éventuels. Ces problèmes sont le sujet du chapitre d'un livre auquel j'ai participé, présenté en annexe 3 (p.148) : Pan Stanford Series on Nanobiotechnology Volume 2, „: *Functional Proteomics and Nanotechnology-based Microarrays*, Chapter 10: *Organ transplants and gene microarrays*,: *Functional Proteomics and Nanotechnology-based Microarrays*, Danger R., Soullillou J.P., Brouard S., Nicolini C. (Eds. Nicolini C., LaBaer J.), p. 229-256, 2010, London - New York - Singapore. D'ailleurs, les résultats des puces a ADN doivent toujours être confirmés par d'autres technologies comme la PCR quantitative ou avec des outils protéiques sur des échantillons indépendants. C'est d'ailleurs une limite de nos études ; le nombre d'individus opérationnellement tolérants étant faible, nous ne pouvons valider nos résultats que sur un nombre limité d'échantillons.

iii. Choix du compartiment à analyser

Aujourd'hui, l'examen histologique de la biopsie et son interprétation selon la classification de Banff, est le standard pour évaluer le statut de la greffe rénale (Sis, *et al.* 2010). D'ailleurs, c'est sur la biopsie que beaucoup d'études transcriptionnelles ont été réalisées pour mieux comprendre les mécanismes de rejet d'allogreffe. Cependant, les patients tolérants qui ont arrêté leur traitement pour non observance, refusent généralement toutes les procédures invasives. De plus, la biopsie,

quoique bien maîtrisée actuellement, représente un risque et son interprétation reste toujours dépendante de l'anatomopathologiste (Thaumat, *et al.* 2007).

En transplantation rénale, les urines, directement au contact du greffon, semblent être un compartiment intéressant à étudier et leur recueil a l'avantage d'être non-invasif (Anglicheau, Dany and Suthanthiran 2008). De fait, récemment, les urines apparaissent comme un compartiment de choix pour l'identification des épisodes de rejets aigus (Afaneh, *et al.* 2010). Newell *et al.* ont mesuré l'expression de 18 gènes dans les urines de patients opérationnellement tolérants (Newell, *et al.* 2010). Ainsi, ils ont montré une augmentation significative du transcrit CD20 dans les urines des patients tolérants par rapport aux patients stables, reflétant l'augmentation du nombre de cellules B en périphérie chez ces patients. Ce compartiment semble donc utile pour l'identification de biomarqueurs.

Actuellement, le sang est le compartiment le plus utilisé pour l'analyse des gènes des patients transplantés notamment les patients tolérants. La mise en place d'un test pour le diagnostic de transplantations cardiaques a démontré son potentiel (Mehra, *et al.* 2008). De plus, Horwitz *et al.* ont démontré que l'expression des gènes dans les PBMC corrélait avec le diagnostic histologique de rejet cellulaire aigu dans des biopsies endomyocardiques (Horwitz, *et al.* 2004). Cependant, les PBMC ne sont pas forcément le miroir du greffon. Par exemple, le nombre de transcrits de granzyme B augmente dans les biopsies de patients atteints de RCHA alors qu'il diminue dans les PBMC, ce qui peut s'expliquer par une accumulation des cellules sanguines exprimant granzyme B dans le greffon (Ashton-Chess *et al.*, 2009a). Ces résultats n'excluent pas l'utilisation de molécules issues du sang comme outils diagnostiques ou pronostiques, mais peuvent limiter l'interprétation mécanistique de ces molécules. Ces résultats sont d'ailleurs discutés dans la revue présente en annexe 4 (p. 150): What can we learn from the transcriptional characterization of spontaneously tolerant transplant recipients?, 2010, *Curr Opin Organ Transplant*. 2010 Aug;15(4):435-40) [Danger R](#), Racapé M, Souillou JP, Brouard S. Toujours à partir du sang périphérique, l'utilisation du sérum ou de plasma est aussi envisageable pour la recherche de marqueurs protéiques ou de petits ARN. Ainsi, Mitchell *et al.* montrent que la mesure de miR-141 dans le plasma permet de discriminer 25 patients atteints d'un cancer de la prostate de 25 individus sains avec une aire sous la courbe (AUC) d'une courbe ROC (*Receiver operating curve*) de 0,907 (Mitchell, *et al.* 2008).

b) Analyses phénotypiques des cellules périphériques des patients opérationnellement tolérants

Moins d'une centaine de cas de tolérance spontanée de patients transplantés rénaux a été décrite dans le monde (tableau 1, p. 14). En ce qui concerne la première cohorte, décrite en 1980, Zoller *et al.* ont identifié 48 patients qui avaient arrêté leur traitement immunosuppresseur dont 23 au moins 244 jours parmi le registre national américain (soit plus de 6 000 patients transplantés rénaux) (Zoller, *et al.* 1980). Parmi eux, seuls 6 patients ont conservé un état de tolérance plus de 3 ans. Les auteurs en concluaient que l'arrêt des immunosuppresseurs était à proscrire car trop risqué, la plupart des patients arrêtant leur traitement déclarant un rejet aigu et/ou perdant leur greffon (Zoller, *et al.* 1980). La seconde cohorte de 10 patients a été décrite par notre groupe en 2006 (Roussey-Kesler, *et al.* 2006). L'historique clinique de ces 10 patients opérationnellement tolérants ne diffère pas de manière notable des autres patients transplantés rénaux. Ainsi, la moyenne des incompatibilités HLA est de $3 \pm 1,5$, la moitié des patients ont eu des épisodes de rejets aigus avant l'arrêt des immunosuppresseurs, 6 patients sur 9 présentaient des immunisations anti-HLA, *etc.* Par contre, les donneurs étaient plus jeunes que la moyenne d'âge des donneurs et que les receveurs eux-mêmes. Ce point est à rapprocher de l'observation que l'âge du donneur influence la survie du greffon, l'augmentation de l'âge du donneur étant associée à une diminution de la survie du greffon (Lee, C. M., *et al.* 2000; Carter, *et al.* 2000).

Ces 10 patients font l'objet d'une description clinique actualisée avec un suivi de plus de 10 ans et avec l'addition de 17 autres patients opérationnellement tolérants (Brouard, *et al. en préparation*). Ainsi, au total, le traitement immunosuppresseur a été arrêté après une médiane de 10 ± 7 ans après la transplantation et la tolérance dure depuis une médiane de 9 ± 6 ans. Les raisons d'arrêt des immunosuppresseurs sont la non-observance pour 19 des patients, la survenue de désordres lymphoprolifératifs pour 5 patients, un cancer de peau, un cancer rénal et une toxicité des inhibiteurs de calcineurine. Comme dans la description précédente, l'historique clinique de ces patients ne diffère pas de manière notable de celui des patients transplantés rénaux stables sous IS, par exemple, la moyenne des incompatibilités HLA est de $3 \pm 2,25$ et 10 des 27 (37%) patients ont eu des épisodes de rejets aigus avant l'arrêt des immunosuppresseurs. Cependant, dans cette étude, les critères cliniques des patients opérationnellement tolérants ont été comparés à un groupe de patients stables sous IS apparié sur la durée de survie du greffon (avant et après arrêt de l'IS), permettant une comparaison statistique plus rigoureuse. Dans ce cas, l'âge des donneurs n'est pas retrouvé significativement différent entre les 27 patients opérationnellement tolérants et la population contrôle de 26 patients transplantés sous IS. Cette observation n'est pas contradictoire

Tableau 1: Etudes décrivant des patients opérationnellement tolérants

Nombre de patients opérationnellement tolérants	Donneur vivant/décédé	Nombre d'incompatibilités HLA	IS avant l'arrêt	Raison de l'arrêt du traitement	Durée de la tolérance	Référence
1	Vivant	HLA identique	AZA + CS	Non-observance	>36 mois	(Uehling, <i>et al.</i> 1976)
6	Les deux				>3 ans	(Zoller, <i>et al.</i> 1980)
6	Vivant		AZA + CS		3 à 38 ans	(Starzl, <i>et al.</i> 2004)
1	Vivant	3	DST, puis CsA+AZA+CS	Non-observance	> 5 ans	(Burlingham, <i>et al.</i> 1995)
1	Vivant	3	ND	PTLD	>3 ans	(Christensen, <i>et al.</i> 1998)
2	Vivant et décédé	0 pour l'un, 2 pour l'autre	thérapie d'induction pour l'un (OKT3); pas pour l'autre	Non-observance	> 5 ans pour l'un, > 27 ans pour l'autre	(VanBuskirk, <i>et al.</i> 2000)
1	ND	1 de classe I, (classe II pas déterminée)	AZA + CS	Non-observance	> 9 ans	(Fischer, <i>et al.</i> 1996)
4	ND	ND	ND	Non-observance	moyenne : 27 mois	(Owens, <i>et al.</i> 1975)
1	ND	ND	ND	Non-observance	40 mois	(Hussey 1976)
10	les deux	moyenne : 3 ± 1.5	thérapie d'induction: 6 patients/10, inhibiteurs de calcineurine : 7 patients/10	Non-observance (7), raison médicale (2)	moyenne : 9 ± 5 ans	(Roussey-Kesler, <i>et al.</i> 2006)
27	les deux	moyenne : 3 ± 2,25 (5 HLA-identiques)		Non-observance (19), raison médicale (7)	moyenne : 9 ± 6 ans	(Brouard, <i>et al.</i> 2011)
25	5 cadavériques, 17 vivants			Non-observance (20), raison médicale (2)	de 1 à 32 ans	(Newell, <i>et al.</i> 2010)
35	7 cadavériques, 28 vivants			Non-observance (31), raison médicale (3)	de 1 à 32 ans	(Sagoo, <i>et al.</i> 2010)

PTLD: désordre lymphoprolifératif post-transplantation; AZA + CS : azathioprine + corticostéroïde ; DST : transfusion spécifique du donneur ; CsA : cyclosporine A

avec la précédente, où la moyenne d'âge des donneurs des patients tolérants était plus faible que celle de la population générale des patients transplantés : pour les patients tolérants greffés depuis des dizaines d'années, les critères de greffe étaient moins étendus, notamment l'âge du donneur maximal était moins élevé que de nos jours. Cela explique l'âge plus jeune par rapport à la population générale actuelle et non pas par rapport à une population présentant la même durée post-transplantation. De plus, le phénomène de tolérance est peut être plus observable chez des patients ayant reçu des reins de bonne qualité, notamment de patients plus jeunes.

Dans ce groupe, 5 patients (18,5%) ont reçu une transplantation HLA identique provenant de leur frère ou sœur non jumeau et 5 patients n'ont reçu aucune transfusion sanguine (Brouard, *et al. en préparation*). De plus, bien qu'à peu près la moitié d'entre eux ont arrêté leur traitement immunosuppresseur de façon progressive comme cela avait été décrit dans la première étude, l'analyse d'une cohorte plus grande montre qu'un tiers ont arrêté leur traitement brutalement. Ainsi, la procédure d'arrêt progressive des immunosuppresseurs n'est peut être pas la clé pour favoriser la transition vers un état de tolérance opérationnelle.

Après l'arrêt des immunosuppresseurs, 8 patients ont développé des *Ac de novo*, dont 4 sont des DSA. Cependant, malgré l'absence de traitement pour prévenir une réponse humorale, seuls 2 de ces patients ont développé une perte de fonction du greffon, 6 mois et 4 ans après la détection des DSA. Les 6 autres patients présentant une immunisation *de novo* conservent une fonction stable de leur greffon depuis une période d'observation médiane de 7 ans (Brouard, *et al. en préparation*). Ces résultats sont concordants avec les observations faites par Strober *et al.* qui ont trouvé une réactivité anti-donneur chez un patient tolérant depuis plus de douze ans en réaction mixte lymphocytaire (Strober, *et al.* 2000). De plus, certains de ces patients tolérants ont conservé la capacité de répondre à d'autres sollicitations immunologiques (Ballet, *et al.* 2006) et ne semblent donc pas immuno-régulés de manière non-spécifique. Mais là encore, l'étude de Ballet *et al.* montre une hétérogénéité chez les patients tolérants dans leur réponse à une vaccination antigrippale. Ces patients ne présentent pas d'incidence d'infection plus élevée en dépit d'une surveillance post-transplantation s'étendant souvent sur plus de 10 ans, renforçant le fait que la tolérance est spécifique et ne résulte pas d'une immunodéficience généralisée.

Les analyses transcriptionnelles du répertoire du TCR des lymphocytes T sanguins ont montré des altérations du CDR3 (région hypervariable de la chaîne du TCR β) et, dans les cellules T sélectionnées, une absence d'accumulation de transcrits de cytokines, suggérant une réponse atténuée de ces clones cellulaires (Brouard, *et al.* 2005). Ces altérations du CDR3 pourraient s'expliquer par délétion clonale, par un épuisement de certains clones ou par la prédominance de familles de cellules T spécifiques aux dépens d'autres familles (Alvarez, *et al.* 2005). Les auteurs d'une étude similaire chez des patients présentant une survie de leur allogreffe rénale de plus de 9

ans envisagent également l'hypothèse d'une perte des cellules effectrices ou d'une augmentation des cellules T particulières ayant des capacités régulatrices (Alvarez, *et al.* 2005).

Puisqu'il semble y avoir une régulation de la réponse immune chez ces patients, notre équipe s'est intéressée aux lymphocytes Treg, caractérisés par une expression des marqueurs CD4, CD25 (récepteur à l'IL-2), *Forkhead Box P3* (FOXP3) et une absence du CD127 (Braudeau, *et al.* 2007; Louis, *et al.* 2006). Ces études ont montré que les patients tolérants présentaient un nombre de Treg plus élevé par rapport aux patients en rejet chronique, tout comme une diminution des transcrits de TLR4 et de MyD88 dans les PBMC (Braudeau, *et al.* 2008). Cependant, ces patients opérationnellement tolérants présentent un nombre normal de Treg et de transcrits de TLR4 et de MyD88 dans les PBMC par rapport aux patients stables et aux volontaires sains. Une étude de l'équipe de Coelho a confirmé un nombre de Treg plus élevé chez quatre patients tolérants par rapport à des patients en RCHA mais pas par rapport à des stables (Moraes-Vieira, *et al.* 2010). Le problème du groupe contrôle précédemment discuté (« le problème de la population contrôle », p. 10) est ici clairement illustré. L'étude montre que les patients tolérants présentent une diminution de l'activation de la voie IL4/STAT6 dans les monocytes mais pas dans les lymphocytes T. L'hypothèse selon laquelle les monocytes pourraient être impliqués dans une présentation antigénique et dans l'induction d'une réponse effectrice moins efficace reste à confirmer. Enfin, récemment, une étude du réseau européen *Indices Of Tolerance* (IOT) a montré que les patients opérationnellement tolérants n'avaient pas plus de lymphocytes Treg que des patients stables ou des individus sains et même que des patients en rejet chronique (Sagoo, *et al.* 2010). Cependant, le nombre de lymphocytes T CD4⁺CD25^{int}, étant majoritairement des lymphocytes activés, était plus faible chez les tolérants que chez les autres groupes, suggérant une régulation du système immunitaire, au moins au niveau du nombre de lymphocytes T activés.

En 2006, dans son analyse phénotypique de huit patients opérationnellement tolérants, notre équipe avait rapporté une augmentation du nombre de cellules B périphériques chez ces patients par rapport aux patients en rejet chronique et aux patients stables (Louis, *et al.* 2006), observation retrouvée dans quatre autres études récentes (Newell, *et al.* 2010; Sagoo, *et al.* 2010; Pallier, *et al.* 2010; Lozano, *et al.* 2011). Nous avons également démontré une augmentation du nombre en valeur absolue de cellules B mémoires chez ces patients (Pallier, *et al.* 2010; Lozano, *et al.* 2011). Dans notre étude, la caractérisation des cellules B totales montre un profil inhibé de ces cellules avec une diminution du ratio CD32a/CD32b (Ravetch JV et Lanier 200), une augmentation du ratio *B cell activating factor receptor/ B cell activating factor* (BAFFR/BAFF) et une augmentation de la molécule *B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1* (BANK1), une molécule inhibitrice de l'activation des cellules B par le CD40 (Aiba, *et al.* 2006). De plus, la mise en évidence d'une augmentation des cellules CD19⁺CD1d⁺ et CD19⁺CD5⁺ est en faveur d'une population CD19⁺CD1d⁺CD5⁺ décrites comme

une population B régulatrice (Iwata, *et al.* 2010). Similairement, l'étude de Newell *et al.* montre une augmentation du nombre de lymphocytes B transitionnels CD19⁺CD38⁺CD24⁺IgD⁺ (Newell, *et al.* 2010), aussi décrite pour contenir la population des Breg sécréteurs d'IL-10 (Blair, *et al.* 2010). Ces résultats suggèrent un rôle potentiel des lymphocytes B dans le phénomène de tolérance opérationnelle. Enfin, l'article Pallier *et al.* est le premier travail de cette thèse qui est présenté dans la partie : « Résultats de l'étude 1 », (p. 58).

Parmi les autres cas de tolérance décrits (tableau 1), peu d'informations mécanistiques ont été avancées. Nous pouvons toutefois noter le cas d'un patient de 21 ans, ayant reçu le rein de sa mère à 11 ans, puis le rein de son père à 15 ans, tolérant plus de 3 ans après arrêt de son traitement pour cause de désordre lymphoprolifératif post-transplantation (Christensen, *et al.* 1998). Ce patient présentait une absence de réponse aux cellules de ses parents avec faible expression des transcrits de cytokines Th1 (IL-2 et interféron γ (IFN γ)). De plus, VanBuskirk *et al.* ont également présenté le cas de deux patients transplantés rénaux ayant une fonction stable de leur greffon après plus de 5 et 27 ans d'arrêt des traitements (VanBuskirk, *et al.* 2000). Les PBMC de ces patients présentaient une absence de réponse aux antigènes du donneur qui semblait régulée par l'interleukine 10 (IL-10) ou le TGF β 1. Ce dernier point est important puisque Newell *et al.* ont rapporté une augmentation de la production d'IL-10 par les lymphocytes B transitionnels des patients tolérants par rapport aux patients stables (Newell, *et al.* 2010). Puisque les lymphocytes Breg exercent leur fonction par la sécrétion d'IL-10 et/ou de TGF β 1 (Mauri and Ehrenstein 2008), ces résultats sont en accord avec l'augmentation de cellules CD19⁺CD1d⁺CD5⁺ rapportée par Pallier *et al.* et suggèrent encore un rôle régulateur des lymphocytes B dans la tolérance (Pallier, *et al.* 2010).

Finalement, la tolérance opérationnelle chez l'Homme n'est pas un état « stable et indéfini » puisque plusieurs exemples de perte de greffon sont rapportés, même plusieurs années après la greffe (Roussey-Kesler, *et al.* 2006; Zoller, *et al.* 1980; Brouard, *et al.* en préparation; VanBuskirk, *et al.* 2000). Ainsi, sur les 27 patients opérationnellement tolérants étudiés par notre équipe, 8 ont perdu leur greffe dont un pour cause de RCHA et un pour rejet chronique cellulaire en l'absence de dépôt de C4d (Brouard, *et al.* en préparation). Les 4 autres patients pour lesquels une biopsie était disponible montrent seulement des lésions avec présence d'inflammation ou de fibrose interstitielle accompagnée d'atrophie tubulaire (FI/AT) sans dépôt de C4d. Ainsi, il n'est pas possible de déterminer si ces patients, qui présentent pour certains un greffon stable pendant plusieurs décennies, ont perdu leur greffon à cause d'une rupture de tolérance ou seulement par des processus de vieillissement ou d'épuisement du greffon comme c'est le cas dans la population générale de patients stables.

La tolérance opérationnelle semble donc un phénomène actif, mais les cohortes de patients opérationnellement tolérants étudiés présentent des caractéristiques hétérogènes (réponse à la

vaccination, présence d'Ac anti-HLA ou de DSA, etc). Il est pour l'instant difficile de définir s'il existe un ou plusieurs mécanismes de tolérance et même si cette tolérance opérationnelle est dans tous les cas spécifique du donneur.

A défaut de comprendre ce phénomène, l'identification de marqueurs diagnostiques ou prédictifs de la tolérance est indispensable. Ils permettraient de définir parmi une population de patient transplantés rénaux sous immunosuppression ceux pour lesquels un arrêt de traitement pourrait être envisagé, de contrôler cet arrêt ainsi que de les surveiller afin de prévenir toute perte de greffon ; c'est l'un des objectifs des études transcriptomiques réalisées.

c) Etudes du transcriptome des patients opérationnellement tolérants

La première étude d'analyse du transcriptome des patients opérationnellement tolérants a été publiée en 2007 (Brouard, *et al.* 2007). Dans cette étude, 982 gènes furent identifiés comme différentiellement exprimé entre le groupe des patients opérationnellement tolérants (n=17) et le groupe des patients en rejet chronique (n=22). Parmi ces gènes, certains codant pour des marqueurs d'activation lymphocytaire T comme la molécule CD69, pour des cytokines cytotoxiques comme les granzymes, pour des cytokines proinflammatoires comme le TNF α étaient diminués chez les patients opérationnellement tolérants. Ces résultats sont en accord avec une étude précédente qui montrait que le nombre de lymphocytes T CD8⁺CD28⁻ présentant des marqueurs de cellules cytotoxiques différenciées (perforine, granzyme A) était augmenté chez les patients en rejet chronique par rapport aux patients opérationnellement tolérants ou à des individus sains (Baeten, *et al.* 2006). De plus, cette étude a démontré fonctionnellement le caractère cytotoxique de ces lymphocytes T CD8⁺CD28⁻. Au contraire, un enrichissement de gènes identifiés dans les lymphocytes T mémoires (Holm, *et al.* 2004) suggère que les patients tolérants ont un système immunitaire normal avec une réponse dirigée contre le donneur régulée. Par ailleurs, le niveau d'expression du gène de FOXP3 dans les puces à ADN était plus élevé chez les tolérants et les individus normaux que chez les patients en rejet chronique, en accord avec les différentes études montrant une augmentation du nombre de lymphocytes Treg chez les patients opérationnellement tolérants par rapport aux patients en rejet chronique (Braudeau, *et al.* 2007; Louis, *et al.* 2006; Moraes-Vieira, *et al.* 2010; Sagoo, *et al.* 2010). Ces résultats sont donc en faveur d'une inversion du rapport Treg/T effecteurs chez ces patients par rapport aux autres patients transplantés (Louis, *et al.* 2006; Brouard, *et al.* 2007; Baeten, *et al.* 2006).

Les auteurs ont mis en évidence une signature minimale, de 49 gènes, associée à la tolérance (chez 5 tolérants) et permettant de prédire cet état chez 10 patients opérationnellement tolérants de validation (Brouard, *et al.* 2007). Malgré l'absence d'augmentation des transcrits du TGF β 1 chez les patients opérationnellement tolérants, le TGF β 1 est relié à 27% des gènes de la signature de 49

gènes associée à la tolérance. Le TGF β 1 a été décrit comme participant à l'homéostasie des lymphocytes Treg (Hori, *et al.* 2003) et impliqué dans des modèles de tolérance (Torrealba, *et al.* 2004). Cette signature est un premier pas dans l'établissement d'une signature diagnostique de l'état de tolérance, mais nécessite d'être validée sur une plus grande cohorte de patients, ce qui reste impossible aujourd'hui compte tenu de la faible prévalence de ces patients.

Un nouvel algorithme de prédiction utilisant une méthode de ré-échantillonnage a été appliqué sur la mesure en PCR quantitative de 40 gènes de 49 gènes et a permis d'identifier 20 gènes prédisant un état de tolérance avec une AUC d'une courbe ROC supérieure à 0,90 (Brouard, *et al.* 2011). La mesure de ces 20 gènes dans le sang de 144 patients présentant une fonction stable de leur greffon à long-terme (au moins 5 ans après la greffe) a permis d'identifier 5 patients (3,5%) présentant un profil de tolérance. Cette analyse confirme donc la possibilité d'identifier des patients potentiellement tolérants parmi une population de patients stables à long terme sous IS. Même si seul l'arrêt des immunosuppresseurs pourrait effectivement confirmer l'état de tolérance de ces patients, ces résultats montrent que la signature de tolérance n'est pas masquée par la présence des traitements immunosuppresseurs. Ces résultats suggèrent que la tolérance est moins fréquente chez les patients transplantés rénaux que chez les patients transplantés hépatiques où la prévalence de patients tolérants après un arrêt des immunosuppresseurs est estimée en moyenne à 20% (Lerut and Sanchez-Fueyo 2006).

A partir des données de puces à ADN de la première étude des patients opérationnellement tolérants (Brouard, *et al.* 2007), l'analyse des gènes corrélés au phénotype de tolérance et associés aux lymphocytes B en utilisant le logiciel *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA), nous a montré des gènes reliés au cycle cellulaire, à la prolifération, au développement et à la maturation dans les lymphocytes B (Pallier, *et al.* 2010). Ces résultats sont corrélés avec l'augmentation du nombre de lymphocytes B observés dans différentes études (Newell, *et al.* 2010; Louis, *et al.* 2006; Sagoo, *et al.* 2010; Pallier, *et al.* 2010).

Les deux études collaboratives entre le réseau américain *Immune Tolerance Network* (ITN) (Newell, *et al.* 2010) et le consortium européen IOT (Sagoo, *et al.* 2010) ont aussi analysé l'expression des gènes des PBMC à l'aide de puces à ADN. Parmi les 25 patients tolérants américains, 20 ont reçu un greffon HLA apparié alors que les patients du réseau européen et la plupart de ceux de nos études présentent des disparités HLA. Cependant, cette différence ne semble pas prépondérante puisque l'analyse des gènes différenciellement exprimés dans ces cohortes a révélé, dans les deux cas, un enrichissement en gènes impliqués dans les voies de signalisation des lymphocytes B (Newell, *et al.* 2010; Sagoo, *et al.* 2010). L'étude Sagoo *et al.* a ainsi permis d'identifier 170 gènes différenciellement exprimés par les patients tolérants dont la majorité était impliquée dans des voies de signalisation B. Sélectionnant les 10 gènes les plus différentiels, dont 6 sont exprimés ou impliqués dans les cellules

B, les auteurs ont montré que ces 10 gènes permettent une bonne discrimination des patients tolérants. De plus, dans cette étude, les auteurs ont créé un score composite permettant d'identifier des patients tolérants avec une valeur positive de prédiction de 80% et une valeur négative de prédiction de 96% en associant des analyses transcriptomiques, phénotypiques et fonctionnelles composées de : *i*) l'expression des 10 gènes les plus différenciellement exprimés, *ii*) le ratio d'expression de FOXP3 par rapport à l'expression de l' α -1,2 mannosidase, *iii*) le pourcentage de lymphocytes CD4⁺CD25^{int} dans le sang, *iv*) la fréquence de la réponse anti-donneur par rapport à la fréquence de la réponse à un tiers en ELISpot, et *v*) le nombre de lymphocytes B totaux par rapport au nombre de lymphocytes T totaux dans le sang.

L'étude de Newell *et al.* a permis d'identifier 31 gènes différenciellement exprimés chez les patients tolérants par rapport aux contrôles en PCR quantitative. Ces 31 gènes sont issus d'une sélection de 228 gènes dont 50 étaient les plus différentiels dans les puces à ADN, d'autres rapportés comme spécifiques de la signature de tolérance hépatique (Martinez-Llordella, *et al.* 2007) ou encore suggérés pour jouer des rôles dans la tolérance comme CD40. Parmi ces 31 gènes, 26 sont reliés aux fonctions des lymphocytes B, et les auteurs ont pu identifier une signature de 3 gènes (IGKV4-1, IGLL1 et IGKV1D-13) permettant de diagnostiquer la tolérance avec une valeur positive de prédiction de 86% et une valeur négative de prédiction de 100%. Là encore, ces 3 gènes sont reliés aux lymphocytes B puisqu'ils encodent pour des chaînes légères des immunoglobulines.

Dans cette étude, aucun gène différentiel n'a été identifié parmi les gènes testés de la signature de tolérance hépatique, suggérant la possibilité que la tolérance soit spécifique de l'organe. Cependant, l'utilisation de plateformes de puces à ADN différentes rend difficile les comparaisons de données issues de plusieurs études. Afin de s'affranchir de ces biais techniques, nous avons analysé l'expression de gènes de PBMC de patients transplantés rénaux opérationnellement tolérants (n=12), stables (n=12), de patients transplantés hépatiques opérationnellement tolérants (n=12) et non tolérants (n=12) en utilisant la même plateforme de puces à ADN (Lozano, *et al.* 2011). L'article de cette étude est présentée en annexe 5 (p.151). Cette étude confirme les résultats précédents où une variété de gènes codant pour des gènes des cellules NK sont enrichis chez les patients transplantés hépatiques opérationnellement tolérants (Martinez-Llordella, *et al.* 2007) alors qu'une signature reliée aux lymphocytes B est majoritairement observée chez les patients transplantés rénaux (Newell, *et al.* 2010; Sagoo, *et al.* 2010; Pallier, *et al.* 2010). Cette étude confirme aussi un plus grand nombre de lymphocytes B activés et mémoires chez les patients tolérants transplantés rénaux par rapport aux autres groupes analysés, comme nous l'avons précédemment publié (Pallier, *et al.* 2010). Les patients transplantés hépatiques ne présentent pas de variations du nombre de lymphocytes B. Finalement, la comparaison des gènes différenciellement exprimés entre patients transplantés hépatiques tolérants et non-tolérants avec les gènes différenciellement exprimés entre patients

transplantés rénaux tolérants et stables n'identifie que deux gènes en commun (TROVE2 et AI885665) (figure 2). Cette comparaison renforce l'idée que le mécanisme de tolérance opérationnelle est dépendant de l'organe transplanté et que les mécanismes de cette tolérance y sont fondamentalement différents.

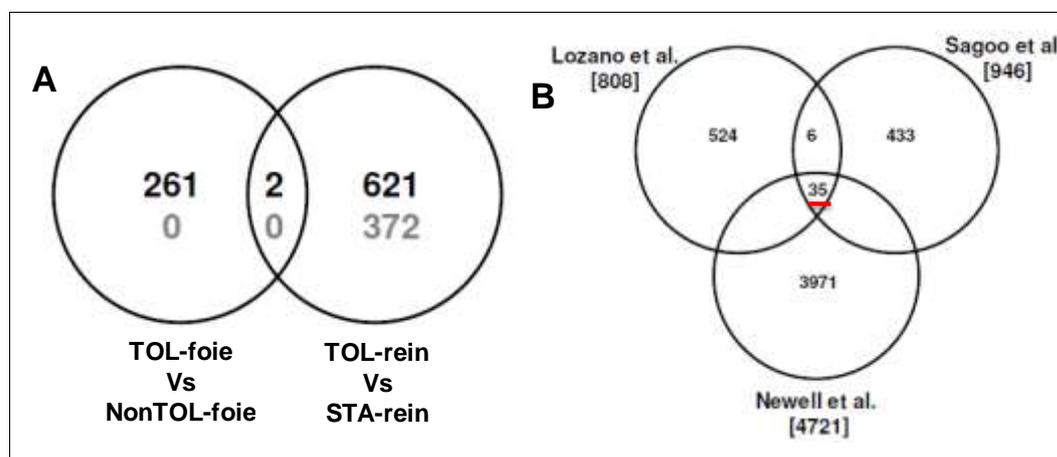


Figure 2: Illustration des gènes mis en évidence par l'étude de Lozano *et al.* (Lozano, *et al.* 2011)

A) Diagramme de Venn indiquant le nombre de gènes différentiellement surexprimés (en noir) et sous-exprimés (en gris) entre patients transplantés hépatiques tolérants et non-tolérants et entre patients transplantés rénaux tolérants et stables. B) Diagramme de Venn montrant les gènes différentiellement exprimés identifiés d'après les données des études de Lozano *et al.* (Lozano, *et al.* 2011), Sagoo *et al.* (Sagoo, *et al.* 2010) et Newell *et al.* (Sagoo, *et al.* 2010).

Ainsi, 4 études différentes rapportent un enrichissement en gènes impliqués dans les voies de signalisation des cellules B par rapport aux autres cohortes de patients (Newell, *et al.* 2010; Sagoo, *et al.* 2010; Pallier, *et al.* 2010). Parmi les listes de gènes différentiellement exprimés, un seul gène est retrouvé commun aux études de Brouard *et al.*, Newell *et al.* et Sagoo *et al.*, (Newell, *et al.* 2010). Il s'agit du gène codant pour la protéine CD20, officiellement appelé *membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 1* (MS4A1), marqueur des cellules B qui est surexprimé chez les patients tolérants. La surexpression de ce gène est cohérente avec l'augmentation du nombre de lymphocytes B observée dans toutes ces études. Ce gène fait partie de la signature des 49 gènes initialement décrits par Brouard *et al.*, ce qui renforce la validité de cette signature. Il est aussi surexprimé dans les urines des patients tolérants en comparaison de patients stables parmi 18 gènes testés en PCR quantitative (Newell, *et al.* 2010). Une nouvelle comparaison des gènes différentiellement exprimés entre les études de Newell *et al.*, Sagoo *et al.* et Lozano *et al.* a permis d'identifier 35 gènes communs dont 24 préférentiellement exprimés dans les lymphocytes B (figure 2). L'utilisation des *Lymphochips*, des puces à ADN présentant un nombre restreint de clones d'ADN associés à des lymphomes et d'élaboration relativement ancienne (Bustin 2000), peut expliquer

l'absence de gènes communs, hormis CD20, avec l'étude de Brouard *et al.* Quoiqu'il en soit, l'identification de ce groupe de 35 gènes renforce encore l'implication possible des lymphocytes B dans la tolérance à la greffe rénale. Sa validation sur d'autres échantillons, avec une autre technique ou sur une population de patients stables comme dans l'étude de Brouard *et al.* en 2011 (Brouard, *et al.* 2011), permettrait d'identifier une signature diagnostique de la tolérance opérationnelle à une greffe rénale.

Les analyses des paramètres cliniques, des paramètres phénotypiques et de l'expression des gènes du sang périphérique ont ainsi permis de mettre en évidence des caractéristiques communes aux patients opérationnellement tolérants rénaux par rapport aux autres populations de patients transplantés. Ces caractéristiques pourraient permettre de créer un score composite afin de diagnostiquer ces patients, comme c'est le cas dans l'étude de Sagoo *et al.* (Sagoo, *et al.* 2010). D'après l'étude de Brouard *et al.*, il semble possible d'identifier des patients potentiellement tolérants parmi la population des patients transplantés sous IS même si le pourcentage de ces patients semble plus faible qu'en transplantation hépatique (Brouard, *et al.* 2011). De plus, le mécanisme de tolérance opérationnelle semble dépendant de l'organe transplanté puisque les signatures sanguines sont différentes entre les patients transplantés rénaux et hépatiques (Lozano, *et al.* 2011). Finalement, il est indispensable de continuer les analyses chez ces patients opérationnellement tolérants afin d'obtenir une meilleure compréhension des facteurs influençant cet état.

II/ Le Rejet Chronique Humoral Actif en transplantation rénale

Depuis les premières greffes réalisées dans les années 50, les avancées en transplantation rénale ont été considérables, notamment grâce à une meilleure compréhension des mécanismes de rejet, une amélioration des techniques chirurgicales et des traitements immunosuppresseurs disponibles (Morris 2004). Ainsi, le taux de survie du greffon à un an est habituellement supérieur à 90% et la transplantation rénale est devenue le traitement de choix de l'insuffisance rénale terminale, offrant à la fois une meilleure survie du greffon et du patient (Lee, A. J., *et al.* 2005) ainsi qu'une meilleure qualité de vie au patient tout en étant plus économique que la dialyse (Laupacis, *et al.* 1996). Cependant, malgré l'ensemble des traitements immunosuppresseurs disponibles, les mécanismes immunologiques qui reflètent la fonction normale du système immunitaire restent une menace majeure pour la survie du greffon. Ainsi, d'après le rapport annuel de l'Agence de la BioMédecine française (ABM) de 2008, le taux de survie du greffon est d'environ 80% à 5 ans, diminue à environ 70% à 8 ans et jusqu'à 60% à 10 ans comme présenté sur la figure 3 (ABM, 2009). L'amélioration du devenir à moyen et long-terme de la greffe nécessite donc encore une meilleure compréhension des mécanismes immunologiques conduisant aux lésions du greffon ainsi que de nouveaux outils diagnostics et thérapeutiques.

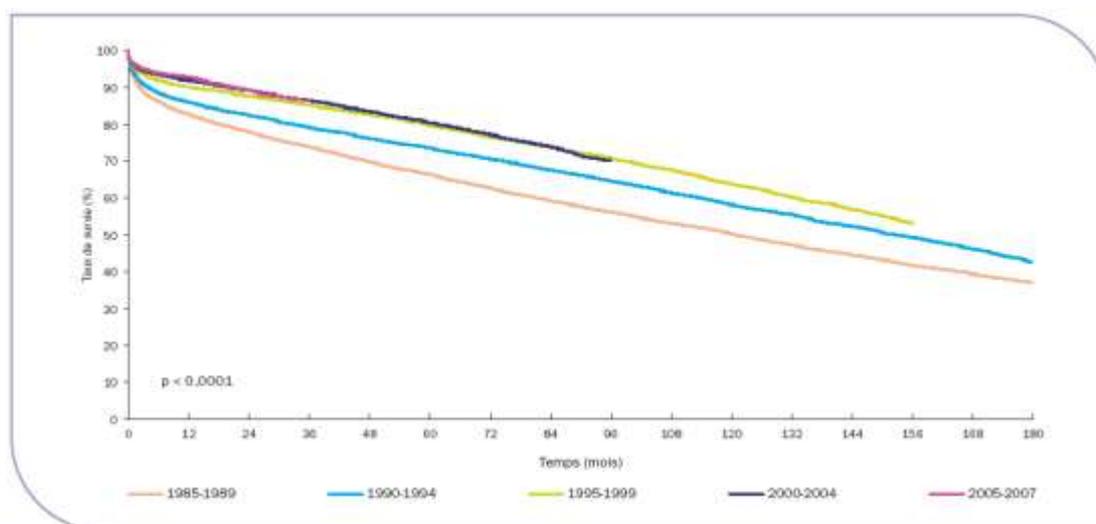


Figure 3: Survie du greffon rénal selon la période de la greffe (ABM, 2009)

A long terme, la première cause de perte de greffon est la dysfonction rénale chronique (figure 4). Ces dysfonctions chroniques regroupent de nombreuses étiologies dont certaines de nature immunologique comme les rejets chroniques humoraux ou cellulaires et des infections virales (BK polymavirus et cytomegalovirus (CMV)), et d'autres de nature non-immunologique incluant la récurrence de la maladie initiale (maladie de Berger, etc), et la toxicité des inhibiteurs de calcineurine (Nankivell, *et al.* 2003; El-Zoghby, *et al.* 2009; Pascual, *et al.* 2002). La perte tardive due à des lésions médiées par les Ac semble majeure puisque 63% des pertes de greffon après un an peuvent leur être imputées (Einecke, *et al.* 2009). L'impact du RCHA est d'autant plus dramatique qu'à ce jour aucun traitement n'est vraiment efficace.

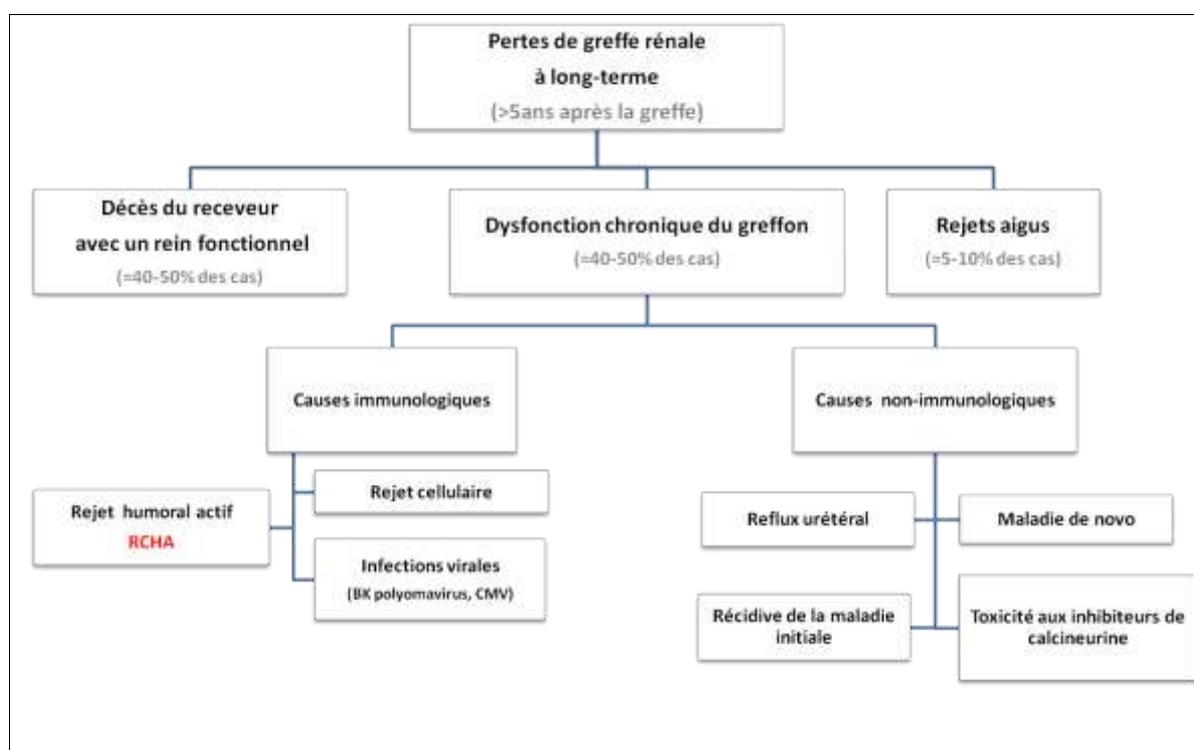


Figure 4: Causes tardives de perte du greffon rénal inspiré de Pascual, *et al.* 2002.

1) Définition du RCHA

Le RCHA se caractérise par une dégradation progressive de la fonction du greffon et apparaît quelques mois voire quelques années après la transplantation. Cette détérioration de la fonction s'associe à des changements physiopathologiques observés dans le cadre d'une analyse histologique de biopsie du greffon. Seule la biopsie d'un rein transplanté permet d'établir le diagnostic, d'évaluer la gravité des lésions, de prédire la réponse au traitement et d'envisager le pronostic. D'après la dernière mise à jour, en 2009, de la classification de Banff, qui permet de quantifier les lésions du greffon, le diagnostic du RCHA repose sur l'identification de 3 critères primordiaux (Sis, *et al.* 2010) :

- morphologique : des lésions tissulaires histologiques témoignant d'une agression chronique du greffon, dont (i) une glomérulopathie d'allogreffe caractérisée par l'aspect en « double contours » de la membrane des capillaires, et /ou (ii) des capillaires péri-tubulaires présentant une membrane basale en feuillets et/ou (iii) une FI/AT et/ou (iv) un épaissement fibreux de l'intima vasculaire (figure 5A);

- sérologique : la présence de DSA circulants dans le sérum du receveur;

- immunologique : des dépôts de C4d au niveau des capillaires péri-tubulaires du greffon. Le C4d est un fragment du C4b, un produit de l'activation de la voie classique du complément par les Ac, et témoigne grâce à sa longue demi-vie d'un rôle pathogénique de l'immunité humorale (figure 5B).

En l'absence de DSA circulants ou de dépôts de C4d mais avec présence d'atteintes tissulaires, le terme de « suspicion » de RCHA est recommandé.

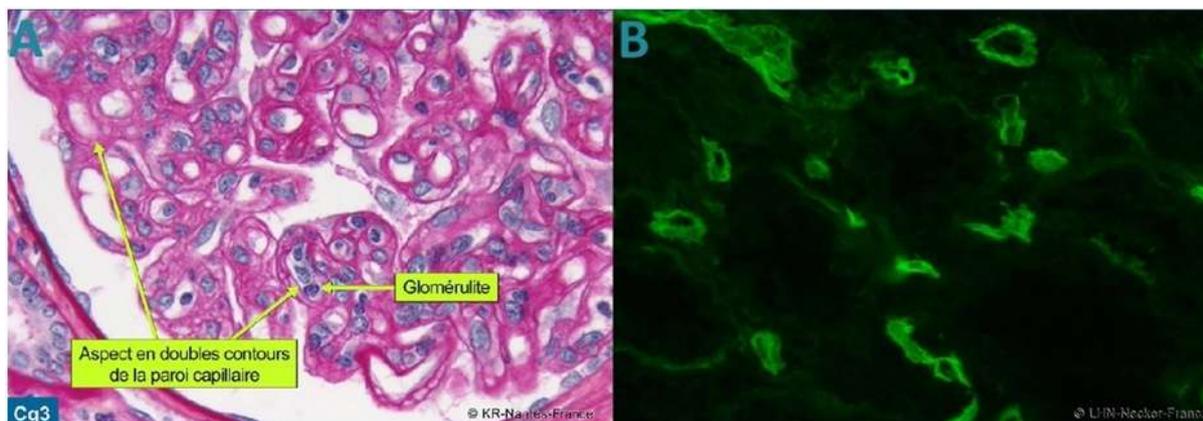


Figure 5: Caractéristiques histologiques du RCHA (Giral, *et al.* 2010a)

A) La glomérulopathie d'allogreffe est caractérisée par des membranes basales glomérulaires avec un aspect en double contours ; coloration à l'acide périodique de Schiff, x400 ; B) Dépôts de C4d sur les capillaires péri-tubulaires ; immunofluorescence, x400.

Du fait de la mise à jour régulière de la classification de Banff, certaines définitions sont devenues obsolètes. C'est le cas de la néphropathie chronique d'allogreffe (CAN pour *chronic allograft nephropathy*), catégorie qui a été modifiée dans la réactualisation de la classification de Banff de 2005 car trop large voire « fourre-tout » (Solez, *et al.* 2007). Malheureusement, de nombreuses études se sont basées sur cette classification et ne sont de ce fait pas spécifiques du RCHA mais d'un rejet chronique au sens large, présentant une détérioration progressive de la fonction rénale, avec, le plus souvent, des composantes histologiques du RCHA comme la FI/AT qui est retrouvée dans de nombreuses néphropathies.

De nombreux facteurs cliniques et biologiques sont décrits comme facteurs de risque associés au devenir du greffon tels que le nombre d'épisodes de rejet aigu (Opelz and Dohler 2008), notamment lors de la première année après la greffe, la créatinémie à un an, le nombre d'incompatibilité HLA, notamment l'incompatibilité HLA-DR (Opelz and Dohler 2007; Cecka 2010), le retard de démarrage du greffon (Giral-Classe, *et al.* 1998), l'âge du donneur (Cecka 2010), le poids du greffon et du receveur (Giral, *et al.* 2010b). Leur association ne suffit pas à en faire des marqueurs prédictifs ou diagnostics, mais la création d'un score clinique, basé sur un modèle de Cox, utilisant certains de ces facteurs permet de prédire la survie du greffon à long terme (Foucher, *et al.* 2010). Ce score composite n'est pas spécifique du RCHA mais permet de prédire les patients à risque qui vont présenter une dégradation de leur fonction rénale. L'association de ce score avec des marqueurs biologiques spécifiques du RCHA permettrait d'accroître sa valeur prédictive ainsi que sa spécificité vis-à-vis du RCHA.

2) Diagnostic précoce du RCHA

Dans 2/3 des cas, la glomérulopathie d'allogreffe est associée à une protéinurie et à une dégradation de la fonction rénale. La sévérité de la glomérulopathie d'allogreffe et de la protéinurie qui en résulte sont corrélées avec une diminution de la survie du greffon (Banfi, *et al.* 2005). Cependant, l'altération des valeurs de marqueurs de la fonction rénale, tels que la protéinurie, la créatinémie, voire l'hématurie, apparaît tardivement lorsque l'atteinte fonctionnelle est établie et irréversible. Par ailleurs, même si les atteintes histologiques apparaissent plus précocement que les atteintes fonctionnelles, la biopsie rénale est le plus souvent réalisée « pour cause », c'est-à-dire après l'observation d'une atteinte fonctionnelle. Les biopsies protocolaires, à une date anniversaire, le plus souvent à 1 an post-greffe, sont de plus en plus réalisées mais les chances d'observer précocement un RCHA sont restreintes et nécessitent des indicateurs fiables. Ainsi, l'établissement de marqueurs biologiques, aussi appelés biomarqueurs, est nécessaire pour un diagnostic précoce du RCHA voire un pronostic afin de permettre la prise en charge des patients le plus tôt possible.

La définition d'un biomarqueur établie en 2001 par le *Biomarkers Definition Working Group* (BDWG) correspond à « une caractéristique mesurée objectivement et évaluée comme un indicateur d'un processus biologique normal, d'un processus pathogène ou de réponses pharmacologiques à une intervention thérapeutique » (*Biomarkers Definitions Working Group* 2001). Plusieurs biomarqueurs ont été proposés pour le diagnostic du RCHA. Hormis des marqueurs fonctionnels, trop tardifs, discutés précédemment (*e.g.* créatinémie), le dépôt de C4d, faisant partie de la définition du RCHA dans la classification de Banff, est un biomarqueur histologique décrit depuis plusieurs années (Mauiyyedi, *et al.* 2001). Cependant, les dépôts de C4d ne semblent pas toujours présents lors d'altérations fonctionnelles dues aux Ac, mettant en doute la sensibilité de ce

marqueur (Akalin, *et al.* 2007; Sis, *et al.* 2009; Loupy, *et al.* 2011). Par exemple, chez 80 patients présentant des DSA, 54% d'entre eux présentaient une fluctuation du marquage C4d entre une biopsie à 3 mois et une à un an. De plus, dans 55% des biopsies de cette étude, le marquage C4d était négatif malgré la présence d'une inflammation (Loupy, *et al.* 2011).

La détection de DSA dans le sérum des receveurs est utilisée en routine pour diagnostiquer la survenue de rejet aigu (Hourmant, *et al.* 2005), mais aussi parce que le taux d'Ac anti-HLA est corrélé à la survie du greffon (Mao, *et al.* 2007). De même que le marquage C4d, la détection sérique de DSA fait partie de la définition de Banff du RCHA puisque leur présence est un des acteurs de ce rejet (Sis, *et al.* 2010). Ainsi, la présence d'Ac préformés, c'est-à-dire avant la greffe, est associée à une diminution de la survie à 8 ans du greffon (Lefaucheur, *et al.* 2010). De même, la détection de DSA après la greffe, *de novo*, est associée à la perte du greffon (Worthington, *et al.* 2003), mais aussi à la dégradation de la fonction rénale (Fotheringham, *et al.* 2011). En effet, la survenue de protéinurie est statistiquement plus importante chez des patients présentant des DSA *de novo* que chez des patients présentant des Ac *de novo* non DSA et des patients sans Ac (figure 6). La détection de DSA semble actuellement le biomarqueur le plus fiable du RCHA (Lefaucheur, *et al.* 2010; Worthington, *et al.* 2003; Lachmann, *et al.* 2009). Nous pouvons quand même noter que ce marqueur semble manquer de spécificité. En effet, la présence de DSA ne prédit pas toujours le RCHA puisque des patients sans altération fonctionnelle ni histologique présentent ces Ac (Lefaucheur, *et al.* 2010; Reinsmoen, *et al.* 2008; Supon, *et al.* 2001). Par ailleurs, la production d'Ac *de novo* peut être une conséquence de la libération de molécules de cellules lésées du rein sans qu'une réponse allogénique en soit la cause primaire. L'implication d'Ac non dirigés contre les molécules HLA du donneur est aussi décrite dans le rejet du greffon. Par exemple, une association entre la présence d'Ac dirigés contre le récepteur de type 1 de l'angiotensine (AT1R) ou de type 2 (AT2R) avec la survenue de rejets chroniques a été décrite (Reinsmoen, *et al.* 2010; Becker, *et al.* 2002). Cependant, ces associations sont discutées et nécessitent plus de preuves notamment à cause du faible nombre de patients décrits. Ainsi, la production d'Ac est une préoccupation majeure du RCHA et les DSA semblent pouvoir être utilisés comme biomarqueurs, mais avec une spécificité limitée.

Alors que dans le cadre du rejet aigu de nombreux biomarqueurs ont été proposés, dans la biopsie, le sang ou les urines (*e.g.* les gènes Granzyme B, Perforine, *etc.*), peu de biomarqueurs spécifiques du RCHA ont été proposés (Anglicheau, Dany and Suthanthiran 2008). L'utilisation des puces à ADN permettant de mesurer l'expression de milliers de gènes simultanément a permis de mettre en évidence des signatures de gènes associées à des dysfonctions tardives du greffon. Cependant, la plupart des études transcriptomiques de patients transplantés rénaux ne sont pas spécifiques au RCHA mais de CAN ou de composantes de celui-ci, telle que la FI/AT, comme cité précédemment (Hotchkiss, *et al.* 2006; Rödder, *et al.* 2009; Scherer, *et al.* 2003; Maluf, *et al.* 2008;

Mas, *et al.* 2007). A défaut d'être spécifiques du RCHA comme défini actuellement, ces études ont le mérite d'avoir amélioré la compréhension des mécanismes aboutissant à la perte progressive de la greffe.

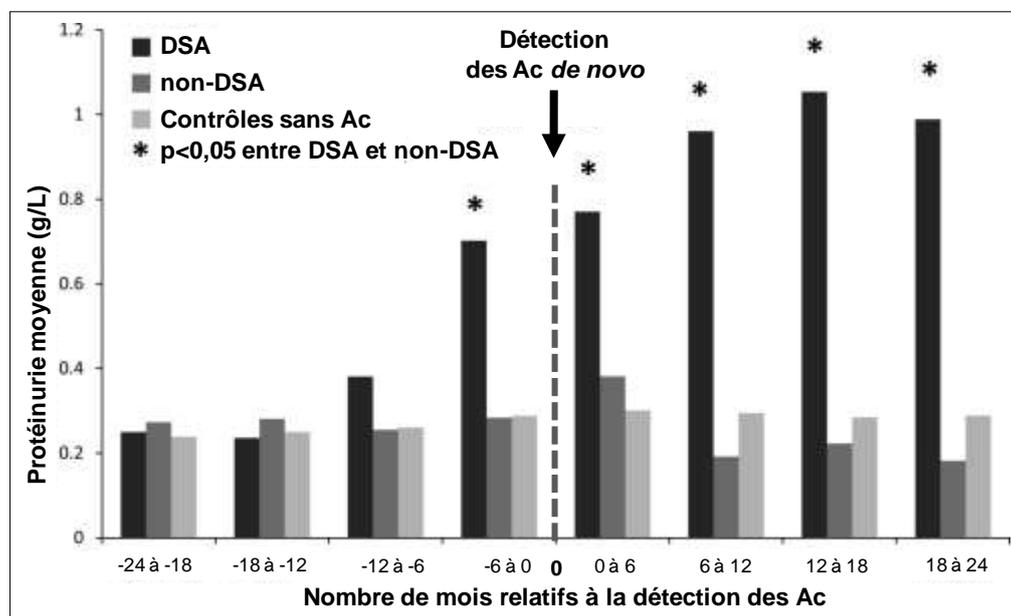


Figure 6: Augmentation de la protéinurie chez des patients transplantés rénaux présentant des DSA *de novo* (Fotheringham, *et al.* 2011).

Pour les patients présentant des DSA *de novo* (n=38) le taux de protéinurie augmente significativement comparé à des patients avec des Ac *de novo* non-DNA (n=34) ou des patients contrôles sans Ac (n=205).

Parmi les premières études, Scherer A *et al.* ont identifié un groupe de 10 gènes capables de prédire la survenue d'un rejet chronique (Banff 97) 12 mois après la transplantation pour 88% des patients analysés, dans les biopsies prélevées 6 mois après la transplantation (Scherer, *et al.* 2003). Cependant, seulement 17 échantillons ont été utilisés, nécessitant une validation externe de ces 10 gènes. D'autres études également réalisées sur des biopsies (Hotchkiss, *et al.* 2006; Rödder, *et al.* 2009; Maluf, *et al.* 2008), l'urine ou le sang (Mas, *et al.* 2007) identifiaient de larges groupes de gènes associés à la FI/AT ou à la CAN. A partir de ces larges groupes de gènes, des fonctions biologiques ou réseaux de gènes ont été décrits associés à la fibrose, au remodelage de la matrice extracellulaire ou à l'implication du système immunitaire, démontrant ainsi la validité de l'utilisation des puces à ADN dans ces pathologies multifactorielles. Par exemple, Rödder *et al.* démontrèrent une dérégulation de gènes impliqués dans le remodelage de la matrice extracellulaire lors de FI/AT, particulièrement le gène de la métalloprotéinase -7 (MMP7), qui reflètent la progression de la fibrose et permettent de différencier une biopsie normale d'une biopsie atteinte de FI/AT (Rödder, *et al.* 2009).

L'équipe du Pr Halloran identifia, en 2009, une signature de 119 gènes dans la biopsie associée à un dommage des cellules endothéliales, nommée ENDAT pour *endothelial-associated transcripts* (Sis, *et al.* 2009). Ils montrent que la valeur moyenne de ce score associée à la présence d'alloanticorps présente une valeur prédictive plus forte que le marquage C4d dans la biopsie pour le RCHA (77% versus 31%) et est un indicateur d'une faible survie du greffon même en absence de dépôts de C4d (environ 40% des biopsies). L'utilisation d'un groupe d'apprentissage de 81 biopsies et d'un groupe de validation de 82 biopsies renforce l'intérêt de cette signature qui doit encore être validée dans des cohortes externes et plus larges. Plus récemment, en regroupant des groupes de gènes décrits par cette équipe comme associés à des pathologies du rein transplanté (PBT pour *Pathogenesis-Based Transcript Sets*) dont l'ENDAT, cette équipe créa un score de risque prédictif de la perte du greffon en utilisant des biopsies réalisées un an après la transplantation (Einecke, *et al.* 2010). Les gènes de cette signature moléculaire sont en grande partie associés aux lésions tubulaires et au remodelage de la matrice extracellulaire et, là aussi, l'utilisation d'un groupe de biopsies de validation (n=48) renforce la robustesse de cette signature (figure 7).

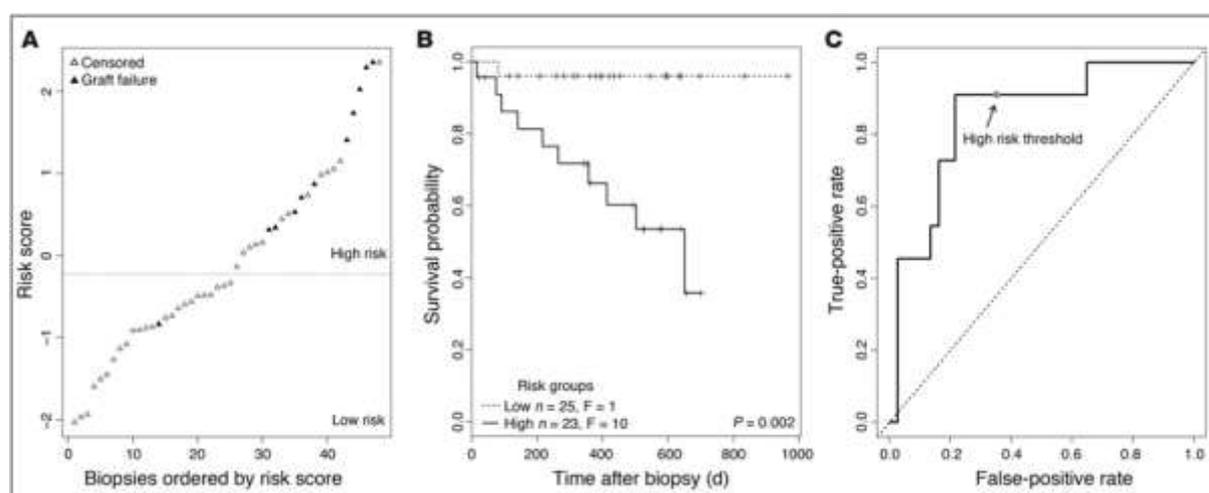


Figure 7: Validation du score prédictif de la perte de greffon avec 48 biopsies indépendantes (Einecke, *et al.* 2010).

A) Score de risque en fonction du temps de perte du greffon. Le seuil de risque distinguant un groupe à fort risque de perte de greffon d'un groupe à faible risque est le même que celui utilisé pour le groupe de biopsies tests (=105 biopsies) ; B) Courbe de survie (Kaplan-Meier) en fonction du risque estimé selon le seuil de risque utilisé en A ; C) Courbe *Receiver Operating Curve* (ROC) illustrant la sensibilité et spécificité du score de risque de perte du greffon.

L'utilisation de signature de gènes permettant la réalisation d'un score global ou composite semble être une direction prise actuellement puisqu'aucun marqueur unique fiable n'est pour l'instant utilisé en clinique. Cependant, certains biomarqueurs uniques mais nécessitant de plus amples validations ont déjà été décrits ; c'est le cas du gène Tribles-1 (TRIB1) (Ashton-Chess, Joanna,

et al. 2008). L'expression du gène TRIB1 fut montrée comme significativement augmentée dans les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) de patients présentant un RCHA par rapport à des patients présentant une fonction stable de leur greffon. La réalisation d'une courbe ROC montra que TRIB1 discrimine bien le RCHA avec une spécificité de 88% et une sensibilité de 75%. De la même façon, nous avons aussi identifié comme biomarqueur potentiel du RCHA le gène *proteasome subunit, beta type, 10* (PSMB10), codant pour une sous-unité de l'immunoprotéasome nécessaire à l'apprêtement des peptides pour leur présentation via le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe I (Tanaka and Kasahara 1998; Ashton-Chess, J., *et al.* 2010) (annexe 1, p. 145). Enfin, les gènes MyD88 et TLR4 ont été décrits comme surexprimés dans les PBMC de patients atteints de RCHA comparés à des patients présentant une fonction stable de leur greffon (Braudeau, *et al.* 2008).

L'utilisation de ces molécules en clinique nécessite des validations sur des cohortes externes et de grande taille. Cependant leur description ouvre la voie à une meilleure compréhension des mécanismes conduisant à la perte du greffon liée à des lésions humorales et permet d'envisager une meilleure prise en charge thérapeutique de ces patients.

3) Traitement du RCHA

A ce jour, aucun traitement conventionnel pour le RCHA n'est efficace, ce qui renforce la nécessité de mieux comprendre ses mécanismes immunologiques et cellulaires.

Parmi les nombreux protocoles cliniques testés, beaucoup reposent sur le recours à des protocoles de désensibilisation visant à réduire le taux d'alloanticorps circulants, sur la même base que les protocoles de désensibilisation avant greffe (Marfo, *et al.* 2011). Ceux-ci ont été mis au point pour faire face à la pénurie de greffons et permettent ainsi de réaliser des greffes dans des cas où elle aurait été rapidement rejetée chez des patients hyper-immunisés ou ABO incompatibles. Ils reposent sur l'élimination et la neutralisation des DSA et le blocage de leur production par les lymphocytes B. Cependant, ces protocoles pré-greffe ont leurs limites puisque le taux de rejets aigus médiés par les Ac est plus important chez ces patients et leur efficacité à long terme est discutée (Marfo, *et al.* 2011).

L'élimination des alloanticorps, au moins de façon transitoire, repose sur une plasmacytaphérèse avec soit filtration, échange plasmatique ou immunoabsorption des alloanticorps. Cette élimination est souvent associée à des agents bloquant la synthèse des Ac (inhibiteurs de calcineurine, acide mycophénolique, *etc.*). Même si leurs mécanismes d'action ne sont pas complètement connus, beaucoup de protocoles utilisent des injections d'immunoglobulines intraveineuses (IVIg) obtenues à partir d'un mélange de plasmas provenant de donneurs sains, et comportant plus de 90% d'IgG intactes ainsi que des fragments Fab (*Fragment antigen binding*) (Jordan, *et al.* 2010). Ces IVIg permettent une neutralisation des Ac anti-HLA circulants par les interactions idiotypiques, une

inhibition de la liaison au complément et une inhibition de la prolifération et de la différenciation des cellules B et T.

De nouvelles stratégies ont été introduites, dont l'utilisation du Rituximab, (Ac déplétant anti-CD20). Cependant, les plasmocytes, les cellules produisant les Ac, n'expriment pas le CD20 et par conséquent le Rituximab n'a pas d'effet direct sur ces cellules et donc sur la production des Ac. L'utilisation du Bortézomib, un inhibiteur de l'immunoprotéasome, est décrit dans plusieurs études mais malgré un effet bénéfique dans le traitement de rejets aigus son intérêt lors de RCHA reste discuté (Lemy, *et al.* 2010) puisqu'il semble être bénéfique que de 50% des cas (Mai, *et al.* 2009). La rate étant l'organe lymphoïde le plus gros du corps, le recours à la splénectomie montre des résultats positifs dans le cas de rejet médié par les Ac (Kaplan, *et al.* 2007), cependant l'impact sur le système immunitaire n'est pas négligeable et cette pratique ne peut être envisagée en routine. Enfin, de nombreuses molécules pour lesquelles le recul n'est pas suffisant sont proposées telles que l'Eculizumab, un Ac humanisé qui se lie et prévient l'activation du C5 empêchant la formation du complexe d'attaque membranaire, et qui a montré de bons résultats (Jordan, *et al.* 2010; Wang, H., *et al.* 2007).

La faible amélioration des taux de survie à moyen et long terme (Meier-Kriesche, *et al.* 2004) témoigne de la nécessité d'une meilleure prise en charge du rejet chronique, et principalement du RCHA. Une meilleure compréhension des mécanismes cellulaires mis en jeu est indispensable pour la mise au point d'un diagnostic fiable, spécifique et précoce ainsi que l'établissement de protocoles cliniques.

III/ Les petits nouveaux dans le contrôle d'expression des gènes : les microARN

Les microARN (miARN) sont des petits ARN d'environ 22 nucléotides de long, simple brin, qui régulent l'expression des gènes. Un miARN peut contrôler l'expression de plusieurs centaines voire milliers de gènes, ainsi jusqu'à 92% des transcrits d'un génome sont ciblés par ces miARN (Miranda, *et al.* 2006). Ces molécules contrôlent l'expression de gènes impliqués dans de nombreux processus biologiques, incluant la prolifération, la différenciation ou encore l'apoptose (Huang, Y., *et al.* 2011). Ainsi, l'expression aberrante de ces miARN est impliquée dans de nombreuses pathologies dont des cancers, des maladies métaboliques, neurodégénératives ou inflammatoires (Huang, Y., *et al.* 2011).

1) Découverte des miARN

Le premier miARN, *lin-4*, fut mis en évidence en 1993 chez le vers *Caenorhabditis elegans* par les équipes d'Ambros et de Ruvkun (Lee, R. C., *et al.* 1993; Wightman, *et al.* 1993). Alors que l'équipe d'Ambros identifia deux transcrits de *lin-4*, de 61 et 22 nucléotides, ne codant pas pour une protéine, l'équipe de Ruvkun démontra que seule la partie non codante en 3' du gène *lin-14* était nécessaire pour sa répression temporelle. Or, puisque la délétion de *lin-14* cause le phénotype opposé de la délétion du gène de *lin-4* (Ferguson, *et al.* 1987), les 2 équipes décrivent, dans la même édition du journal *Cell*, que *lin-4* régula l'expression du gène *lin-14* via sa région 3' non transcrite (UTR pour *untranslated region*) (figure 8) (Lee, R. C., *et al.* 1993; Wightman, *et al.* 1993).

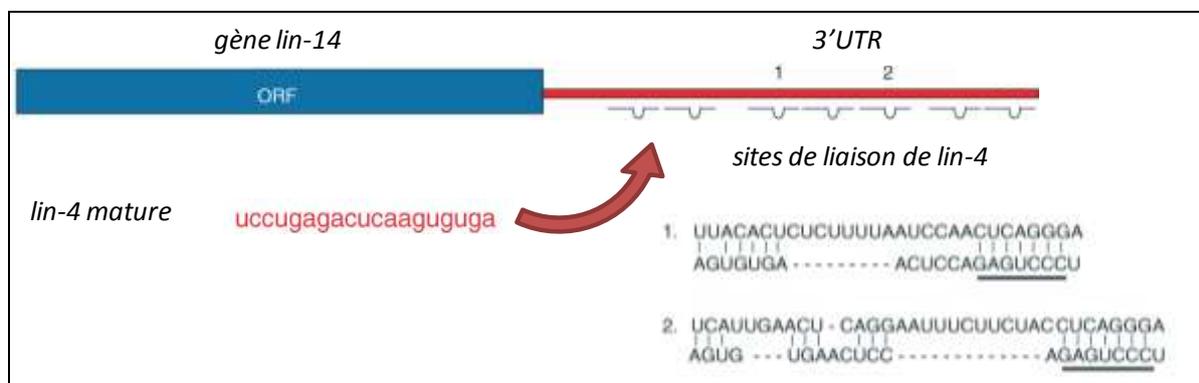


Figure 8: Représentation des sept sites de fixation du miARN *lin-4* au gène *lin-14*

Deux exemples de séquences de fixation sont représentés, la région graine de sept nucléotides de *lin-4* étant soulignée. ORF : *Open reading frame* ou phase ouverte de lecture correspondante à la séquence codante du gène.

Il fallut attendre l'année 2000 pour que le deuxième miARN, *let-7*, soit décrit par l'équipe de Ruvkun toujours chez le vers *Caenorhabditis elegans* (Reinhart, *et al.* 2000). Le fait que *let-7* soit conservé à travers les espèces dont l'Homme, et ne soit pas seulement une particularité de *Caenorhabditis elegans*, a largement contribué à l'intérêt ensuite suscité par ces petits ARN non

codants (Pasquinelli, *et al.* 2000). Ainsi, initiée en 2002 sous le nom de *miRBase Registry*, la base officielle répertoriant les miARN, *miRBase* (<http://www.mirbase.org/>) en est à sa 17^{ème} version et contient maintenant 16 772 séquences de miARN provenant de 142 espèces (Kozomara and Griffiths-Jones 2011). En ce qui concerne l'Homme, 1 424 séquences sont indexées dans cette nouvelle mise à jour, ce qui représente un ajout de plus de 400 nouvelles séquences par rapport à la version 16. Le nombre croissant de miARN découverts, ainsi que le nombre croissant d'articles publiés concernant les miARN démontrent l'intérêt de la communauté scientifique pour ces ARN (figure 9).

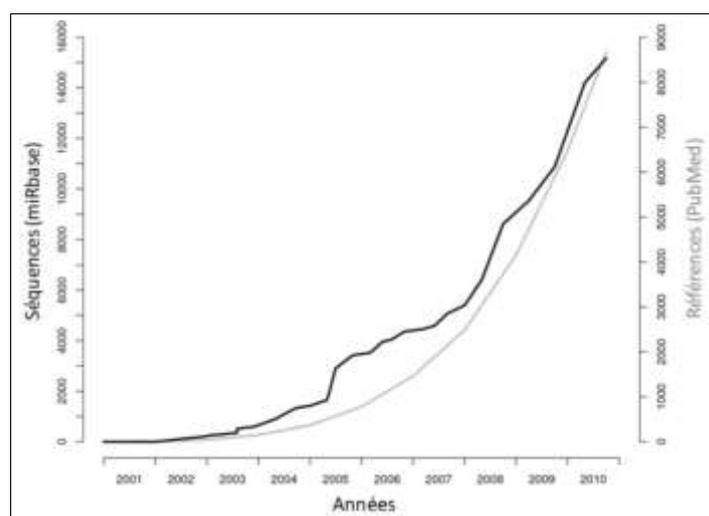


Figure 9 : Croissance du nombre de séquences dans la base *miRBase* et du nombre d'articles publiés citant le mot « microRNA » dans PubMed (Kozomara and Griffiths-Jones 2011)

Une nomenclature simple a rapidement été établie grâce à la *miRBase*. Ainsi, lorsque l'espèce doit être précisée, un miARN est d'abord dénommé par le signe de l'espèce d'intérêt, « hsa » pour l'Homme, « rno » pour le rat, *etc.* Le terme « mir » est utilisé pour désigner le précurseur alors que le terme « miR » est utilisé pour désigner la forme mature d'un miARN. Enfin, le numéro du miARN est indiqué ; par exemple, le terme « hsa-miR-21 » désigne la forme mature du miARN 21 chez l'Homme. Lorsqu'une famille de miARN est décrite, les miARN de cette famille sont distingués par une lettre en minuscule, par exemple hsa-miR-20a, hsa-miR-20b, *etc.* Enfin, comme nous le verrons plus tard, le précurseur d'un miARN peut donner naissance à deux miARN matures ; pour les distinguer, sont ajoutés les suffixes « 5p » et « 3p » selon que le brin est issu du bras 5' ou 3' du précurseur. Précédemment, l'ajout d'une étoile indiquait la forme minoritaire des deux brins, mais cette désignation est en train d'être éliminée de la base au profit de la désignation « 5p/3p » (Kozomara and Griffiths-Jones 2011). Par exemple, la désignation du brin mature issu du bras 3' du précurseur mir-142 chez l'Homme est : hsa-miR-142-3p.

2) Biogénèse des miARN

La compréhension des mécanismes conduisant à la fonction des miARN est relativement récente et beaucoup de points restent à élucider. Par ailleurs, la compréhension de ces mécanismes a bénéficié de la description du mécanisme d'ARN interférence qui emprunte des éléments communs à la voie des miARN (Fire, *et al.* 1998). Il existe des différences majeures entre mammifères et plantes, nous nous focaliserons donc sur les voies qui se déroulent chez les mammifères.

a) Transcription des gènes codant les miARN

Les gènes codant les miARN sont principalement transcrits par l'ARN polymérase II (Lee, Y., *et al.* 2004), même si l'ARN polymérase III semble aussi avoir un rôle dans la biogénèse de certains miARN (Ozsolak, *et al.* 2008). Le miARN primaire (pri-miARN) produit est un ARN de plusieurs centaines à milliers de nucléotides, présentant une ou plusieurs structures d'épingles à cheveux (ou tige/boucle), et ayant comme les ARN codant des protéines une coiffe guanosine méthylée en 5' de l'ARN et une queue poly adénylée (polyA) en 3' (figure 10). Dans certains cas, plusieurs ARN peuvent être issus du même transcrit polycistronique, et l'on parle alors de cluster de miARN (Sonkoly and Pivarcsi 2009). Un exemple de cluster est le cluster miR-17-92 qui comprend 7 miARN décrits (miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR-19b, miR-20a et miR-92a).

L'organisation génomique de tous les miARN n'est pas encore connue, mais il semble qu'environ 40% des gènes codant des miARN soient présents dans des introns ou des régions ne codant pas pour des protéines, 10% dans des exons et 20% sont dérivés de régions génomiques répétées (Rodriguez, *et al.* 2004; Berezikov, *et al.* 2011). Les analyses génomiques de miARN montrent que beaucoup de caractéristiques des promoteurs des gènes de miARN sont similaires à celles des gènes codant des protéines (Schanen and Li 2011), telles que la fréquence des îlots CpG, la présence de *TATAbox* et la présence d'éléments d'initiation de la transcription (Ozsolak, *et al.* 2008). De même, des facteurs de transcription régulent la transcription de ces ARN ; par exemple l'expression de mir-34a est régulée par le facteur de transcription p53 (Raver-Shapira, *et al.* 2007) et miR-142 par *LIM domain only 2* (LMO2) (Sun, W., *et al.* 2010). Ce sont donc des gènes dont l'expression est régulée par des stimuli extérieurs, comme le TGF β 1 qui induit une surexpression de miR-192, miR-216a et 217 dans les cellules mésangiales glomérulaires (Kato, *et al.* 2009). Enfin, les mécanismes de contrôle épigénétiques qui régulent la production des gènes codant des protéines s'appliquent aussi aux gènes des miARN, tels que la méthylation de l'ADN et les modifications des histones. Par exemple, dans le cancer de la vessie, l'expression de miR-127 est réduite par l'hyperméthylation de son promoteur (Saito, *et al.* 2006).

b) Maturation du miARN

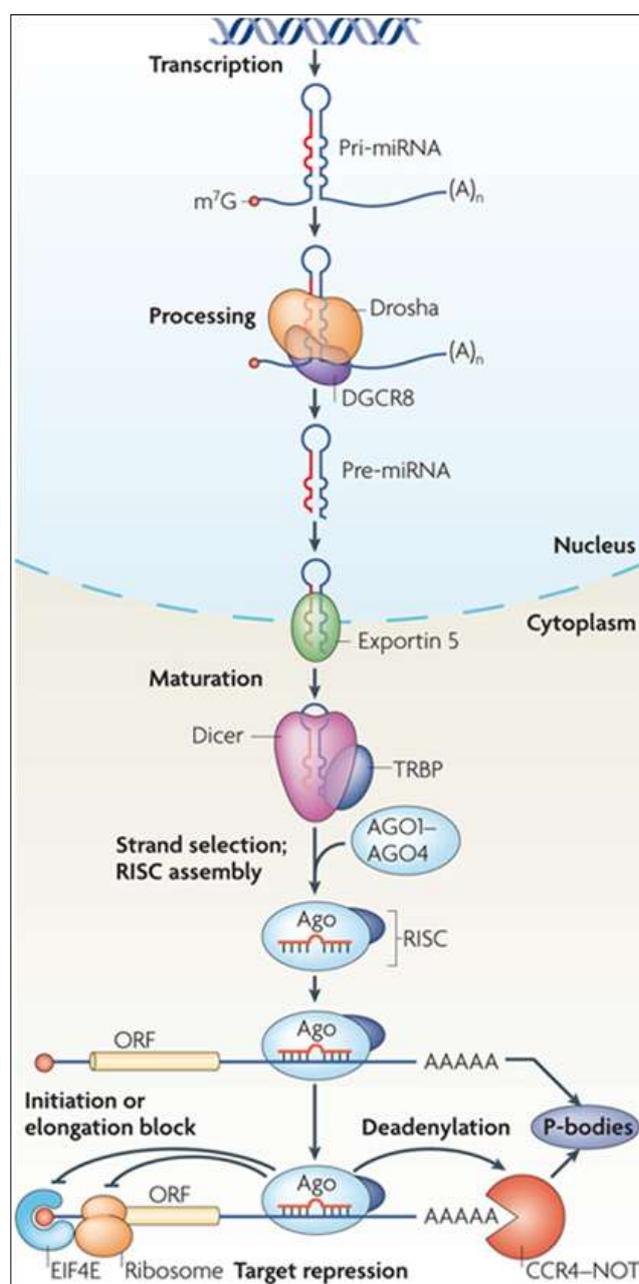


Figure 10: Biogénèse et mécanismes d'action des miARN, issu de Inui, *et al.* 2010

Le pri-miARN transcrite est pris en charge par un complexe protéique de liaison aux ARN double brin (dsRBD) comprenant les protéines *Pasha* et *DiGeorge syndrome critical region protein 8* (DGCR8) (figure 10). Le recrutement de la RNase III *Drosha* forme le complexe *Microprocessor* qui va cliver le pri-miARN en un miARN précurseur (pré-miARN) d'environ 70 nucléotides ayant une structure irrégulière en épingle à cheveux. L'extrémité cohésive de 2 nucléotides en 3' du pré-miARN, qui est caractéristique des RNase III, va permettre sa reconnaissance par l'*Exportine 5* et son transport dans le cytoplasme. L'*Exportine 5* se lie de façon directe au pré-miARN ; une saturation de ce système d'export par l'introduction d'ARN exogènes double brin (shARN pour *short hairpinRNA*) induit une diminution du niveau de miARN matures dans le cytoplasme (Yi, *et al.* 2005; Yi, *et al.* 2003). De façon intéressante, une fois mûré dans le cytoplasme, un miARN mature peut être réimporté dans le noyau, soit pour jouer un rôle dans le noyau, soit par restriction spatiale, comme cela a été montré pour miR-29b (Hwang, *et al.* 2007). Ainsi, les auteurs ont

montré que malgré leur petite taille, les miARN contiennent des motifs de régulation - pour miR-29b une séquence hexamérique d'import nucléaire - qui peut influencer leur fonction (Hwang, *et al.* 2007).

Une nouvelle classe de précurseurs est produite de façon indépendante du complexe *Microprocessor* (Berezikov, *et al.* 2007). Ces « mirtrons » ne possèdent pas la longue structure d'un

miARN et ne sont donc pas pris en charge par *Drosha*, cependant ils ressemblent à des pré-miARN, avec une extrémité 3' libre et, dans une voie alternative, donnent naissance à des miARN matures.

Une fois dans le cytoplasme, le pré-miARN est alors clivé par la RNase III *Dicer* en un court ARN double brin (≈ 22 nucléotides) présentant des extrémités cohésives de 2 nucléotides aux 2 extrémités 3'. Le complexe multiprotéique est renforcé par une protéine de liaison à l'ARN double brin (TRBP chez l'Homme) et des protéines de la famille Argonaute (AGO) qui vont former le complexe *RNA-induced silencing complex* (RISC). Les protéines de la famille Argonaute (AGO1,-2, -3 et -4 chez l'Homme) semblent prépondérantes dans ce complexe car ce sont elles qui se lient aux miARN, notamment par leur extrémité 5' (Jinek and Doudna 2009). Dans ce complexe, le brin d'ARN passager est dissocié et ne reste que le brin « guide » alors appelé brin mature. Au sein de ce complexe, le miARN mature interagit avec sa cible. La plupart des études de cibles se focalisent sur la partie 3'UTR des ARN messagers (ARNm), probablement car les premières études ont décrit des miARN ciblant cette région. Cependant, en 2007, Lyte *et al.* ont montré que les miARN peuvent aussi se fixer dans la partie 5' des UTR (Lytle, *et al.* 2007). Par la suite, Tay *et al.* ont identifié des gènes murins (*nanog*, *oct4*, *sox2*) qui présentent des sites de liaison aux miARN dans leur région codante (Tay, *et al.* 2010). Ainsi, les miARN peuvent se fixer tout le long des séquences des ARNm.

3) Mesure des miARN

Les miARN étant des ARN, les techniques classiques de mesure des ARNm peuvent leur être appliquées, mais leur courte taille et l'absence de queue polyA nécessitent quelques adaptations. Le clonage des miARN est principalement utilisé pour découvrir de nouveaux miARN, et la fréquence de clonage peut dans une certaine mesure indiquer leur abondance (Lagos-Quintana, *et al.* 2002). Le principe est simple. Les miARN sont séparés sur gel dénaturant de polyacrylamide, isolés, transférés dans des vecteurs de clonage après une étape d'amplification puis les clones sont séquencés. La technique de *Nothern blot* permet d'étudier le profil d'expression des miARN de façon plus précise mais nécessite une sonde spécifique pour chaque miARN (Sempere, *et al.* 2004). Cette technique ne peut donc être utilisée que pour la détection de miARN déjà identifiés. Brièvement, les miARN sont séparés sur gel dénaturant de polyacrylamide, transférés puis fixés sur une membrane, puis une sonde spécifique du miARN recherché est hybridée sur la membrane. Puisque les miARN sont de petite taille et présents en faible quantité parmi les ARN totaux, quelques améliorations ont été apportées, dont l'utilisation de sondes spécifiques aux miARN, modifiées chimiquement pour être plus affines envers l'ARN cible et augmentant la sensibilité du Northern blot (Valoczi, *et al.* 2004).

La technique de PCR quantitative est largement utilisée pour quantifier l'expression d'un miARN de façon spécifique dans un échantillon. Cependant, la petite taille des miARN et l'absence de queue polyA ont nécessité la modification du protocole classique de PCR quantitative. La société *Applied*

Biosystems a développé un protocole où, à l'étape de transcription inverse, une séquence adaptatrice, spécifique du miARN cherché, est ajoutée et permet la synthèse d'une longue séquence (Chen, C., *et al.* 2005). Cette séquence augmente la taille du miARN et permet l'utilisation de 2 amorces pour la PCR, l'une ciblant le miARN, l'autre ciblant la séquence ajoutée lors de la transcription inverse. D'autres protocoles, comme ceux proposés par les sociétés *Qiagen*, *Exiqon* et *Quanta Biosciences*, se basent sur l'ajout d'une queue polyA par une polyA polymérase, puis de l'ajout d'un adaptateur universel grâce à la queue polyA. Cet adaptateur permet l'accroche d'un primer universel. Ces protocoles ont l'avantage de nécessiter qu'une étape de transcription inverse pour tous les miARN, au contraire du protocole d'*Applied Biosystems* qui nécessite une transcription inverse spécifique pour chaque miARN. Pour la mesure des nombreux miARN, ces techniques sont laborieuses, et l'utilisation de puces à ADN dédiées aux miARN est possible (Li and Ruan 2009). Une solution intermédiaire est l'utilisation de « puces à PCR » ou *microfluidic cards* qui permettent la mesure simultanée de centaines de miARN par PCR quantitative, généralement plus reproductible que la mesure par puces à ADN (Mestdagh, *et al.* 2008).

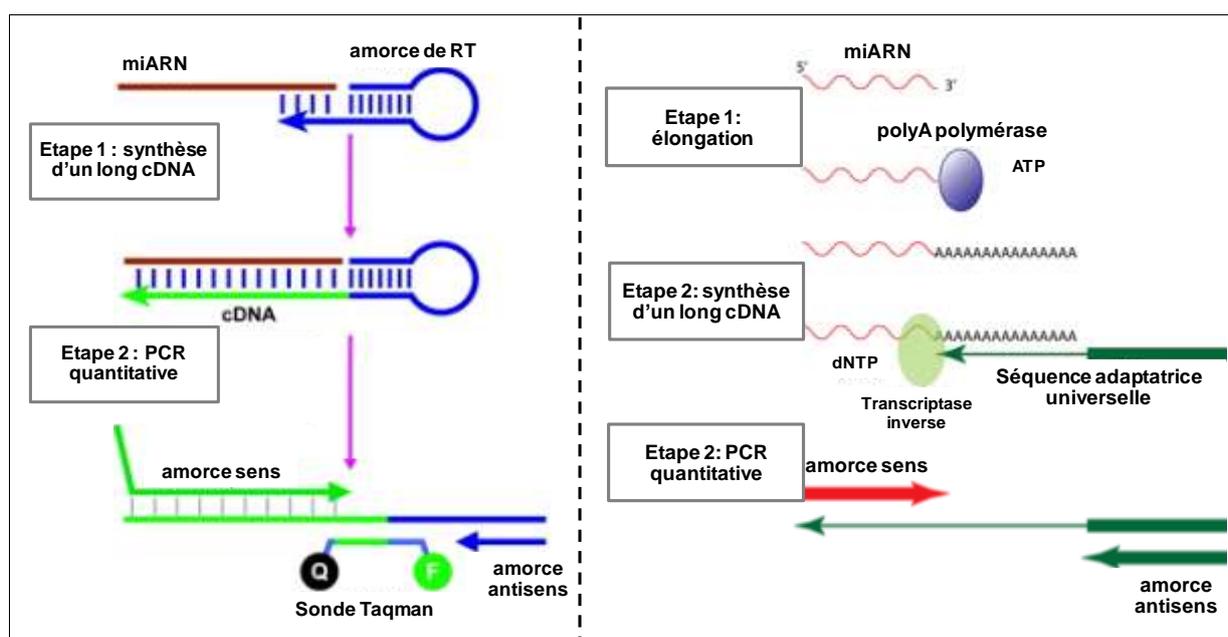


Figure 11: Principe de dosages par PCR quantitative des miARN

A gauche, le protocole développé par la société *Applied Biosystems* (Chen, C., *et al.* 2005) et à droite, le protocole universel adapté par de nombreuses sociétés, compatible avec la technologie *SYBR Green*, sont représentés.

L'hybridation *in situ* permet de détecter la présence de miARN dans des tissus ou des cellules (Nuovo 2008). Plusieurs adaptations ont été mises au point, afin d'améliorer la sensibilité et la spécificité des protocoles d'hybridation *in situ*, dont l'utilisation de sondes modifiées chimiquement, l'utilisation de molécules fluorescentes ou d'une étape de PCR *in situ* (Nuovo 2008).

Finalement, ces techniques de détection et/ou de dosage des miARN sont très utiles pour la mesure des miARN mais étant récentes, ces techniques nécessitent souvent une mise au point lors de leur réalisation ou de l'analyse des résultats par rapport à leur utilisation pour des ARNm. D'autres techniques, moins utilisées, ont aussi été développées et peuvent trouver leur intérêt dans des applications particulières, telles que la mesure de miARN par microbilles cotées de sondes (Barad, *et al.* 2004), par transfert d'énergie bioluminescente par résonance (BRET) (Cissell, *et al.* 2008), *etc* (Hunt, *et al.* 2009).

4) Mécanismes d'action des miARN

La principale fonction des miARN est d'inhiber la synthèse de protéines, soit par inhibition de la traduction protéique soit par dégradation de l'ARNm cible. Le niveau d'ARNm dans la cellule est alors diminué, rarement plus que d'un facteur 3, et la diminution observée au niveau protéique est encore plus faible (Guo, *et al.* 2010). Les miARN sont ainsi souvent décrits comme des rhéostats permettant un contrôle fin de l'expression des gènes.

a) Reconnaissance de la cible du miARN

Le complexe RISC s'apparie à l'ARNm au niveau de régions spécifiques plus ou moins complémentaires de la séquence des miARN appelées MRE pour *miARN Recognition Elements* (Bartel 2004). La région « seed » ou région graine est une région de 2 à 8 nucléotides en 5' du miARN qui semble cruciale pour la reconnaissance de l'ARNm cible (figure 8) (Lewis, *et al.* 2003). Alors que l'on observe des mésappariements le long de l'association miARN/ARNm, la complémentarité est parfaite au niveau de cette région graine.

De part leurs propriétés, l'identification des cibles des miARN *in silico* est une étape difficile. Premièrement, la courte taille des miARN rend difficile une analyse statistique de complémentarité puisque les techniques classiques requièrent habituellement des séquences plus longues (Maziere and Enright 2007). De plus, la complémentarité imparfaite d'un miARN semble difficile à prédire et réduit encore le nombre d'appariements contigus sans mésappariement à la région graine de seulement 2 à 8 nucléotides (figure 12). En effet, un appariement parfait de 6 nucléotides est retrouvé statistiquement tous les 1,3 kilobases dans un génome, ce qui reviendrait à prédire qu'un miARN peut cibler, en moyenne, tous les 3' UTR des gènes du génome humain (Maziere and Enright 2007). Cependant, certaines caractéristiques participent à prédire des cibles potentielles, telles que la conservation des miARN au cours de l'évolution, qui est très forte chez les mammifères et parfois présente avec les invertébrés (Pasquinelli, *et al.* 2000). Généralement, les algorithmes de prédiction des cibles des miARN identifient des cibles potentielles en cherchant des séquences complémentaires (plus ou moins selon les algorithmes utilisés), puis filtrent les résultats sur des

calculs thermodynamiques, de structure et de conservation entre les espèces (Maziere and Enright 2007). C'est le cas de l'algorithme *TargetScan* qui fut la première méthode utilisée pour la prédiction de miARN chez l'Homme. Ainsi, dans sa première version, cet algorithme identifie en premier des cibles présentant des régions complémentaires en 5' d'un miARN, puis réalise une analyse de la conservation de la séquence entre les génomes de souris, de rat et de poisson puis une analyse thermodynamique. Un score est ensuite attribué à chaque séquence. Le taux de faux positifs estimé est de 22% à 31%, ainsi 11 sites prédits ont été validés sur 15 avec cette méthode (Lewis, *et al.* 2003). Cependant puisque cet algorithme requiert une complémentarité parfaite en 5', il n'identifie pas les sites de compensation et peut omettre des sites avec une région graine dominante (figure 12). Une seconde version améliorée de cet algorithme est maintenant utilisée. De nombreux autres algorithmes sont disponibles tels que *Pictar* (Krek, *et al.* 2005), qui utilise un calcul d'alignement par chaîne de Markov ou *DIANA-microT* basé sur un calcul thermodynamique (Maragkakis, *et al.* 2009). Malheureusement, même pour les méthodes qui semblent les plus efficaces, le nombre de faux positifs est supérieur à 30%. Ainsi, une étude a montré que *TargetScan*, *PicTar* et *miRanda* semblent être les meilleures méthodes mais avec des sensibilités variant entre 65 et 68%. Des expériences biologiques sont donc indispensables pour valider des cibles prédites *in silico* d'un miARN.

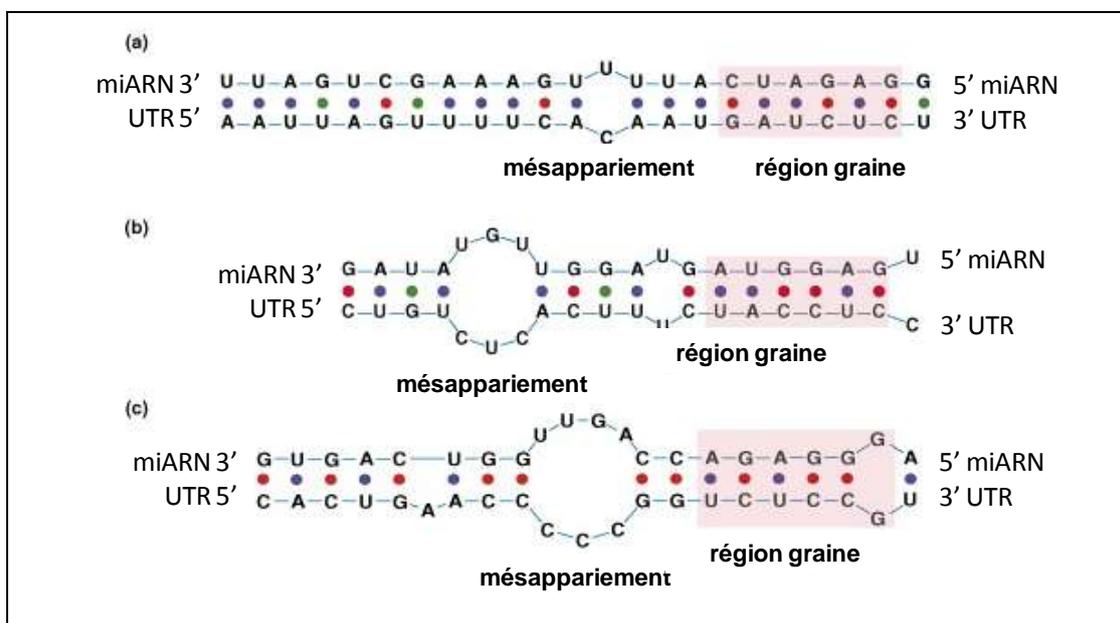


Figure 12: Trois grands types de structures secondaires de duplexe miARN/ARNm (Maziere and Enright 2007)

a) Les sites canoniques ont une forte complémentarité en 5' et 3' avec un mésappariement au milieu de la séquence du miARN ; b) Les sites avec une région graine dominante ont une bonne complémentarité en 5' mais une faible complémentarité en 3' ; Les sites dit de compensation ont un mésappariement en 5' de la région graine mais compensent avec un bon appariement en 3'.

b) Choix du brin guide

Jusqu'à récemment, des études suggéraient que le brin guide était déterminé par des propriétés thermodynamiques où le brin préférentiellement chargé dans le complexe RISC était celui dont l'extrémité 5' était la moins thermodynamiquement appariée avec le brin complémentaire (Schwarz, *et al.* 2003; Khvorova, *et al.* 2003). Alors, l'autre brin, le brin minoritaire, était dégradé et ne semblait pas avoir de rôle propre. Mais dans certains cas, le brin minoritaire semble fonctionnel, ce qui contredit cette théorie (Okamura, *et al.* 2008). En fait, des études récentes montrent que les séquences des deux bras sont triées et chargées dans différents complexes RISC selon la nature des protéines Argonautes présentes (Czech, *et al.* 2009; Ghildiyal, *et al.* 2010; Okamura, *et al.* 2009; Wang, B., *et al.* 2009). Le brin dominant, le moins thermodynamiquement stable en 5', serait associé à la protéine AGO1 pour réprimer la traduction protéique alors que le brin minoritaire serait associé à la protéine AGO2, douée d'une activité enzymatique, induisant un clivage de l'ARNm cible (Jinek and Doudna 2009). Même si ces études tendent à expliquer pourquoi certains ARNm cibles sont directement clivés par le complexe RISC, le mécanisme définissant le brin guide du passager n'est toujours pas clairement défini. Il est pourtant clair qu'un tel mécanisme existe puisque selon le type cellulaire ou le stade de développement, le brin le plus représenté n'est pas le même. Ainsi, Kuchen *et al.* montrent que miR-150-3p est plus exprimé dans des lymphocytes B alors que c'est la forme miR-150-5p qui est plus exprimée dans des lymphocytes T CD8⁺ chez l'Homme (figure 13) (Kuchen, *et al.* 2010).

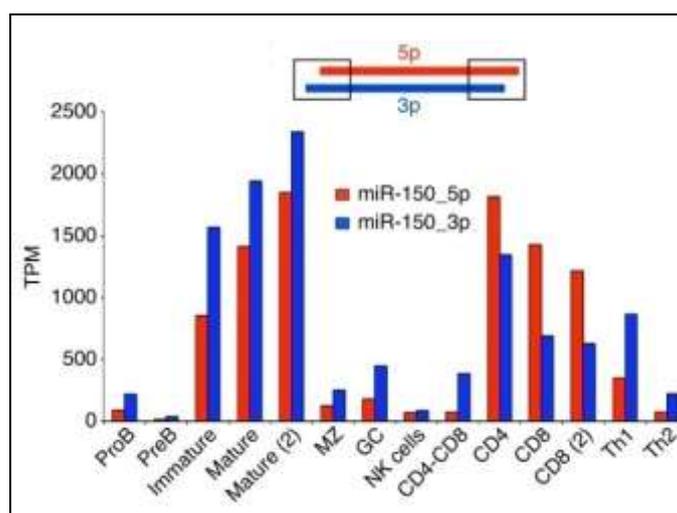


Figure 13: Fluctuations d'expression de miR-150-5p et -3p dans différentes populations lymphocytaires (Kuchen, *et al.* 2010)

(TPM : nombre de séquences correspondantes par million de séquences mesurées)

Initialement, les miARN sont décrits comme des inhibiteurs de la traduction protéique sans dégradation de l'ARNm. Ainsi, l'étude initiale de l'équipe d'Ambros, en 1993, montrait que le niveau d'ARNm *lin-14* était faiblement affecté, contrairement à la protéine LIN-14 (Lee, R. C., *et al.* 1993). Plus tard, d'autres études ont montré que le mécanisme d'inhibition de la traduction se déroulait lorsqu'il y avait complémentarité partielle entre le miARN et sa cible alors que lors de complémentarité parfaite, il y avait dégradation de l'ARNm cible (Huntzinger and Izaurralde 2011). Mais récemment, plusieurs études majeures faisant intervenir des analyses de transcriptomes et de protéomes entiers ont démontré que la dégradation des ARNm est l'effet le plus courant des miARN dans des cellules de mammifères en culture (Guo, *et al.* 2010; Selbach, *et al.* 2008; Baek, *et al.* 2008). Ainsi, 84% des protéines dont le niveau diminue après transfection de miARN présentent une diminution de leur niveau d'ARNm (Guo, *et al.* 2010). Cependant, la coexistence des deux phénomènes n'est pas exclue, et là encore plusieurs mécanismes peuvent intervenir.

c) Répression de la traduction protéique

Plusieurs études dont celles mettant en évidence *lin-4*, montrent que la quantité d'ARN cible est diminuée alors que le taux d'ARNm est inchangé (Lee, R. C., *et al.* 1993; Wightman, *et al.* 1993). De plus, *lin-4* est retrouvé avec les ribosomes et l'ARNm de *lin-14* par cosédimentation (Olsen and Ambros 1999). Ces expériences suggèrent donc que l'association du polysome à l'ARNm est inaltérée par le miARN. Mais dans ces expériences, la présence de peptides est indétectable ; Nottrott *et al.* suggèrent donc que le miARN pourrait induire la dégradation du peptide naissant (Nottrott, *et al.* 2006) alors que Petersen *et al.* proposent que le miARN cause une dissociation prématurée du ribosome (Petersen, *et al.* 2006). Cette dernière hypothèse semble plus probable car la dissociation des polysomes induite par des inhibiteurs de la traduction est plus rapide en présence des miARN (Petersen, *et al.* 2006). D'autres mécanismes ont été proposés, comme la dissimulation de la coiffe en 5' des ARNm par le complexe RISC puisque AGO2 contient un domaine de liaison à la coiffe, ce qui empêche la fixation du facteur d'initiation eIF4E (Kiriakidou, *et al.* 2007). Mais finalement, l'implication de ces mécanismes dans la fonction des miARN reste à élucider.

d) Dégradation des ARNm cibles

De nombreuses preuves indiquent clairement que les miARN induisent la dégradation des ARNm. En effet, l'altération des voies essentielles aux miARN (déletion de DICER ou AGO2) induit une augmentation de la quantité d'ARNm (Schmitter, *et al.* 2006), alors que l'introduction de miARN induit une diminution de la quantité d'ARNm (Guo, *et al.* 2010; Selbach, *et al.* 2008; Baek, *et al.* 2008).

Bien que certains miARN peuvent induire directement un clivage enzymatique par AGO2, ce mode d'action ne semble pas le mécanisme principal de la dégradation des ARNm cibles. La diminution de la quantité d'ARNm cible semble être due à une élimination de la queue polyA des ARNm cibles pour lesquels les miARN sont partiellement complémentaires (Wu, L., *et al.* 2006; Eulalio, *et al.* 2007). La déadénylation induit alors une perte de la coiffe protectrice en 5' des ARNm. Les ARNm décoiffés sont alors rapidement dégradés majoritairement par la 5'-3' exonucléase XRN1 présente dans le cytoplasme. L'inhibition de la traduction protéique est alors irréversible.

La dégradation des ARNm semble avoir lieu dans des sites cytoplasmiques particuliers ou *Processing bodies (P-bodies)* (Eystathioy, *et al.* 2002; Liu, J., *et al.* 2005a). L'intérêt de ces structures n'est pas clairement établi, mais ces agrégats ribonucléiques, assez larges pour être visualisés en microscopie, contiennent des fortes concentrations en miARN et protéines associée au miARN (Argonautes, XRN1, *etc*) (Liu, J., *et al.* 2005b). De plus, la déplétion de protéines associées au complexe RISC induit une dégradation de *P-bodies* et empêche la fonction de miARN (Liu, J., *et al.* 2005a). Ces *P-bodies* permettraient une séquestration des miARN, réversible dans certains cas, et une concentration des éléments nécessaires à la fonction des miARN pour une efficacité optimale (Kulkarni, *et al.* 2010).

En résumé, l'implication préférentielle des miARN dans l'inhibition de la traduction protéique ou dans la dégradation des ARNm n'est pas élucidée. Mais des résultats suggèrent une action séquentielle où l'inhibition de la traduction serait un événement précoce, de l'ordre de quelques dizaines de minutes, et que la dégradation serait une étape secondaire (Mathonnet, *et al.* 2007).

e) Activation de la traduction protéique

Paradoxalement, les miARN semblent capables d'activer la traduction protéique. Ainsi, le hsa-miR-369-3 s'associe directement à des séquences riches en AU de l'ARNm du TNF α ce qui permet le recrutement d'AGO2 et la protéine *fragile X mental retardation-related protein 1 (FXR1)* pour activer la traduction de gènes dans des conditions de privation en sérum (Vasudevan, *et al.* 2007). De plus, let-7 induit une surexpression de gènes dans des cellules en arrêt du cycle cellulaire alors qu'il induit une répression d'expression de gènes dans des cellules en prolifération. De même, miR-373 se fixe aux promoteurs des gènes *cold-shock domain-containing protein C2 (CSDC2)* et de l'E-cadherine et induit leur surexpression dans des cellules humaines (Place, *et al.* 2008). Cependant, pour expliquer l'augmentation d'expression d'un gène après surexpression d'un miARN et en absence de preuve de lien direct, l'argument le plus souvent avancé est un effet indirect du miARN où la répression d'un inhibiteur par le miARN induit une augmentation de l'effet de la cible de l'inhibiteur.

f) Rôle de leurre

En plus de leur capacité de liaison à l'ARN ou à l'ADN, les miARN peuvent se lier au site de liaison à l'ARN de protéines de régulation pour inhiber leur fonction (Eiring, *et al.* 2010). Ainsi, miR-328 semble avoir un rôle de leurre ou d'éponge pour la protéine hnRNP E2 pour empêcher sa liaison avec l'ARNm de CEBPA.

Finalement, les miARN, par différents mécanismes, semblent être des acteurs importants du contrôle de l'expression des gènes. Cette importance ne tient pas dans la force de répression d'une cible où le changement d'expression observé atteint rarement une diminution de plus de 3 fois, mais dans la rapidité d'intervention, de l'ordre de dizaines de minutes, et du nombre de cibles atteintes, de l'ordre de plusieurs centaines (Mathonnet, *et al.* 2007).

5) Intérêts cliniques de l'étude des miARN

a) Les miARN comme biomarqueurs

Tout comme l'expression d'autres gènes, l'expression de miARN peut être utilisée comme mesure diagnostique voire pronostique. De surcroît, des miARN peuvent être mesurés dans divers fluides biologiques (Weber, *et al.* 2010). Ainsi, Weber *et al.* ont mesuré l'expression de miARN dans 12 liquides biologiques dont les urines, la salive et le plasma, et ont montré que la composition en miARN varie d'un fluide à l'autre. Au contraire des ARNm qui sont rapidement dégradés, notamment par les RNases, les miARN semblent moins sensibles à la dégradation. Cette résistance est telle qu'une incubation de plasma durant 24 heures à température ambiante ou l'alternance de huit cycles de congélation/décongélation n'altère pas l'expression des miR-15b, miR-16 et miR-24 (Mitchell, *et al.* 2008). De plus, puisque des ARN synthétiques ajoutés dans le plasma sont rapidement dégradés, au contraire des miARN endogènes, Mitchell *et al.* en concluent que les miARN endogènes sont sous une forme qui leur permet une résistance aux RNases endogènes. Cette résistance à la dégradation peut être due à la présence des miARN dans des exosomes comme c'est le cas pour miR-150 sécrété par les monocytes (Zhang, *et al.* 2010) ou plus majoritairement par leur état complexé à des protéines Argonautes (Turchinovich, *et al.* 2011). Ces miARN présents hors des cellules sont donc soit libérés par des cellules mortes soit libérés par un phénomène actif dans le cadre de signalisation. Quoiqu'il en soit, la présence de ces miARN dans le plasma ou les urines de patients en fait des biomarqueurs potentiels. Ainsi, Mitchell *et al.* montrent que la mesure de miR-141 dans le plasma semble un bon biomarqueur diagnostique puisque l'AUC d'une courbe ROC est de 0,907, avec 25 patients atteints d'un cancer de la prostate et 25 individus sains (Mitchell, *et al.* 2008).

Dans les urines, le ratio d'expression miR-126/ miR-152 montre une augmentation moyenne de 9,9 fois chez des patients atteints de cancer de la vessie comparés à des individus sains (Hanke, *et al.*). L'exploration de l'expression des miARN dans une pathologie représente donc un double avantage : la compréhension de réseau de gènes médiés par ces miARN impliqués dans un état pathologique et la possibilité d'identifier de nouveaux biomarqueurs.

b) Intérêt thérapeutique des miARN

Puisque l'expression de miARN est dérégulée dans certaines pathologies, les miARN peuvent être des cibles thérapeutiques. De plus, la capacité d'un miARN à réguler plusieurs gènes en fait de bons candidats. Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour réduire l'expression d'un miARN dont l'utilisation d'oligonucléotides complémentaires à la séquence du miARN ciblé (Garzon, *et al.* 2010). Dans ce cas, ces oligonucléotides sont des ARN modifiés chimiquement pour ne pas être dégradés par les RNases et plus affins envers leur cible. Plusieurs modifications ont été décrites, dont des ARN simples brins avec un groupe méthylène en 2' de l'atome d'oxygène du ribose, des ARN simples brins conjugués avec des molécules de cholestérol, qui sont alors appelés des *antagomirs*, et les *Locked Nucleic Acid* (LNA) où le ribose est bloqué en conformation 3' endo par une liaison covalente liant l'atome d'oxygène en 2' et l'atome de carbone en 4' (Garzon, *et al.* 2010). Krutzfeldt *et al.* ont montré qu'un *antagomir* ciblant miR-122 était spécifique et efficace dès 24 heures et à long terme puisque son effet est présent 23 jours après l'injection en intraveineuse chez la souris. Par ailleurs, l'injection d'un *antagomir-16* inhibe la présence de miR-16 dans tous les tissus sauf dans le cerveau (Krutzfeldt, *et al.* 2005). De même, l'utilisation de LNA dirigé contre le miR-122 inhibe durablement l'expression de miR-122 dans le foie et diminue sa charge virale dans un modèle d'hépatite C chez le chimpanzé (Lanford, *et al.* 2010). Ces résultats suggèrent l'utilisation de cet inhibiteur pour prévenir l'infection d'hépatite C chronique, qui fait d'ailleurs l'objet d'un essai de phase II promu par la société *Santaris Pharma*.

L'utilisation d'oligonucléotides « éponges » est aussi une stratégie possible pour réprimer un miARN (Garzon, *et al.* 2010). Ces éponges ou ces leurres sont des ARN transcrits par un vecteur viral qui contiennent plusieurs séquences cibles du miARN qui va alors s'y fixer. L'utilisation d'un gène rapporteur comme la Green Fluorescent Protein (GFP) permet de déterminer facilement l'efficacité de ce système. Choi *et al.* ont décrit l'utilisation de « miR-masks » qui consistent en oligonucléotides modifiés chimiquement et parfaitement complémentaires d'un site ciblé par un miARN (Choi, *et al.* 2007). Dans ce cas, le *miR-mask* va recouvrir la séquence cible du miARN sur l'ARNm et empêcher sa fixation et donc la répression du gène. Ainsi, cette approche est spécifique d'un gène et n'induit pas des effets aspécifiques.

A l'inverse, il est aussi possible d'augmenter l'expression d'un miARN dans une pathologie où sa diminution est impliquée. Ainsi, l'injection de miARN synthétiques, modifiés chimiquement pour éviter leur dégradation, ou « mimics », a été décrite *in vitro* (Garzon, *et al.* 2010). De même, l'injection de pré-miARN est envisageable, mais n'a aussi été décrite qu'*in vitro*. Enfin, l'utilisation de vecteurs viraux codant pour un miARN, a été décrite pour la première fois par Kota *et al.* en 2009 (Kota, *et al.* 2009). L'injection en intraveineuse d'un *adenovirus-associated vector* (AAV) codant pour le miR-26, absent des cellules du cancer du foie d'un modèle murin, inhibe la prolifération cancéreuse et l'induction de l'apoptose spécifique de ces cellules, sans signe de toxicité.

Ainsi, l'injection *in vivo* d'un inhibiteur ou d'un *mimic* de miARN semble possible pour prévenir ou guérir une pathologie. Ces stratégies, pour l'instant à l'essai, sont donc prometteuses lorsque la dérégulation d'un miARN a été identifiée, comme c'est le cas de certains cancers. Cependant, l'utilisation de ces stratégies est confrontée aux problèmes de faible délivrance de l'oligonucléotide synthétique, et surtout au large spectre d'action d'un miARN qui peut induire de nombreux effets non souhaités, au lieu de délivrance ou dans d'autres types cellulaires.

6) Importance des miARN dans le contrôle de l'immunité

La première description de l'implication des miARN dans le système immunitaire date de 2004. Chen *et al.* ont identifié 3 miARN préférentiellement exprimés dans les cellules hématopoïétiques : miR-142, miR-181a et miR-223 (Chen, C. Z., *et al.* 2004). Cette étude montre que les miARN jouent des rôles importants dans l'hématopoïèse, où miR-181 est préférentiellement impliqué dans le développement des lymphocytes B, miR-142 dans les lymphocytes B et les cellules myéloïdes alors que miR-223 est confiné aux cellules myéloïdes (Chen, C. Z., *et al.* 2004). De façon surprenante, la délétion du gène de *Dicer* pendant les phases précoces du développement lymphocytaire T montre que les miARN ne sont pas impératifs dans l'engagement de la voie CD4⁺ ou CD8⁺ (Cobb, *et al.* 2005). Cependant, le nombre de thymocytes est réduit, et une réduction de 90% des cellules circulantes suggère un rôle des miARN dans la prolifération des lymphocytes T. Pour les lymphocytes B, la délétion de *Dicer* à des stades précoces induit un blocage complet à la transition pro-B vers pré-B dû à une apoptose massive au stade pré-B (Koralov, *et al.* 2008). Une accumulation de la protéine pro-apoptotique *Bim* due à l'absence de régulation de son expression par miR-17-92 semble être en partie en cause. A des stades plus tardifs, l'absence de *Dicer* induit un blocage de la transition des cellules B de la zone marginale vers la zone folliculaire, un défaut de réarrangement des gènes des Ig et une forte production d'Ac (Belver, *et al.* 2010). Parmi les miARN présentant une expression différentielle entre les cellules B de la zone marginale et de la zone folliculaire, Belver *et al.* ont mis en évidence l'implication de miR-185, qui en situation normale régule l'expression de la protéine Bruton tyrosine kinase (Btk) impliquée dans la différenciation des cellules B. Ces approches ont

démonstré l'implication des miARN dans le contrôle de l'immunité, notamment dans la différenciation des cellules du système immunitaire. Cependant l'identification du rôle d'un miARN en particulier est difficile dans ces systèmes où plusieurs miARN sont impliqués.

La description du profil d'expression de miARN dans des cellules triées est aussi une approche utile pour identifier des fonctions possibles selon un type cellulaire particulier ou un stade de développement (Kuchen, *et al.* 2010; Basso, *et al.* 2009; Landgraf, *et al.* 2007; Liang, *et al.* 2007; Merkerova, M., *et al.* 2008a; Wu, H., *et al.* 2007). Ainsi, ces études ont mis en évidence que miR-122a est principalement exprimé dans le foie, contrairement à miR-15 exprimé dans tous les types cellulaires analysés (Liang, *et al.* 2007), ou que miR-150 principalement exprimé dans les lymphocytes B et T (Merkerova, M., *et al.* 2008a). Plus récemment, Basso *et al.* ont mis en évidence 66 nouveaux miARN exprimés dans les lymphocytes B à différents stades (Basso, *et al.* 2009).

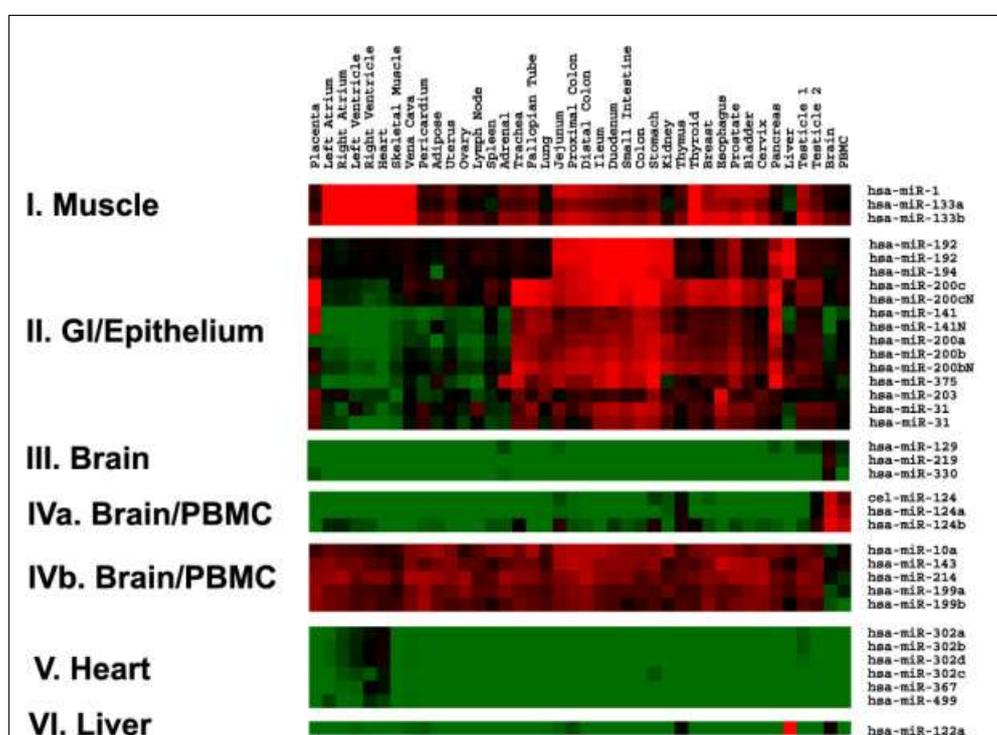


Figure 14: Profil d'expression de miARN en fonction du type cellulaire analysé (Liang, *et al.* 2007)

Les miARN, en lignes, sont regroupés selon leur profil d'expression. Les valeurs sont identifiées selon un code couleur où le vert représente une faible expression et le rouge une forte expression.

De façon similaire, Wu *et al.* ont analysé l'expression des miARN de lymphocytes T CD8⁺ naïfs, effecteurs et mémoires (Wu, H., *et al.* 2007). Des 94 miARN clonés à partir des 3 populations de lymphocytes CD8⁺, 7 miARN représentent à eux seuls environ 60% de l'ensemble des miARN clonés, dont miR-142-3p qui est le plus représenté, ce qui est en accord avec ce qu'avait décrit Landgraf *et al.* (Landgraf, *et al.* 2007). De plus, 6 des 7 miARN (miR-16, miR-142-3p, miR-142-5p, miR-150, miR-

15b and let-7f) sont sous-exprimés après stimulation antigénique. Il est donc possible que la synthèse protéique nécessaire après une stimulation antigénique requiert la sous-expression de ces miARN qui, en conditions basales, répriment l'expression de ces protéines. Ainsi, ces études ont permis de mettre en évidence quelques miARN individuels impliqués dans le contrôle de la réponse immunitaire, même si le rôle de chacun reste à élucider.

a) L'oncomiR-21 dans l'immunité

Parmi les 7 miARN décrits par Wu *et al.*; miR-21 est le seul à être surexprimé après stimulation antigénique (Wu, H., *et al.* 2007). Ce miARN est l'un des plus fréquemment surexprimés dans le cadre de cancers et est de ce fait classé en « oncomiR » (Kumarswamy, *et al.* 2011). Puisque sa surexpression induit la prolifération cellulaire et diminue l'apoptose et que son inhibition réduit la prolifération et l'invasion cellulaire, ce miARN a été décrit comme une cible thérapeutique anti-tumorale potentielle. Il est donc probable que lors d'une stimulation antigénique miR-21 favorise la survie des lymphocytes activés. Par ailleurs, Shedy *et al.* ont montré que la stimulation par le lipopolysaccharide (LPS) de PBMC totaux, et plus particulièrement de macrophages, induisait une augmentation de l'expression de miR-21 et une diminution d'une de ses cibles, la protéine *Programmed Cell Death 4* (PCD4) qui inhibe la progression de tumeurs et la production d'Il-10 (Shedy, *et al.* 2010). Ces résultats suggèrent donc qu'en plus de favoriser la survie, miR-21 intervient dans une boucle de régulation négative, où après une stimulation par le LPS, miR-21 entraîne l'augmentation d'Il-10 par inhibition de PCD4. De plus, l'expression de miR-21 est augmentée dans les lymphocytes Treg et induit par un mécanisme indirect l'expression de FOXP3 (Rouas, *et al.* 2009). Ainsi, ces résultats qui impliquent miR-21 dans des processus inflammatoires, ouvrent de nouvelles opportunités thérapeutiques, notamment dans le contrôle de l'activation de la voie TLR4.

b) miR-155, l'exemple du miARN multifonctionnel

Tout comme miR-21, miR-155 est considéré comme un oncomiR puisqu'il est impliqué dans divers cancers (Tili, *et al.* 2009). miR-155 est codé par une région connue sous le nom de *B cell integration cluster* (Bic) identifiée initialement comme site d'intégration de virus. Ainsi, une forte expression de Bic et donc de miR-155 est impliquée dans des lymphomes diffus à grandes cellules B et la mesure de son expression a été envisagée comme mesure pronostique de la survie des patients atteints de ces lymphomes (Tili, *et al.* 2009). Mais miR-155 est exprimé dans de nombreux types cellulaires et possède toutes les caractéristiques qui en font un miARN ayant de multiples fonctions puisqu'il semble avoir des fonctions différentes selon le type cellulaire où il est exprimé (figure 15). Ainsi, miR-155 semble impliqué dans l'hématopoïèse puisque son expression est 200 fois plus faible dans des globules rouges matures que dans des cellules progénitrices, à l'inverse une augmentation

de 270 fois de miR-451 est observée (Masaki, *et al.* 2007). Ce miARN semble aussi avoir un rôle dans le système rénine-angiotensine puisqu'une de ses cibles est le gène codant pour le récepteur de type 1 à l'angiotensine (AT1R) (Martin, *et al.* 2006). Plusieurs équipes ont aussi montré que des souris déficientes en miR-155 (miR-155^{-/-}) avaient des défauts immunitaires, notamment pour les lymphocytes B puisque ces souris ont un centre germinatif réduit et ne produisent pas d'Ac de type IgG1 de haute affinité (Rodriguez, *et al.* 2007; Thai, *et al.* 2007; Vigorito, *et al.* 2007). D'après une analyse transcriptomique, 185 gènes présentaient une expression altérée dans les lymphocytes B activés de ces souris miR-155^{-/-}, dont 60 étaient des cibles potentielles de miR-155. Rodriguez *et al.* ont aussi montré dans leur analyse des souris miR-155^{-/-} que les lymphocytes T CD4⁺ se différencient plus en lymphocytes T helper 2 (Th2) qu'en Th1 et produisent plus de cytokines Th2 (IL-4, IL-5 et IL-10) (Rodriguez, *et al.* 2007). A l'inverse, Banerjee *et al.* ont montré que la surexpression de miR-155 dans des lymphocytes T CD4⁺ activés promeut la différenciation Th1 (figure 15) (Banerjee, *et al.* 2009).

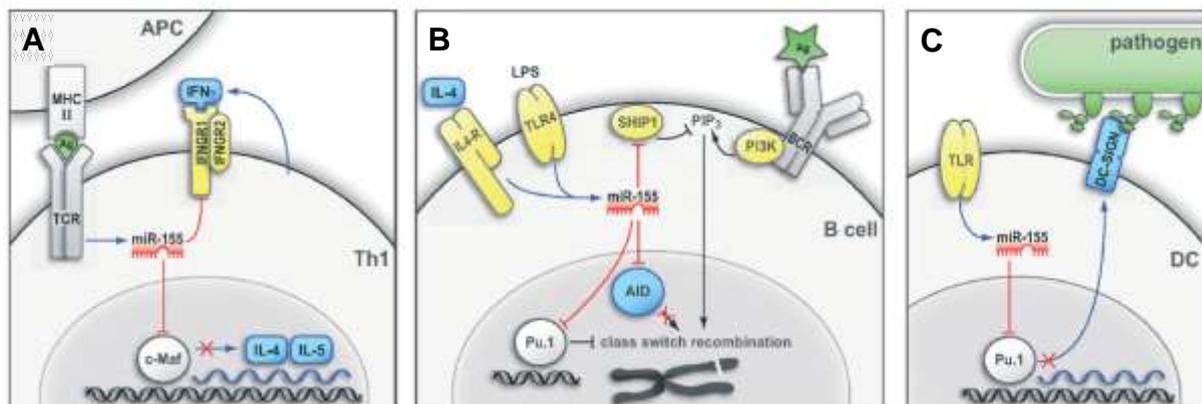


Figure 15: Exemples de fonctions de miR-155 dans des cellules immunitaires (Schott and Stoecklin 2010)

A) L'activation du TCR induit l'expression de miR-155 dans les lymphocytes CD4⁺ naïfs. miR-155 contribue à la différenciation des lymphocytes T activés en lymphocytes Th1 en réprimant l'expression du facteur de transcription c-Maf et de la sous-unité 1 du récepteur à l'IFN γ . B) Dans les lymphocytes B, miR-155 est induit après stimulation au LPS ou à l'IL-4 et contribue alors au changement de classe des Ig en réprimant l'expression du facteur de transcription Pu.1 et de la phosphatidylinositol 5'-phosphatase SHIP1. miR-155 réprime aussi la désaminase induite par l'activation (AID) et prévient les translocations chromosomiques aberrantes. C) Lors de la différenciation des cellules dendritiques immatures en cellules dendritiques matures, après stimulation par les TLR, miR-155 induit la répression DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) via la répression de Pu.1 par miR-155. DC-SIGN est une lectine qui promeut la phagocytose chez les cellules dendritiques immatures.

Ainsi, plusieurs études ont mis en évidence l'implication de miR-155 dans des cellules du système immunitaire et son expression est modifiée dans des processus pathologiques. miR-155 est

surexprimé dans des PBMC de patients atteints d'arthrite rhumatoïde par rapport à des individus sains, ainsi que miR-146a (Pauley, *et al.* 2008), mais aussi dans les monocytes du liquide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde comparé aux monocytes périphériques chez les mêmes patients ou des individus sains (Stanczyk, *et al.* 2008). De plus, Stanczyk *et al.* ont montré que l'expression de miR-155 peut être augmentée dans des fibroblastes de la synovie de patients atteints d'arthrite rhumatoïde par différents stimuli pro-inflammatoires dont le TNF α et le LPS. Par ailleurs, la surexpression de miR-155, et celle de miR-34a et de miR-326, a été montrée dans des astrocytes présents dans des lésions de sclérose en plaque (Junker, *et al.* 2009). La surexpression de ces 3 miARN réprime l'expression de CD47, une molécule qui prévient la phagocytose par les macrophages. La dérégulation de l'expression de ces miARN peut donc contribuer à la levée d'une inhibition des macrophages, promouvant la phagocytose de molécules comme la myéline et favorisant un environnement inflammatoire. Renforçant le rôle potentiel de ce miARN dans les maladies auto-immunes, les souris n'exprimant pas le gène Bic (miR155^{-/-}) ne développent pas d'arthrite induite, d'Ac autoréactifs, et sont résistantes à l'EAE. Récemment, Wang *et al.* ont montré que les taux sériques de miR-155 et miR-146a étaient plus faibles chez des patients atteints de lupus érythémateux (SLE) comparés à des individus sains et corrélés au taux de filtration glomérulaire. Cependant, ces diminutions de niveau d'expression dans le sérum de miARN peuvent être dues à des facteurs confondants comme la présence d'immunosuppresseurs puisque le taux de miR-155 était inversement corrélé au dosage de prédnisolone. En résumé, l'expression aberrante de miR-155 est observée dans divers dérèglements pathologiques et l'absence de miR-155 prévient le développement d'automimmunité chez les souris miR-155^{-/-}. Par contre, seules quelques cibles de miR-155 ont été décrites et le fonctionnement de ce miARN reste à approfondir.

c) miR-142-3p, fortement exprimé dans les PBMC

Comme vu précédemment, miR-142-3p est décrit selon les études comme le ou un des miARN les plus exprimés dans les PBMC chez l'Homme (Landgraf, *et al.* 2007; Merkerova, M., *et al.* 2008a; Wu, H., *et al.* 2007). L'expression de ce miARN est restreinte aux cellules hématopoïétiques (Landgraf, *et al.* 2007), bien que Wu *et al.* ont décrit son expression dans des cellules dérivées d'hépatocarcinome; le statut cancéreux de ces cellules peut être à l'origine de la réactivation de ce miARN (Wu, L., *et al.* 2011). L'implication indirecte de miR-142 a été démontrée dans des processus cancéreux puisque, dans des lymphomes B, le gène c-Myc est transloqué à la suite du gène codant miR-142, et est alors sous le contrôle du promoteur du gène de miR-142 (Robbiani, *et al.* 2009). L'expression de miR-142-3p est réprimée par le gène FOXP3 dans les lymphocytes Treg, même si le mécanisme utilisé n'est pas connu (Huang, B., *et al.* 2009). L'expression du gène de l'adénylate cyclase 9 (ADY9) impliquée dans la production d'adénosine monophosphate cyclique (AMPC)

nécessaire à la signalisation des Treg, n'est alors plus réprimée par miR-142-3p. Par ailleurs, miR-142-3p réprime l'expression du gène de l'Il-6 dans les cellules dendritiques, une cytokine pro-inflammatoire et son expression est diminuée en cas de stimulation des cellules dendritiques au LPS, au contraire de l'expression du gène de l'IL6 qui est alors augmentée (Sun, Y., *et al.* 2011). Ces résultats montrent que miR-142-3p a un rôle dans le contrôle de la réaction immunitaire, au moins en permettant la différenciation de lymphocytes T en Treg et en contrôlant la production d'Il-6 par les cellules dendritiques.

Il est à noter que l'utilisation des séquences cibles de miR-142-3p dans des lentivirus a été utilisée pour le transfert de gène *in vivo* (Brown, *et al.* 2006). Cette stratégie de vecteur « éponge » utilise l'expression spécifique aux cellules hématopoïétiques de miR-142-3p. La présence des séquences cibles de miR-142-3p empêche la production d'une protéine dans les cellules hématopoïétiques où est exprimé miR-142-3p et une expression de la protéine voulue dans les autres types cellulaires.

De nombreux autres miARN ont été décrits comme jouant des rôles dans le système immunitaire et étant dérégulés dans des processus pathologiques. Par exemple, miR-150, miR-146a, miR-155 et miR-181 sont associés à la différenciation des cellules B (Spierings, *et al.* 2011), une déficience en miR-146a de lymphocytes Treg abolit leurs capacités suppressives (Lu, *et al.* 2010), miR-223, principalement exprimé dans la lignée myéloïde, régule négativement la prolifération et la différenciation des neutrophiles par la répression du facteur de transcription Mef2c (Liu, Q., *et al.* 2011a), *etc.*

7) Implications des miARN en transplantation rénale

a) miARN et physiopathologie du rein

La comparaison des profils d'expression de différents tissus montre que certains miARN sont enrichis dans le rein, tels que miR-192, miR-194 et miR-204 (Landgraf, *et al.* 2007). Par ailleurs, 3 équipes ont montré que la délétion de *Dicer* (*Dicer*^{-/-}) spécifiquement dans les podocytes a des impacts majeurs sur la fonction du rein (Harvey, *et al.* 2008; Ho, *et al.* 2008; Shi, *et al.* 2008). Des altérations phénotypiques majeures ont été observées dès 2 à 4 semaines chez les souris *Dicer*^{-/-}, dont l'apparition d'une protéinurie, et la progression des altérations phénotypiques fut accompagnée de scléroses glomérulaires, de FI/AT, aboutissant à la perte de fonction du rein et à la mort des souris après 6 à 8 semaines. Ces 3 groupes montrent que des miARN de la famille miR-30 sont impliqués dans ces phénotypes (Harvey, *et al.* 2008; Ho, *et al.* 2008; Shi, *et al.* 2008). Récemment, la délétion de l'enzyme *Drosha* toujours spécifiquement dans les podocytes a confirmé l'importance des miARN dans le développement du rein (Zhdanova, *et al.* 2011). De plus, la délétion

de *Drosha* chez des souris de 2 à 3 mois induit des glomérulopathies, avec apparition de protéinurie et une inflammation interstitielle du rein. Ainsi, les miARN semblent indispensables au développement du rein mais aussi à sa fonction.

La délétion spécifique de *Dicer*, non plus dans les podocytes, mais dans les cellules tubulaires des tubules contournés proximaux n'induit pas de phénotype anormal chez les souris (Wei, *et al.* 2010). Cependant, après une ischémie et reperfusion, les animaux déficients en *Dicer* ont moins de lésions histologiques et moins de cellules en apoptose, ce qui se traduit par une fonction rénale meilleure que pour les contrôles. *Dicer* semble donc jouer un rôle dans les lésions rénales observées suite à une ischémie/reperfusion. En effet, Godwin *et al.* ont identifié 9 miARN différentiellement exprimés entre des souris ayant subi une ischémie par rapport à des contrôles (miR-20a, miR-21, miR-146a, miR-187, miR-192, miR-194, miR-199a-3p, miR-214 et miR-805) (Godwin, *et al.* 2010). Puisque les altérations d'expression de ces miARN sont aussi retrouvées dans des souris immunodéficientes (souris RAG2^{-/-}, γ_0 ^{-/-}), ces altérations semblent indépendantes des lymphocytes et cette signature de miARN associée à l'ischémie pourrait être utilisée pour déterminer les dommages induits par une ischémie dans le rein.

L'implication de miARN a aussi été montrée dans différentes pathologies rénales. Ainsi, Kato *et al.* ont montré la surexpression de miR-192 dans des cellules mésenchymales stimulées par le TGF β 1 et dans des cellules glomérulaires d'un modèle murin de néphropathie diabétique (Kato, *et al.* 2007). miR-192 cible le *E-box repressor Smad-1 interacting protein* (SIP1) et sa répression par miR-192 induit la production de collagène en réponse au TGF β 1. Chung *et al.* ont confirmé ces résultats en montrant que miR-192 est induit par le TGF β 1 produisant ainsi du collagène dans un modèle de fibrose rénale (Chung, *et al.* 2010). Mais de façon surprenante, Krupa *et al.* ont montré une perte d'expression de miR-192 dans les biopsies rénales de patients atteints de néphropathie d'origine diabétique (Krupa, *et al.* 2010). De plus, cette diminution d'expression est corrélée avec la fonction rénale et le niveau de fibrose interstitielle. Pour l'heure, la différence d'expression de miR-192 dans le modèle murin et chez l'Homme n'est pas expliquée. Dans un modèle de fibrose rénale, par obstruction urétrale unilatérale dans des souris, une signature de miARN a été mise en évidence (Zarjou, *et al.* 2011). Parmi ceux-ci, miR-192 et miR-194, miARN enrichis dans le rein d'après d'autres études (Landgraf, *et al.* 2007), sont sous-exprimés. Ces résultats sont cohérents avec la sous-expression de miR-192 observée par Krupa *et al.* dans les biopsies rénales de patients atteints de néphropathie d'origine diabétique (Krupa, *et al.* 2010), et celles de miR-192 et miR-194 observées dans un modèle d'ischémie/ reperfusion (Godwin, *et al.* 2010). De plus, une surexpression de miR-21 est observée, principalement localisée aux cellules épithéliales tubulaires distales, et le blocage de miR-21 par un antagomir diminue la fibrose rénale, par une diminution de l'expression de protéines pro-fibrotiques (collagènes, fibronectine, *etc*) et une diminution de l'infiltration des macrophages (Zarjou, *et al.*

2011). Ces résultats démontrent l'implication des miARN dans la fibrose rénale, qui est une composante majeure de nombreuses pathologies rénales, et l'intérêt thérapeutique potentiel des antagomirs.

La transition épithélio-mésenchymateuse, impliquée dans la progression de la fibrose rénale, et qui peut être induite par le TGF β 1, implique aussi l'intervention de miARN. Ainsi, plusieurs études montrent que les miARN de la famille miR-200 (miR-200a, -b et -c, miR-141 et miR-429) sont réprimés en réponse au TGF β 1 et que au contraire, leur surexpression pourrait empêcher le développement de la fibrose (Bracken, *et al.* 2008; Wang, G., *et al.* 2010a; Oba, *et al.* 2010). En effet, une injection intraveineuse du précurseur de miR-200b est suffisante pour inhiber l'augmentation de la production de collagène (type I et II) et de fibronectine (Oba, *et al.* 2010). Les auteurs suggèrent que l'utilisation de miR-200b pourrait inhiber la progression de fibrose. L'expression des miARN de la famille miR-200 a aussi été analysée dans des biopsies de patients atteints de néphropathie à IgA (Wang, G., *et al.* 2010b). L'expression de miR-200c est diminuée dans ces biopsies par rapport à des biopsies contrôles et est corrélée avec le taux de protéinurie et l'expression de cadherine E. Dans ce cas, la diminution de miR-200c n'est pas spécifique de la néphropathie à IgA mais résulte d'altérations du greffon.

En 2008, Lee *et al.* ont mis en évidence une diminution de miR-15a dans les kystes hépatiques dans un modèle de polykystose rénale familiale récessive chez le rat (Lee, S. O., *et al.* 2008). miR-15a réprime l'expression de Cdc24a, un régulateur du cycle cellulaire, et est corrélé à la prolifération cellulaire et la formation de kystes. Mais, Pandey *et al.* ont reporté l'expression différentielle de 30 miARN, dont miR-21, puis dans une deuxième étude l'expression différentielle de 9 autres miARN associés à la polykystose rénale (Pandey, *et al.* 2008; Pandey, *et al.* 2011). Chaque étude utilise un modèle différent de polykystose rénale chez le rat, ce qui pourrait expliquer que les mêmes miARN ne soient pas retrouvés. De plus amples investigations sont donc nécessaires, notamment chez l'Homme puisqu'aucune étude chez des patients atteints de polykystose rénale n'a été réalisée.

b) miARN et immunité de la transplantation

D'après les exemples cités précédemment, il semble clair que les miARN participent au contrôle de la fonction immunitaire et participent aux mécanismes physiopathologiques se déroulant dans le rein. La réponse aux alloantigènes et les lésions rénales après transplantation font donc intervenir des miARN. En effet, Sui *et al.* sont les premiers à avoir mesuré les miARN dans des biopsies de reins de patients transplantés en épisode de rejet aigu en utilisant la technologie des puces à ADN (Sui, *et al.* 2008). Ils ont identifié 71 miARN exprimés parmi 455 mesurés dont 20 différentiellement exprimés dans un mélange des ARN extraits à partir de 3 biopsies de patients en épisode de rejet aigu par rapport à un mélange des ARN extraits de 3 contrôles (12 miARNs sous-exprimés et 8 sur-

exprimés). Les 2 miARN les plus différentiels, miR-320 et miR-324-3p, ont été confirmés par PCR quantitative, mais l'utilisation d'une puce à ADN, de deux mélanges d'ARN issus d'individus différents et l'absence d'échantillon de validation rendent difficile l'interprétation de ces résultats (Sui, *et al.* 2008). Une seconde étude a été réalisée avec des biopsies de patients transplantés rénaux en épisode de rejet aigu en comparaison à des biopsies de patients présentant une histologie normale (Anglicheau, D., *et al.* 2009a). Dans ce cas, les auteurs ont identifié 53 miARN différentiellement exprimés entre 3 biopsies de patients en épisode de rejet aigu et 4 biopsies de patients contrôles (figure 16). Seul miR-125a est retrouvé dans les 2 études (Sui, *et al.* 2008; Anglicheau, D., *et al.* 2009a). Six miARN ont ensuite été validés dans un groupe de biopsies de validation (9 biopsies de patients transplantés rénaux en épisode de rejet aigu et 17 biopsies de patients présentant une histologie normale) (figure 16). Les auteurs ont ensuite montré une corrélation de miR-142-5p, miR-155 et miR-223 avec l'expression du gène de CD3 ; il semble que l'augmentation de l'expression de ces miARN soit due à l'infiltration de cellules lymphocytes T dans le greffon. De même, une corrélation de miR-30a-3p, miR-10b et let-7c avec l'expression de gènes spécifiques des cellules rénales tubulaires, NKCC2, USAG1, semblent dues aux cellules résidentes du rein. Enfin, puisque les AUC en courbe ROC de miR-142-5p, miR-155 et miR-223 sont respectivement de 0,99, de 0,98 et de 0,96, ces résultats suggèrent que ces miARN pourraient être utilisés comme biomarqueurs afin d'aider au diagnostic histologique du rejet aigu.

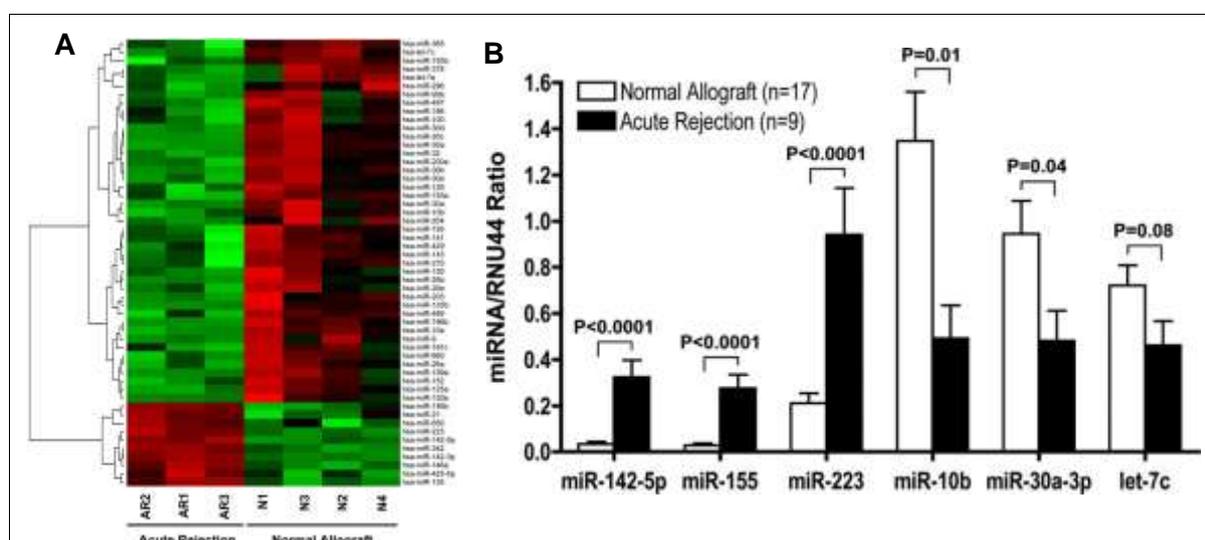


Figure 16 : miARN différentiellement exprimés dans des biopsies de patients transplantés rénaux en épisode de rejet aigu et dans des biopsies normales (Anglicheau, D., *et al.* 2009a)

A) Regroupement hiérarchique des 53 miARN différentiellement exprimés entre 3 biopsies de patients en épisode de rejet aigu et 4 biopsies de patients contrôles. B) Validation de 6 miARN dans un groupe de biopsies de validation (9 biopsies de patients transplantés rénaux en épisode de rejet aigu et 17 biopsies de patients présentant une histologie normale).

En résumé, la découverte récente des miARN a permis d'identifier un système majeur dans le contrôle de l'expression des gènes. De plus, ces systèmes, présents dans les processus normaux, semblent aussi être impliqués dans des systèmes pathologiques cancéreux, infectieux et auto-immuns. La compréhension de ces mécanismes dans le cadre de la transplantation rénale permettrait de mieux comprendre les systèmes de régulation des gènes dans le devenir des greffes. L'identification de miARN dans ces processus pourrait aussi permettre d'identifier des biomarqueurs.

Objectifs

I/ Objectifs de l'étude 1

L'étude de Louis *et al.* a montré, en 2006, que les patients opérationnellement tolérants présentaient un nombre de lymphocytes B plus important que les patients stables ou en rejet chronique (Louis, *et al.* 2006). Par ailleurs, l'idée émerge de plus en plus que les lymphocytes B sont impliqués dans la tolérance aux allogreffes (Deng, *et al.* 2007). Nous avons ainsi étudié le rôle potentiel des lymphocytes B dans la tolérance opérationnelle. L'analyse des données de puces à ADN de l'étude de Brouard *et al.* a été réalisée sans *a priori*, dans l'objectif d'identifier des gènes différentiels entre patients opérationnellement tolérants et patients en rejet chronique, et d'identifier une signature minimale associée à la tolérance, mais d'autres méthodes d'analyse auraient pu être choisies (Brouard *et al.* 2007). Dans l'étude de Pallier *et al.* à laquelle j'ai participé, nous avons analysé de nouveau ces données de puces à ADN en recherchant si des signatures de gènes associés aux fonctions des lymphocytes B étaient corrélées au phénotype de la tolérance en utilisant le logiciel *Gene Set Enrichment Analysis* (Pallier, *et al.* 2010). De plus, les analyses de cytométrie et en parallèle de PCR quantitative du niveau d'expression de transcrits de certains gènes, notamment des molécules BANK1, CD32a, CD32b dans les lymphocytes B totaux montrent un profil inhibé et/ou inhibiteur de ces cellules et une expression plus forte de facteurs de survie des lymphocytes B dont BAFF et son récepteur BAFFR. Ces résultats pourraient expliquer le plus grand nombre de lymphocytes B dans le sang des patients opérationnellement tolérants et la signature retrouvée dans les puces à ADN. Par ailleurs, ces lymphocytes B totaux répondent de façon normale à une stimulation polyclonale *in vitro*, notamment, la production d'IL-6 et d'IL-10 est comparable dans les différents groupes analysés, et les taux d'auto-anticorps présents dans le sérum analysés par puces à protéines, sont aussi comparables dans les différents groupes de patients. Une caractérisation phénotypique des lymphocytes B périphériques a aussi été réalisée, mettant en évidence une augmentation du nombre en valeur absolue de cellules B naïves, transitionnelles et mémoires chez ces patients. Une augmentation des cellules CD19⁺CD1d⁺ et des cellules CD19⁺CD5⁺ a aussi été mise en évidence ce qui est à rapprocher du potentiel régulateur des cellules CD19⁺CD1d⁺CD5⁺ montré chez l'Homme (Iwata, *et al.* 2010). Finalement, ces données montrent un phénotype B particulier qui pourrait participer à la maintenance de la tolérance opérationnelle chez ces patients transplantés rénaux.

II/ Objectifs de l'étude 2

Les analyses transcriptionnelles réalisées à partir du sang ont permis de mettre en évidence des signatures associées à la tolérance opérationnelle. Ainsi, l'étude de Brouard *et al.* met en évidence une augmentation des gènes associés à des fonctions régulatrices et une diminution des gènes associés à des fonctions effectrices en corrélation avec une inversion de la balance Treg/T effecteur rapportée (Louis, *et al.* 2006; Brouard, *et al.* 2007; Baeten, *et al.* 2006). Par ailleurs, l'étude de Pallier *et al.*, ainsi que d'autres, mettent en évidence des signatures de gènes associés aux lymphocytes B (Newell, *et al.* 2010; Sagoo, *et al.* 2010; Pallier, *et al.* 2010; Lozano, *et al.* 2011). Puisque les miARN peuvent contrôler l'expression de centaines de gènes, nous avons réalisé une analyse de l'expression des miARN dans le sang de patients opérationnellement tolérants. La comparaison avec le profil d'expression des miARN dans le sang de patients présentant une fonction stable de leur greffon, nous a permis de mettre en évidence 8 miARN différentiellement exprimés chez les patients opérationnellement tolérants. Parmi ceux-ci, nous nous sommes intéressés au miARN miR-142-3p, spécifique à la lignée hématopoïétique (Chen, C. Z., *et al.* 2004; Landgraf, *et al.* 2007; Merkerova, M., *et al.* 2008a), jouant des rôles dans le développement des lymphocytes B (Chen, C. Z., *et al.* 2004) et dans la fonction des lymphocytes T (Huang, B., *et al.* 2009). Nous avons confirmé la surexpression de ce miARN dans les PBMC de patients opérationnellement tolérants, puis plus particulièrement dans les lymphocytes B en comparaison à des patients stables. La surexpression de ce miARN dans une lignée lymphocytaires B nous a permis de mettre en évidence près de 1 000 gènes modulés, directement ou indirectement par ce miARN. Finalement, l'analyse des gènes potentiellement modulés par miR-142-3p et reliés à des fonctions immunes a permis d'identifier plusieurs réseaux de gènes dont l'un relié au TGF β 1, molécule déjà rapportée comme molécule centrale dans l'étude transcriptomique des patients opérationnellement tolérants, puisqu'elle est liée à 27% des 49 gènes de la signature de tolérance (Brouard, *et al.* 2007). Ces résultats suggèrent un rôle de miR-142-3p dans une boucle de rétrocontrôle négatif du TGF β 1 dans les lymphocytes B des patients opérationnellement tolérants.

III/ Objectifs de l'étude 3

L'absence de traitement efficace pour le RCHA et l'incapacité des marqueurs fonctionnels à identifier les patients à risque de développer un RCHA afin de moduler leur traitement le plus tôt possible démontrent le besoin urgent de biomarqueurs précoces du RCHA. Puisque plusieurs études ont mis en évidence des gènes associés au RCHA, notamment dans le sang, nous avons analysé l'expression de miARN dans les PBMC de patients atteints de RCHA. La comparaison du profil d'expression de 381 miARN dans le sang de 9 patients atteints de RCHA et de 10 patients stables nous a permis de mettre en évidence 10 miARN différentiellement exprimés entre ces deux groupes. Parmi ceux-ci, miR-142-5p a été décrit comme surexprimé dans les biopsies de patients en rejet aigu (Anglicheau, Dany, *et al.* 2009b) et aussi dans un modèle de fibrose rénale, où l'inflammation est présente (Zarjou, *et al.* 2011). Nous avons donc focalisé notre étude sur ce miARN qui est le miARN le plus exprimé parmi les miARN différentiels et décrit comme spécifique de la lignée hématopoïétique (Chen, C. Z., *et al.* 2004; Landgraf, *et al.* 2007; Merkerova, Michaela, *et al.* 2008b). La surexpression de ce miARN a été confirmée dans les PBMC d'un groupe de validation comprenant 10 patients stables et 10 patients en RCHA. Par ailleurs, afin de définir si la surexpression de ce miARN dans les PBMC était spécifique du RCHA, nous avons mesuré son expression dans les PBMC de patients présentant des situations cliniques différentes. Ainsi, miR-142-5p n'est pas surexprimé dans les PBMC d'un groupe de 10 patients non transplantés en insuffisance rénale terminale pour causes non immunologiques, ni dans les PBMC de 11 patients présentant des lésions de rejet aigu cellulaire en comparaison des 10 patients stables de validation, suggérant ainsi que miR-142-5p est spécifique du RCHA. Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'un poster au congrès américain de transplantation de 2011 (ATC 2011, Philadelphie) et l'article issu de ce travail est en cours d'écriture.

Résultats

I/ Résultats de l'étude 1

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, Souillou JP*, Brouard S*.

Kidney International. 2010 Sep;78(5):503-13.

see commentary on page 435

Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype

Annaick Pallier^{1,12}, Sophie Hillion^{2,3,4,12}, Richard Danger^{1,12}, Magali Giral^{1,5}, Maud Racapé¹, Nicolas Degauque¹, Emilie Dugast¹, Joanna Ashton-Chess¹, Ségolène Pettré¹, Juan José Lozano⁶, Régis Bataille^{7,8}, Anne Devys⁹, Anne Cesbron-Gautier⁹, Cécile Braudeau^{1,5}, Catherine Larrose^{10,11}, Jean-Paul Souillou^{1,5,10,12} and Sophie Brouard^{1,12}

¹Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale INSERM U643, and Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation ITERT, Nantes, France; ²Université Européenne de Bretagne, France; ³Université de Brest, EA 2216 Immunology and Pathology, IFR 148 ScInBioS, Brest, France; ⁴CHU Brest Hôpital Morvan, Brest, France; ⁵Centre Hospitalier Universitaire Hôtel Dieu Nantes, Nantes, France; ⁶Plataforma de Bioinformatica, Centro de Investigación Biomédica en red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Hospital Clinic, Mallorca, Barcelona, Spain; ⁷INSERM UMR 892 – Institut de Biologie, 9, quai Moncoussu, Nantes, France; ⁸CLCC – Centre René Gauducheau, Bld Jacques Monod, Saint Herblain, France; ⁹Laboratoire HLA – EFS Pays de la Loire, 34 Bd Jean Monnet, Nantes, France; ¹⁰Faculté de médecine, Université de Nantes, Nantes, France and ¹¹Laboratoire de biochimie, Nantes, France

Several transplant patients maintain stable kidney graft function in the absence of immunosuppression. Here we compared the characteristics of their peripheral B cells to that of others who had stable graft function but were under pharmacologic immunosuppression, to patients with chronic rejection and to healthy volunteers. In drug-free long-term graft function (DF) there was a significant increase in both absolute cell number and frequency of total B cells; particularly activated, memory and early memory B cells. These increased B-cell numbers were associated with a significantly enriched transcriptional B-cell profile. Costimulatory/migratory molecules (B7-2/CD80, CD40, and CD62L) were upregulated in B cells; particularly in memory CD19⁺ IgD⁻ CD38⁺ CD27⁺ B cells in these patients. Their purified B cells, however, responded normally to a polyclonal stimulation and did not have cytokine polarization. This phenotype was associated with the following specific characteristics which include an inhibitory signal (decreased FcγRIIA/FcγRIIB ratio); a preventive signal of hyperactive B-cell response (an increase in BANK1, which negatively modulates CD40-mediated AKT activation); an increased number of B cells expressing CD1d and CD5; an increased BAFF-R/BAFF ratio that could explain why these patients have more peripheral B cells; and a specific autoantibody profile. Thus, our findings show

that patients with DF have a particular blood B-cell phenotype that may contribute to the maintenance of long-term graft function.

Kidney International (2010) **78**, 503–513; doi:10.1038/ki.2010.162; published online 9 June 2010

KEYWORDS: B cells; cell surface molecules; human; tolerance; transplantation

Organ transplantation is the treatment of choice for life-sustaining terminal organ deficiencies. Nevertheless, prevention of rejection requires nonspecific immunosuppression, which increases the risk of complications such as infections,¹ malignancies, and side effects.² Moreover, immunosuppression poorly influences chronic rejection, the main cause of graft loss in the long term.³ Thus, a major goal in transplantation is to induce tolerance.

Tolerance to allografts was first described by Billingham *et al.*⁴ more than 50 years ago. The definition of this 'true' tolerance has been proposed as a well-functioning graft lacking histological lesions of rejection, in the absence of immunosuppression in an immunocompetent host accepting a second graft of the same donor, while able to reject a third-party graft. In humans, we reported on a state of long-term acceptance of mismatched kidney allografts after immunosuppressive drug withdrawal after kidney transplantation.⁵ Because several key elements of transplant tolerance in rodents cannot be demonstrated in humans, this state has been referred to as drug-free long-term graft function (DF). For example, graft biopsies are often unavailable, particularly given that this state of clinical tolerance has been observed by chance and not in the context of planned tolerance-inducing protocols and that these patients are usually in compliance and refuse invasive investigative procedures.⁵ The mechanisms of

Correspondence: Sophie Brouard, Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale INSERM U643, and Institut de Transplantation, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 01, France.
E-mail: Sophie.brouard@univ-nantes.fr

¹²These authors contributed equally to this work.

Received 24 November 2009; revised 18 March 2010; accepted 23 March 2010; published online 9 June 2010

this state of DF remain unknown. In particular, no significant alteration in their T-cell phenotype or function has been reported.^{6,7} In a previous paper, we showed that these patients were characterized by a higher number of peripheral B cells compared with both patients with stable graft function under immunosuppression and patients with histological signs of antibody-mediated chronic rejection.⁷ In this paper, we analyzed the peripheral B cells of these patients in terms of transcription and phenotype, as well as their capacity to respond to short *in vitro* activation.

As these patients may not display an 'optimal' response to alloantigens and rarely develop an alloimmune response,⁵ we hypothesized that regulation and/or control of this response may take place and that B cells could be involved in this process of tolerance. Although B cells are primarily known for their ability to differentiate into antibody-producing cells, they display additional functions by producing cytokines and functioning as antigen-presenting cells.⁸ Recent evidence indicates that regulatory B cells can enhance tolerance,⁹⁻¹² may control organ-specific inflammation driven by Th1, Th2, or Th17 cell responses, or may directly interact with other immune cells.^{10,13-15}

RESULTS

DF patients display high numbers of B cells and particularly Bm2, EBm5/Bm5 memory B cells

We used the Bm1-Bm5 classification system to identify B-cell developmental stages in the blood of the patients. Bm3/Bm4 were not included in the analysis because they were absent in the blood. We first confirmed that DF patients displayed a

significantly higher number (frequency, absolute value) of peripheral B cells (Figure 1a and b). This increase in circulating B cells was mainly due to a significant increase in IgD⁺CD38⁺ (corresponding to activated Bm2 cells) (Figure 1c) and IgD⁻CD38^{+/-} in absolute values (corresponding to EBm5/Bm5 memory B cells that also express the CD27 marker) (Figure 1d and e). No difference was observed for the frequencies of other B-cell sub-populations. Despite a small trend toward an increased number in DF patients, only very low numbers of Bm2' cells and transitional B cells were detected (limit of flow-cytometry sensitivity). Similarly, no statistically significant difference was found with respect to healthy volunteers (HV). Total B cells of DF patients displayed a significantly higher level of CD80 (*P*<0.05), CD86 (*P*<0.01), CD40 (*P*<0.05), and CD62L (*P*<0.05) compared with other transplant patients (Figure 2a-d). A significant difference toward HV was only found for CD80. We then analyzed the mean fluorescence intensity (MFI) of these markers within the gated CD19⁺IgD⁻CD38^{+/-} population. CD40 MFI was significantly increased in IgD⁻CD38^{+/-} memory populations from DF patients compared with the patients with stable graft function and HV (Figure 2e). Altogether, these data show that DF patients display a high number of circulating B cells expressing an activated-memory phenotype with expression of costimulatory molecules.

DF patients display a B cell-enriched gene profile

We analyzed data from our previous pangenomic microarrays¹⁶ according to the B-cell signatures described in the literature.

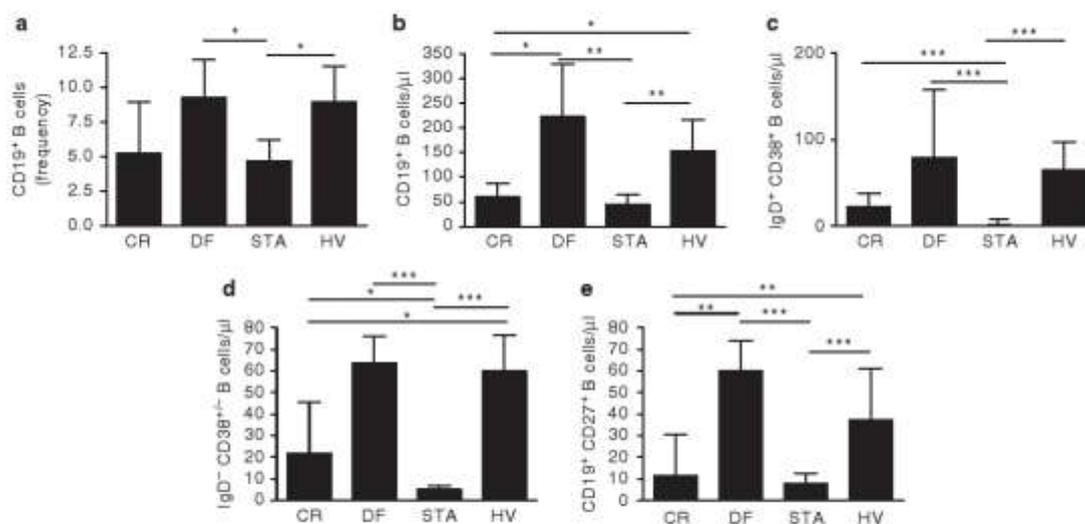


Figure 1 | Drug-free long-term graft function (DF) patients display a higher number of peripheral B cells. DF patients display a significantly higher frequency (a) and absolute value (b) of total peripheral B cells. The increase of B cells in DF patients is mainly due to a significant increase in IgD⁺CD38⁺ (activated Bm2 cells) (c) and IgD⁻CD38^{+/-} (EBm5/Bm5 memory B cells) (c). This was confirmed by an increase of the number of memory CD19⁺CD27⁺ B cells in DF patients (e). Differences were defined as statistically significant when *P*<0.05 (*), *P*<0.01 (**), and *P*<0.001 (***). CR, patients under standard immunosuppression with deteriorating kidney graft function; HV, healthy volunteers; STA, kidney recipients with stable graft function under standard immunosuppression.

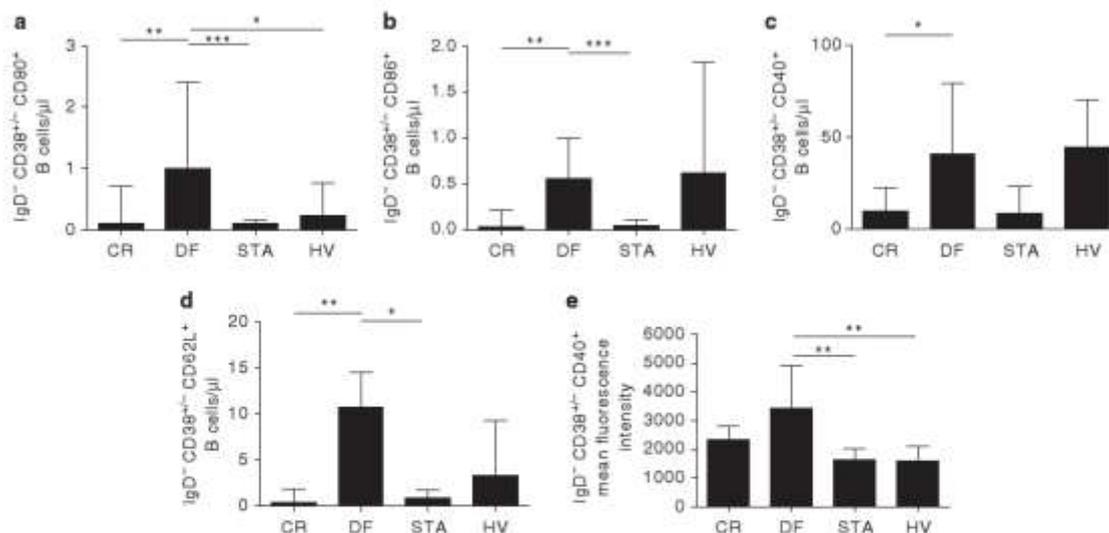


Figure 2 | DF patients display a higher number of memory B cells that express markers of costimulation. Drug-free long-term graft function (DF) patients display a significantly higher level of IgD⁻ CD38^{+/+} CD80⁺ memory B cells (a), IgD⁻ CD38^{+/+} CD86⁺ memory B cells (b), IgD⁻ CD38^{+/+} CD40⁺ memory B cells (c), and IgD⁻ CD38^{+/+} CD62L⁺ memory B cells (d). Moreover, IgD⁻ CD38^{+/+} memory B cells from DF patients exhibit a significant higher level of CD40 markers at their surface (mean fluorescence intensity) (e). Differences were defined as statistically significant when $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), and $P < 0.001$ (***)

Gene set enrichment analysis was used to identify enrichment of genes related to B-cell pathways.¹⁷ Among the genes significantly enriched (false discovery rate < 25%, $P < 5\%$) in DF patients compared with patients with stable graft function, seven major sets of genes were related to B-cell pathways (Table 1 and Supplementary Figures SA–G).^{18–21} Genes that contributed to the enrichment result were selected and their biological function analyzed using Gominer software.²² Altogether, DF patients are characterized by a significant regulation of several B-cell-associated subsets with upregulation of genes related to cell cycle (CCNA2, CCND2, BIRC5, CDC2, CDKN3, CKS2, PCNA), proliferation (CCNA2, CDC20, BUB1), development, and maturation. These findings largely reflect the ‘abnormal’ larger pool of B cells (due to proliferation and increased cell cycling) in DF patients.

B cells from DF patients display an inhibitory profile

We analyzed transcript level and/or surface expression of molecules reported to be involved in inhibitory/regulatory B-cell profiles. CD32 is a complex cluster of the low-affinity FcγReceptor (FcγR). Although FcγRIIA (CD32a) transduces an activator signal, FcγRIIB (CD32b) contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif, transducing an inhibitory signal upon co-ligation with the B-cell receptor. Because the CD32a/CD32b ratio is a relevant index of B-cell activation/inhibition, we analyzed this in the blood of our patients. We found that DF patients had a significantly decreased CD32a/CD32b ratio compared with patients with chronic rejection ($P < 0.05$) in total blood, and a trend for a decreased CD32a/CD32b ratio was also observed at the level

of CD19⁺ B cells (reported to the CD19 gene) (Figure 3a and b). Moreover, the significant increased CD32b mRNA in total peripheral blood mononuclear cells fits with a trend to higher expression (at the protein level by flow cytometry both in absolute value and in MFI) of CD32b in DF patients (Figure 3c–e).

Because the B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1 (BANK1) was highlighted as a leader gene in our previous study,²³ we looked at its expression in blood from our patients. BANK1 is a negative modulator of CD40-mediated AKT activation preventing hyperactive B-cell responses.²⁴ We found a significant accumulation of BANK1 transcripts in the blood of DF patients compared with stable patients ($P < 0.01$) and other controls ($P < 0.01$, $P < 0.05$) (Figure 4a). The same tendency was observed when the BANK1 molecule was analyzed in purified CD19⁺ B cells, suggesting that this increased expression was not only due to a higher number of B cells but a higher expression of BANK1 in B cells from DF patients (Figure 4b). Finally, we looked at the surface expression of CD1d and CD5 among CD19⁺ cells, two molecules potentially involved in a regulatory phenotype.^{9,11} DF patients had a significantly higher number of B cells expressing CD5 and CD1d compared with stable patients ($P < 0.05$), both in frequency and absolute values (Figure 4c and d).

Altogether, these data suggest that the B cells of DF patients display an inhibitory profile.

DF patients are characterized by a transcriptional profile favouring B-cell survival

Because of the increased B-cell number in DF patients, we looked at key molecules involved in B-cell survival:

Table 1 | Description of gene sets (GS) related to B-cell pathways identified by gene set enrichment analysis in the blood of patients with drug-free long-term graft function compared with patients with stable function under immunosuppression

Gene set name	Number of genes	NES	NOM P-val	FDR q-val	Gene set description	References
BASSO_REGULATORY_HUBS	61	1.80	0.006	0.21	Genes highly interconnected in the reconstructed regulatory networks from expression profiles in human B cells.	Basso et al. ¹⁸
HOFFMANN_BIVSBII_BI_TABLE2	100	1.73	0.005	0.19	Genes with at least fivefold change in expression between pre-BI and large pre-BII cells.	Hoffmann et al. ¹⁹
TARTE_PLASMA_BLAISTIC	160	1.71	0.014	0.20	Genes overexpressed in mature plasma cells isolated from tonsils and mature plasma cells isolated from bone marrow as compared with polyclonal plasmablastic cells.	Tarte et al. ²¹
ZHAN_MM_CD138_PR_V5_REST	22	1.70	0.014	0.21	50 top ranked overexpressed genes in each of the seven subgroups of multiple myeloma in CD138-enriched plasma cells from 414 newly diagnosed patients.	Zhan F et al., Blood 2006
GREENBAUM_E2A_UP	15	1.54	0.014	0.24	Genes upregulated at least threefold in the E2A-deficient cell lines.	Greenbaum et al. ²⁰
HOFFMANN_BIVSBII_LGBII	60	1.53	0.013	0.24	Genes with at least fivefold change in expression between large and small pre-BII cells.	Hoffmann et al. ¹⁹
TARTE_PC	38	1.59	0.015	0.25	Genes overexpressed in polyclonal plasmablastic cells, mature plasma cells isolated from tonsils and mature plasma cells isolated from bone marrow as compared with B cells purified from peripheral blood and tonsils.	Tarte et al. ²¹

The size is the number of genes in the gene set after filtering out those genes not in the expression data set. The normalized enrichment score (NES) is the degree to which a gene set is overrepresented, normalized across analyzed gene sets. The nominal P-value (NOM P-val) is the statistical significance of the enrichment score. The false discovery rate (FDR) is the estimated probability that the normalized enrichment score represents a false-positive finding.

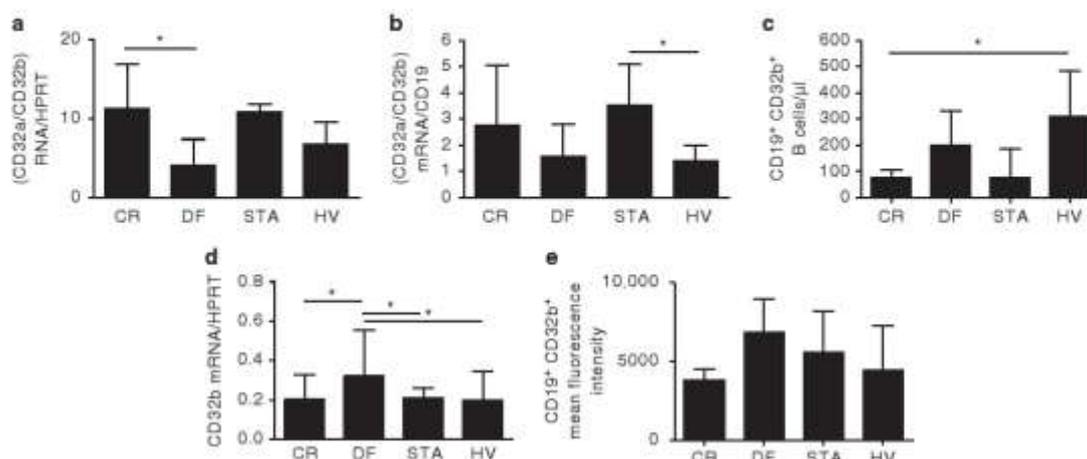


Figure 3 | DF patients display B cells with an inhibitory profile. (a) Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from drug-free long-term graft function (DF) patients display a significantly decreased CD32a/CD32b FcγRIIA/FcγRIIB transcript ratio both at the level of total PBMC (a) and at the level of CD19⁺ B cells (b) compared with patients with chronic rejection and healthy volunteers, respectively. Among total PBMC, DF patients express higher number of CD19⁺ FcγRIIB⁺ (CD32b) B cells as shown by flow cytometry (c) and a significant increase in FcγRIIB (CD32b) mRNA expression (d). Finally, B cells from DF patients tend to express more FcγRIIB (CD32b) at their surface (mean fluorescence intensity) (e). Differences were defined as statistically significant when $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), and $P < 0.001$ (***).

transmembrane activator and CAML interactor (TACI), B-cell-activating factor receptor (BAFF-R), and B-cell maturation protein (BCMA). Although BCMA and BAFF-R are involved in B-cell survival, TACI is a negative regulator of B-cell survival.^{25,26} BAFF-BAFF-R interactions were shown to be crucial for maintaining normal peripheral B-cell numbers²⁷ and instrumental for survival of memory B cells.^{28,29} We found that DF patients displayed an increased BAFF-R/BAFF ratio compared with patients with stable graft function ($P < 0.01$), healthy individuals ($P < 0.05$), and patients with chronic rejection ($P < 0.05$) that was correlated to a

significant upregulation of the TACI/BAFF signaling pathway ($P < 0.05$) (Figure 4e and f).

Together, these data suggest that DF patients are characterized by a transcriptional profile favouring B-cell survival that may contribute to their high B-cell number and transcriptional profile.

B cells from DF patients respond normally to *in vitro* polyclonal activation

B cells from three DF patients, five patients with stable graft function under immunosuppression, five HV and five

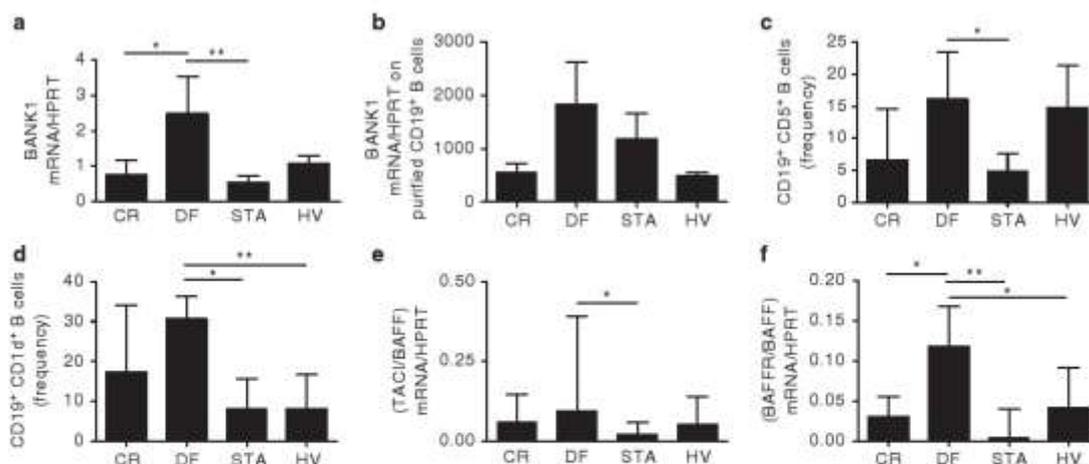


Figure 4 | DF patients display B cells with an inhibitory profile and profile of B cell survival. (a) Blood from drug-free long-term graft function (DF) patients is characterized by a significant accumulation of BANK1 transcripts, a negative modulator of CD40-mediated AKT activation, thereby preventing hyperactive B-cell responses. (b) The same tendency is observed in purified CD19⁺ B cells. (c) DF patients display a significantly higher number of B cells expressing the CD5 (c) and CD1d markers (d). DF patients are characterized by an upregulation of the BAFF-R/BAFF ratio (e) and an upregulation of the TACI/BAFF signaling pathways (f). Differences were defined as statistically significant when $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), and $P < 0.001$ (***).

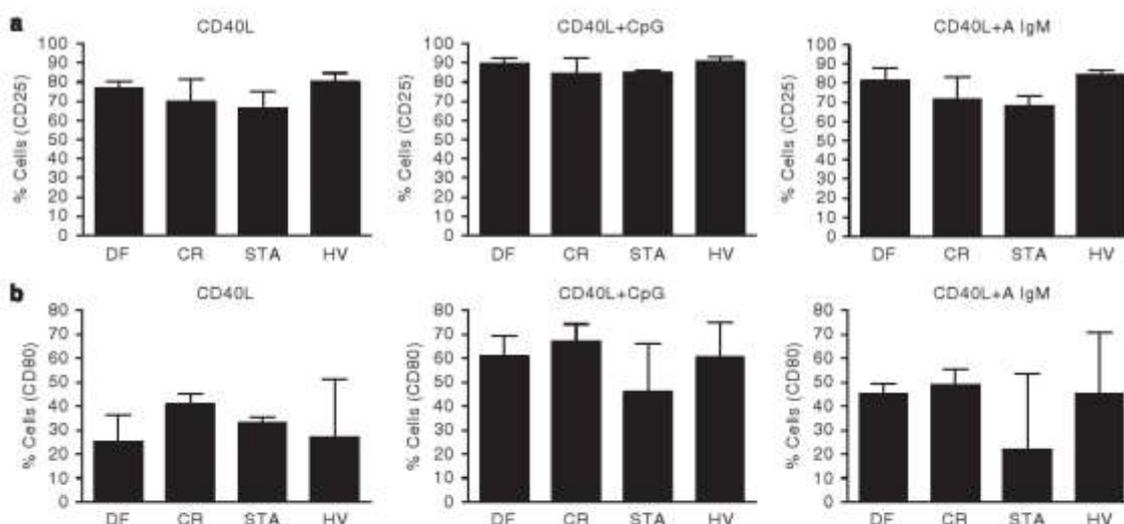


Figure 5 | B cell activation. Cultured blood B cells were incubated with anti-CD25 (a) or anti-CD80 (b) to assess B-cell activation after 40 h culture with CD40L alone, CD40L and CpG or CD40L and antihuman immunoglobulin M (IgM).

patients with chronic rejection were isolated and activated using different stimuli (CD40 ligand, CD40 ligand + anti-IgM, CD40 ligand + CpG) over 4 time points (0, 16, 24, 40 h, following stimulation). CD25 and CD80 expression was analyzed (MFI and frequency) to control B-cell activation (Figure 5). We analyzed by Luminex xMAP technology the level of interleukin (IL)10, transforming growth factor β , IL4, IL6, tumor necrosis factor α , IL2R, interferon γ , and IL6R in the supernatants of B-cell cultures 40 h after activation.

Before and after activation, only low levels of IL4, transforming growth factor β , IL6R, IL2R, and interferon γ were detectable in supernatants from all groups of patients. After 40 h of activation and independently of the stimuli, no difference was observed for IL10, IL6, and tumor necrosis factor α levels for the different groups of patients (Figure 6). Altogether, no absence of response or cytokine polarization was observed in the conditions of stimulation used in DF patients compared with HV and other recipients.

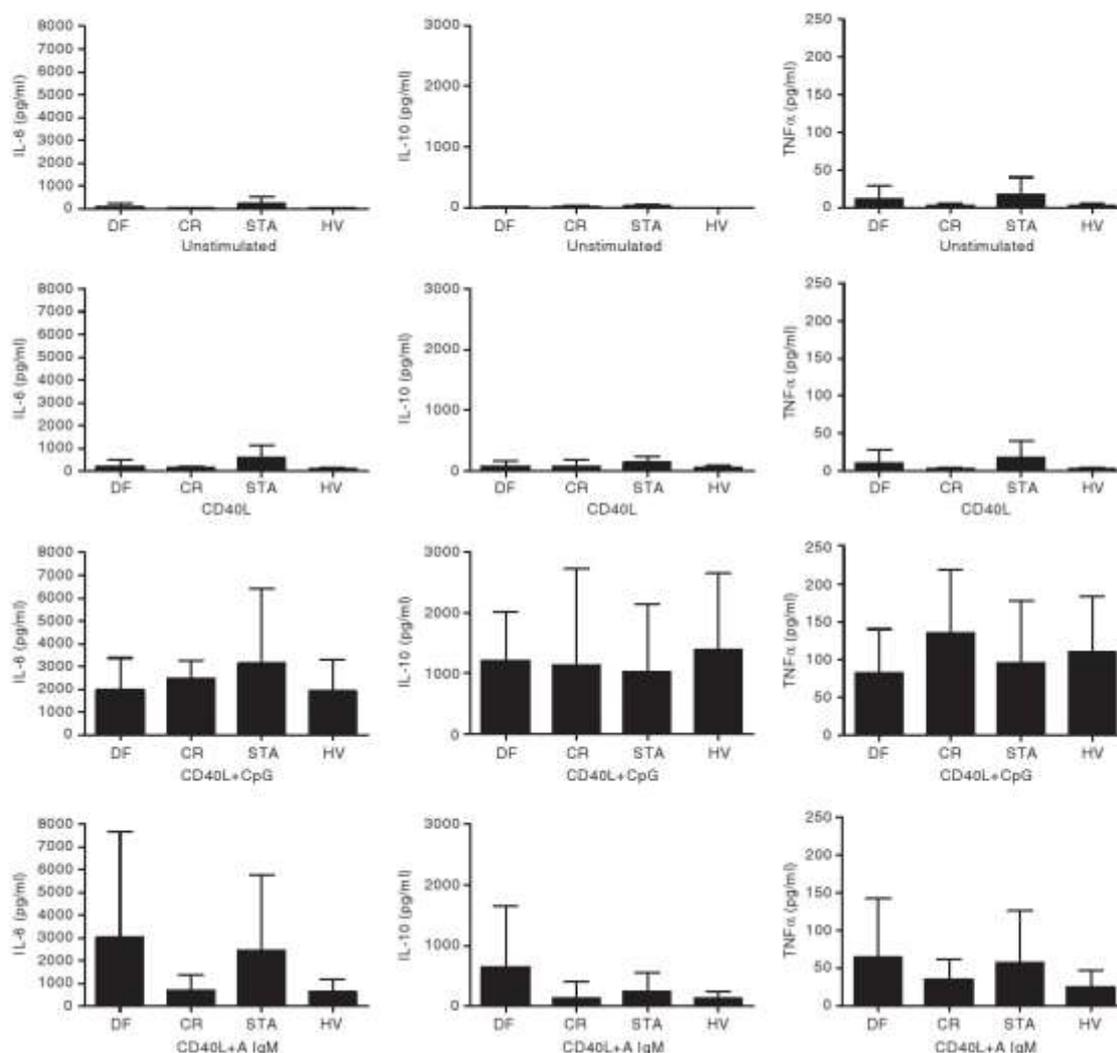


Figure 6 B cells from three drug-free long-term graft function (DF) patients, five patients with stable graft function, five healthy volunteers and five patients with chronic rejection were purified from peripheral blood mononuclear cells by negative selection. B cells were either unstimulated or stimulated with CD40L alone, CD40L and CpG or CD40L and anti-human immunoglobulin M (IgM). Supernatants were collected at different time points (0, 16, 24, and 40 h after stimulation). Aliquots of the supernatant were analyzed for different cytokines (data are presented for interleukin (IL)-6, IL-10, and tumor necrosis factor (TNF)- α), by Luminex xMAP technology. Results were shown after 40 h of activation.

Development of allo- and autoantibodies in DF patients

We studied anti-donor antibodies by applying the Luminex Single antigen technique to sera from DF patients (Labscreen Single Antigen; One lambda, Canoga Park, CA, USA). Out of the 12 DF patients (mismatched cadaveric graft), 10 displayed no anti-human leukocyte antigen antibodies and 2 displayed anti-donor antibodies (DQ7 and A33/DQ8). The MFI were 21,800 for DQ7, and 9200 and 193,00 for A33 and DQ8, respectively (Table 2, Supplementary Table SD). It has been suggested that patients submitted to a tolerance induction protocol develop a substantial autoimmune

response.³⁰ We investigated whether DF patients also exhibited an autoimmune component using protein microarrays. Although each individuals exhibit high numbers of potential autoantibodies (mean = 3921, s.e.m. = 320, at a threshold of 500 relative fluorescence units (RFU)), the number of total autoantibodies measured for the four groups of individuals was not statistically different, whatever the threshold used (Supplementary Figure SH). Similarly, when the autoantibody signal for HV was subtracted to analyze only autoantibodies due to transplantation, the number of autoantibodies in each group remained not significantly

Table 2 | Summary of clinical data: patients with drug-free long-term graft function (DF), kidney recipients with stable graft function under standard immunosuppression (STA), patients under standard immunosuppression with deteriorating kidney graft function (CR) and healthy volunteers (HV)

Groups	Age (years)	Gender (female/all)	Time between graft and analysis (months)	Creatinemia (μmol/l)	Proteinuria (g/24 h)	Donor (living vs deceased)	Number of HLA mismatches	Time between immunosuppression withdrawal and analysis (years)	Donor specific Abs
DF									
Mean	52	3/12	177	100	0.12	1/12	3	8	2/12
s.d.	18		97	36	0.20		2	8	
Min	27	3	59	35	0.00	1	0	3	2
Max	82	9	368	142	0.59	11	4	27	10
CR									
Mean	54	17/31	102	256	3	1/31	3		
s.d.	14		69	99	3		2		
Min	27	14	20	84	0	1	0		
Max	78	17	304	492	12	30	6		
STA									
Mean	49	12/34	123	121	0	3/34	3		
s.d.	14		67	34	0		1		
Min	24	12	29	68	0	3	0		
Max	76	22	269	215	1	30	6		
HV									
Mean	44	13/29							
s.d.	11								
Min	25	13							
Max	66	16							

Abbreviations: Abs, antibodies; HLA, human leukocyte antigen.

different (Supplementary Figure S1). Because the spectrum of specificity of these autoantibodies could vary in each group and individual, M-statistics were performed using the Protoarrays manufacturer's software to identify differentially expressed autoantibodies in DF patients. Among the 98 targets with a P-value inferior to 0.01, 51 targets (48 unique proteins) exhibited a higher prevalence in the DF group and 47 targets (44 unique proteins) in other groups (Supplementary Tables SA and SB). For both lists, no unique pathway or biological process was highlighted, whereas ontologies such as phosphorylation (GO: 0016310) and signal transduction (GO:0007165) were enriched for targets with lower prevalence in the DF group (false discovery rate <0.01) using Gominer software. Furthermore, among the 92 proteins, 36 are known to be expressed by the kidney.³¹ Focusing on particular proteins, autoantibodies against proteins known to be expressed in B cells were identified: CHEK1, PIM2, LCK, ZAP70, IKBKB, PDGFRA, PSMA4, and LPXN (Supplementary Figure S1).

DISCUSSION

We previously reported that DF patients are characterized by a high number of peripheral B cells.⁷ This observation was confirmed by two international networks (M. Hernandez-Fuentes and KA Newell, Am Transplant Congress, Boston, 2009) in kidney recipients, whereas no increase was observed in drug-free patients after a liver transplantation.³² This increased number of B cells was supported by an enriched

B-cell transcriptional profile not only compared with patients with chronic rejection, as confirmed by others (M. Hernandez-Fuentes and KA Newell, Am Transplant Congress, Boston, 2009) but also compared with stable patients under immunosuppression.

These observations led us to perform a detailed analysis of the B-cell compartment in DF patients, compared with stable patients under immunosuppression. Ever since the first cases of operational tolerance in the clinic were described, the problem of adequate comparators has remained unsolved. This paradox is due to the clinical situation of these patients that display stable graft function but no longer receive immunosuppression, a state that, until now, was only achievable in rodents. HV share with DF patients the absence of immunosuppression but have not received a transplant. Patients with chronic rejection have a transplant but are under immunosuppression and likely display a contrasted inflammatory response. Stable patients who share graft function stability with DF patients are probably the best controls but are under immunosuppression. Finally, it may be useful to compare the profile of DF patients with chronic rejection because no biopsy was available for DF patients in whom a 'minimal' form of subclinical chronic rejection cannot be excluded.

We report that DF patients are characterized by a significant increase in absolute value (not in frequency) of memory B cells that express costimulatory/migratory molecules, compatible with an inhibitory/regulatory B-cell profile.

These changes were significant not only compared with stable patients under immunosuppression but also patients with histologically proven signs of chronic rejection, a cohort of patients where enhanced B-cell activity was expected. These observations led us to hypothesize that B cells could contribute to the maintenance of long-term graft function.

The imbalanced and decreased CD32a/CD32b ratio in DF patients suggests that some mechanisms of regulation by the low-affinity type IIb immunoglobulin G (IgG) Fc-binding (CD32b)^{33–37} overcome activation mediated by CD32a.

Interestingly, DF patients also exhibited an upregulation of the peripheral BAFF-R/BAFF ratio that is crucial for the maturation of B cells and for maintaining peripheral B-cell numbers.^{28,29,38,39} In support of these data, we report that genes related to B-cell cycle were also overexpressed in DF patients. Finally, TACI/BAFF ratio was also increased in these patients suggesting that B cells remain under the control of TACI, a negative regulator of mature B cells⁴⁰ and that these observations do not reflect a general deregulation of B-cell factors. We previously reported that BANK1 was one of the key leader genes upregulated in DF patients.²³ BANK1 is an adaptor protein highly expressed in peripheral B cells⁴¹ that is a modulator of hyperactive B-cell responses by inhibiting AKT activation upon CD40 signaling.²⁴ DF patients, both at the peripheral blood mononuclear cells and B-cell level, displayed a higher level of BANK1 transcripts than HV suggesting that, again, this profile is not linked to the absence of treatment. DF patients also displayed B cells expressing the CD1d and CD5 molecules. Recently, a CD1d^h CD5⁺ B-cell subset producing IL10 has been identified as a unique subset of potent regulatory B cells in mouse⁴² and in human.⁴³ CD1d is also important for the generation of an optimal Th2 T-cell response⁴⁴ that promotes a favorable context for tolerance.⁴⁵ Nevertheless, B cells from DF patients only produced low levels of IL10 after 40 h activation and no difference was observed between the groups of patients and HV in terms of IL4, IL6R, IL2R, tumor necrosis factor α , transforming growth factor β , and interferon γ production. These data show that B cells from DF patients are not hyporesponsive to polyclonal activation and display a similar pattern of activation as the other patients after short *in vitro* activation.

Finally, we looked at the development of allo- and auto-antibodies in DF patients. To date, 11 of these 12 patients still display stable graft function and are immune-competent decades after transplantation.⁴⁶ Two displayed antibodies reacting with donor major histocompatibility complex (DQ7 and A33/DQ8). One patient still has a stable function 6 years after antibody appearance. The second rejected his graft 4 years after interruption of immunosuppression (12 years after transplantation) and 2 years after appearance of antibodies. A biopsy for the latter patient revealed lesions of transplant glomerulopathy without C4d staining. Finally, we investigated whether DF patients also exhibited an autoimmune component as previously described in induced 'tolerant' patients.⁴⁰ Consistent with previous knowledge, we

found that all individuals, even HV, exhibit antibodies directed against a wide spectrum of antigens, such as internal, cell surface, circulating proteins, carbohydrates, nucleic acids, lipids, and haptens.⁴⁷ We also found that DF patients were not characterized by a different level of circulating autoantibodies but could have different specific autoantibodies. Indeed, while Li *et al.*³¹ demonstrated an enrichment of kidney-specific autoantibodies produced after renal transplantation, there was the same proportion of produced autoantibodies between the different groups of recipients. Interestingly, we identified 98 autoantibody targets with significantly higher or lower prevalence in DF patients compared with the others. However, no clear pathway was identified arguing that autoantibody production could not belong to a mainstream biological process. Focusing on particular proteins, autoantibodies against proteins expressed in B cells were identified such as CHEK1, PIM2, LCK, ZAP70, IKBKB, PDGFRA, and LPXN. Thus, CHEK1 autoantibody exhibited a higher prevalence in the DF group and its gene was found to be overexpressed in our previous study.¹⁶ Furthermore, Porcheray *et al.*³⁰ found that PSMA4 autoantibody was highly expressed in one tolerant patient and we also found that PSMA4 autoantibody was highly expressed in one DF patient and expressed less in all other patients. Finally, we found that Leupaxin, a member of the paxillin superfamily, was one of the autoantibodies largely increased in DF patients. This molecule, which is preferentially expressed in hematopoietic cells including B cells, has been shown to suppress the secretion of IL2, likely by the inhibition of JNK, p38 MAPK, and AKT signaling. This molecule thus has an inhibitory role in BCR signaling and B-cell function.⁴⁸

Overall, our study points to several characteristics in B cells from DF patients. Further studies are required to explore if B cells are indeed involved in long-term graft acceptance decades after withdrawal of immunosuppression.

MATERIALS AND METHODS

Patients

The study was approved by the University Hospital Ethical Committee and the Committee for the Protection of Patients from Biological Risks. All 106 age-matched kidney transplant patients included for study gave informed consent (Table 2 and Supplementary Tables SC and SD).

(i) *Patients with DF (n = 12)*: patients with a stable kidney graft function (creatinemia <150 μ mol/l and proteinuria <1 g/24 h) in the absence of immunosuppression for at least 1 year (range: 3–21 years).¹⁶ Treatment was stopped due to non-compliance (n = 9), post-transplant lymphoproliferative disorder (n = 2), or calcineurin inhibitor toxicity (n = 1). (ii) *Kidney recipients with stable graft function under standard immunosuppression (STA; n = 34)*: had a creatinemia <150 μ mol/l and proteinuria <1 g/24 h for at least 3 years. (iii) *Patients under standard immunosuppression with deteriorating kidney graft function (CR; n = 31)*: with a creatinemia >150 μ mol/l and/or proteinuria >1 g/24 h, classified according to the Banff classification criteria.^{49,50} Five out of the 31 patients had a transplant glomerulopathy, 18/31 were suspicious for humoral rejection (C4d or circulating anti-human leukocyte antigen

antibodies), 8/31 had an active humoral component (C4d and circulating anti-donor antibodies). (iv) HV ($n = 29$): age-matched healthy volunteers (mean age: 44 ± 11 years; range 25–66; sex 16M/13F) had a normal blood formula and no infectious or other concomitant pathology for at least 6 months before the study.

Biological samples

Venous blood samples were collected in EDTA vacutainers. Peripheral blood mononuclear cells were separated on a Ficoll layer (Eurobio, Les Ulis, France) and frozen in TRIzol reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

RNA cDNA and real-time quantitative PCR

RNA was extracted using the TRIzol method (Invitrogen), according to manufacturer's instructions. Genomic DNA was removed by DNase treatment (Roche, Indianapolis, IN, USA). RNA quality and quantity was determined using an Agilent 2100 BioAnalyzer (Palo Alto, CA, USA). RNA was reverse transcribed using polydT oligonucleotide and Maloney leukemia virus reverse transcription (Invitrogen). Real-time quantitative PCR was performed using commercially available primer and probe sets HPRT: Hs99999909_m1, CD32a: Hs00234969_m1, CD32b: Hs00269610_m1, BANK1: Hs00215678_m1, BAFF-R: Hs00606874_g1, BAFF: Hs00198106_m1, APRIL: Hs00742713_s1, TACE: Hs00963364_m1, BCMA: Hs03045080_m1, CD19: Hs00174333_m1 from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). HPRT and CD19 were used as endogenous controls to normalize RNA amounts. Relative expression between a sample and a reference was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method.³¹

Flow cytometry

The mature Bm cell sub-populations were studied according to their expression of CD38, IgD, and CD27.^{52,53} Flow cytometry was performed on a BD LSRII analyzer with FlowJo software (TriStar Inc., Ashland, OR, USA) using monoclonal antibodies: CD19 (IgG1/J4.119), CD38 (IgG1/HIT2), IgD (IgG2a/IA6), CD80 (IgG1/L307.4), CD86 (IgG1/IT2.2), CD27 (IgG1/M-T271), CD5 (IgG1/UCHT2), CD40 (IgG1/5C3), CD62L (IgG1/Dreg56), IgM (IgG1/G20-127), CD21 (IgG1/IV B98), CD138 (IgG1/BP100), CD1d (IgG1/M-T101) (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), CD32 (IgG2a/2E1) and CD20 (IgG1/B9E9) (Immunotech, Luminy, France).

Microarray data analysis

Raw gene-expression files¹⁶ are available at the Stanford Microarray Database http://smd.stanford.edu/cgi-bin/publication/view-Publication.pl?pub_no=654. Gene set enrichment analysis (<http://www.broad.mit.edu/gsea/>) was run on 4942 genes by using version 2.5 of the C2 gene set database and the 1252 gene sets comprising more than 10 and less than 500 genes were used. Default parameters and 10,000 random sample label permutations were used. Gene sets with a false discovery rate inferior to 25% and a nominal P -value inferior to 5% were selected. Gominer software²² was performed to investigate biological processes and functions and to group the genes into biologically coherent categories.

Detection of alloantibodies

Human leukocyte antigen antibodies were detected by a multiplex screening test (LAT-M; One lambda, Canoga Park, CA, USA). Donor-specific antibodies were detected by Luminex Single antigen (Labscreen Single Antigen).

Autoantibody immunoprofiling

Serum immunoprofiling was performed on ProtoArray human protein microarrays v4.0 by the ProtoArray Service team (Invitrogen). Each microarray contained approximately 8000 recombinant proteins spotted in duplicate. One ProtoArray was used per sample and a negative control assay (buffer with no serum) was run in parallel. Microarray slides were prepared according to the manufacturer's protocol. Arrays were scanned using an Axon GenePix 4000B fluorescent microarray scanner, and data extraction was performed using GenePix Pro 6.0 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Microarray quantile normalization, background subtraction, and average calculation of duplicates were performed using Invitrogen's proprietary Protoarray Prospector Software v5.2.1 and then the signal from the negative control array was subtracted from each slide. To compare the level of total autoantibody in each group, we compared the number of targets at multiple thresholds of RFU, according to the fact that the filtering procedure could induce a bias³¹ (Supplementary Figure 5H). To analyze autoantibodies due to transplantation, the mean signal of healthy volunteers was subtracted for each patient array (delta intensity signal). Potential autoantibodies were selected if the delta intensity signal was superior to given thresholds fixed at 0, 50, (ref. 30) 100, 500, (ref. 54) 1000 or 5000 RFU (Supplementary Figure 5I). To identify autoantibodies specific to DF patients, a statistical analysis was performed using Protoarray Prospector Software and M-statistics according to Babel *et al.*⁵⁵ To select reliable autoantibodies and following the manufacturer recommendations, additional thresholds were imposed requiring that signals be at least 500 RFU and a minimum signal difference of 200 RFU had to be observed between samples from DF patients and samples from the other groups.

B-cell activation

B cells were purified by negative selection using magnetic beads (Dynabeads; Invitrogen, Paisley, UK) in accordance with manufacturer's instructions. Purification was typically 97% CD19⁺. B cells were stimulated with CD40L (Alexis biochemical; Enzo Life Sciences Inc., Farmingdale, NY, USA), CD40L, and CpG ODN 2006 (Hycult biotechnology; Uden, The Netherlands) or CD40L and anti-human IgM (Jackson ImmunoResearch Lab, West Grove, PA, USA). B cells were incubated with conjugated antibodies (all from BD Pharmingen, San Diego, CA, USA): anti-CD19, anti-CD80, and anti-CD25. Supernatants were collected at 0, 16, 24, and 40 h following stimulation and analyzed for cytokines (IL-4, IL-6, IL-10, tumor necrosis factor α , interferon γ , IL-2R α , IL-6R, and transforming growth factor β 1) by Luminex xMAP technology (MILLIPLEX MAP; Millipore, Billerica, MA, USA), in accordance with manufacturer's protocol.

Statistical analysis

The non-parametric Kruskal-Wallis test with Dunn's post-test was used for comparison of more than two groups using GraphPad Prism software v.4. Differences were defined as statistically significant when $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), and $P < 0.001$ (***). Correlations were analyzed by linear regression and mean values were compared using the Mann-Whitney test or Wilcoxon's test for paired series. Categorical variables were compared by the χ^2 -test with the Yates correction when at least one of the calculated figures was < 5 .

DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank the patients and their families, whose trust, support, and cooperation were essential for the collection of the data used in this study. We thank F. J. Bemelman, Pr C. Legendre, H. Le Monies De Sagazan, Pr C. Noel, E. Pillebout, Pr J. F. Subra, and F. Villemain for their help in this study, and Y. Foucher for statistical advice. Ig classes were determined at the Hotel-Dieu Hospital (Immunochemistry, Biochemistry laboratory, Nantes) and the TENON hospital (Immunochemistry, Biochemistry laboratory, Paris). Cytokine analysis was performed by GenoToulAnexplo (Service Phenotypage, Plateforme Anexplo, Toulouse). Immunoprofiling using protein microarrays (ProtoArray human protein microarrays v4.0 (Invitrogen) was co-financed by TcLand Expression, Nantes, France. We thank A. Quoquillet for technical assistance and J. Ashton-Chess for editing the paper. This work was funded by the INSERM 643 Unit, the CENTAURE RTRS and the PROGREFFE foundation.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table SA. 51 targets of autoantibodies with higher prevalence in the DF group compared to the other groups identified with M-statistics with *P*-values inferior to 0.01.

Table SB. 47 targets of autoantibodies with lower prevalence in the DF group compared with the other groups identified with M-statistics with *P*-values inferior to 0.01.

Table SC. Description of the patient groups included for study: 31 patients under standard immunosuppression with deteriorating kidney graft function (CR) and 34 kidney recipients with stable graft function under standard immunosuppression (STA).

Table SD. Description of the patient groups included for study: 12 patients with drug-free long-term graft function (DF) and 29 healthy volunteers (HV).

Figure SA–5G. Heat maps of the seven sets of genes related to B cell pathways of 61, 100, 160, 22, 15, 60, and 38 genes identified with gene set enrichment analysis in the blood of patients with drug-free long-term graft function compared with patients with stable function under immunosuppression.

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

REFERENCES

- Souillou JP, Giral M. Controlling the incidence of infection and malignancy by modifying immunosuppression. *Transplantation* 2001; **72**: 589–593.
- Nankivell BJ, Borrows RJ, Fung CL et al. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity: longitudinal assessment by protocol histology. *Transplantation* 2004; **78**: 557–565.
- Pascual M, Theruvath T, Kawai T et al. Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation. *N Engl J Med* 2002; **346**: 580–590.
- Billingham RE, Brent L, Medawar PB. Activity acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 1953; **172**: 603–606.
- Roussey-Kesler G, Giral M, Moreau A et al. Clinical operational tolerance after kidney transplantation. *Am J Transplant* 2006; **6**: 736–746.
- Braudeau C, Racape M, Giral M et al. Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome. *Transpl Int* 2007; **20**: 845–855.
- Louis SBC, Giral M, Dupont A et al. Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance. *Transplantation* 2006; **81**: 398–407.
- Fuchs EJ, Matzinger P. B cells turn off virgin but not memory T cells. *Science* 1992; **258**: 1156–1159.
- Mizoguchi A, Mizoguchi E, Takedatsu H et al. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. *Immunity* 2002; **16**: 219–230.
- Mizoguchi A, Bhan AK. A case for regulatory B cells. *J Immunol* 2006; **176**: 705–710.
- Sun CM, Deriaud E, Leclerc C et al. Upon TLR9 signaling, CD5+ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs. *Immunity* 2005; **22**: 467–477.
- Wolf SD, Dittel BN, Hardardottir F et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J Exp Med* 1996; **184**: 2271–2278.
- Filatreau S, Gray D, Anderton SM. Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology. *Nat Rev Immunol* 2008; **8**: 391–397.
- Harris PR, Wright SW, Serrano C et al. Helicobacter pylori gastritis in children is associated with a regulatory T-cell response. *Gastroenterology* 2008; **134**: 491–499.
- Singh A, Carson WFT, Secor Jr ER et al. Regulatory role of B cells in a murine model of allergic airway disease. *J Immunol* 2008; **180**: 7318–7326.
- Brouard S, Mansfield E, Braud C et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**: 15448–15453.
- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 15545–15550.
- Basso K, Margolin AA, Stolovitzky G et al. Reverse engineering of regulatory networks in human B cells. *Nat Genet* 2005; **37**: 382–390.
- Hoffmann R, Seidl T, Neeb M et al. Changes in gene expression profiles in developing B cells of murine bone marrow. *Genome Res* 2002; **12**: 98–111.
- Greenbaum S, Lazorchak AS, Zhuang Y. Differential functions for the transcription factor E2A in positive and negative gene regulation in pre-B lymphocytes. *J Biol Chem* 2004; **279**: 45028–45035.
- Tarte K, Zhan F, De Vos J et al. Gene expression profiling of plasma cells and plasmablasts: toward a better understanding of the late stages of B-cell differentiation. *Blood* 2003; **102**: 592–600.
- Zeeberg BR, Feng W, Wang G et al. GoMiner: A Resource for Biological Interpretation of Genomic and Proteomic Data. *Genome Biology* 2003; **4**: R28.
- Sivozhlezov V, Braud C, Giacomelli L et al. Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplants recipients. II: Non-statistical gene microarray analysis. *J Cell Biochem* 2008; **103**: 1693–1706.
- Aiba Y, Yamazaki T, Okada T et al. BANK negatively regulates Akt activation and subsequent B cell responses. *Immunity* 2006; **24**: 259–268.
- Hauer J, Puschner S, Ramakrishnan P et al. TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 2874–2879.
- Sakurai D, Kanno Y, Hase H et al. TACI attenuates antibody production costimulated by BAFF-R and CD40. *Eur J Immunol* 2007; **37**: 110–118.
- Mackay F, Schneider P, Rennert P et al. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 2003; **21**: 231–264.
- Walters S, Webster KE, Sutherland A et al. Increased CD4+Foxp3+ T cells in BAFF-transgenic mice suppress T cell effector responses. *J Immunol* 2009; **182**: 793–801.
- Mariño E, Villanueva J, Walters S et al. CD4+ CD25+ T cells control autoimmunity in the absence of B cells. *Diabetes* 2009.
- Porcheray F, Wong W, Saidman SL et al. B-cell immunity in the context of T-cell tolerance after combined kidney and bone marrow transplantation in humans. *Am J Transplant* 2009; **9**: 2126–2135.
- Li L, Wadia P, Chen R et al. Identifying compartment-specific non-HLA targets after renal transplantation by integrating transcriptome and ‘antibodyome’ measures. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**: 4148–4153.
- Martinez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G et al. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* 2007; **7**: 309–319.
- Ravetch JV, Lanier LL. Immune inhibitory receptors. *Science* 2000; **290**: 84–89.
- Ono M, Bolland S, Tempst P et al. Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIb. *Nature* 1996; **383**: 263–266.
- Takai T, Ono M, Hikida M et al. Augmented humoral and anaphylactic responses in Fc gamma RIIb-deficient mice. *Nature* 1996; **379**: 346–349.
- McGaha TL, Sorrentino B, Ravetch JV. Restoration of tolerance in lupus by targeted inhibitory receptor expression. *Science* 2005; **307**: 590–593.
- Brownlie RJ, Lawlor KE, Niederer HA et al. Distinct cell-specific control of autoimmunity and infection by Fc gamma RIIb. *J Exp Med* 2008; **205**: 883–895.
- Stadanlick JE, Cancro MP. BAFF and the plasticity of peripheral B cell tolerance. *Curr Opin Immunol* 2008; **20**: 158–161.
- Brink R. Regulation of B cell self-tolerance by BAFF. *Semin Immunol* 2006; **18**: 276–283.
- Yan M, Wang H, Chan B et al. Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice. *Nat Immunol* 2001; **2**: 638–643.

41. Yokoyama K, Su IH, Tezuka T et al. BANK regulates BCR-induced calcium mobilization by promoting tyrosine phosphorylation of IP3 receptor. *EMBO J* 2002; **21**: 83-92.
42. Yanaba K, Bouaziz JD, Haas KM et al. A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses. *Immunity* 2008; **28**: 639-650.
43. Colgan SP, Hershberg RM, Furuta GT et al. Ligation of intestinal epithelial CD1d induces bioactive IL-10: critical role of the cytoplasmic tail in autocrine signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 13938-13943.
44. Faveeuw C, Angeli V, Fontaine J et al. Antigen presentation by CD1d contributes to the amplification of Th2 responses to *Schistosoma mansoni* glycoconjugates in mice. *J Immunol* 2002; **169**: 906-912.
45. Exley M, Garcia J, Wilson SB et al. CD1d structure and regulation on human thymocytes, peripheral blood T cells, B cells and monocytes. *Immunology* 2000; **100**: 37-47.
46. Ballet C R-KG, Aubin JT, Brouard S et al. Humoral and cellular responses to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft. *Am J Transplant* 2006; **6**: 2796-2801.
47. Avrameas S, Ternynck T. Natural autoantibodies: the other side of the immune system. *Res Immunol* 1995; **146**: 235-248.
48. Chew V, Kong-Peng L. Leupaxin negatively regulates B cell receptor signaling. *J Biol Chem* 2007; **282**: 27181-27191.
49. Racusen LC, Halloran PF, Solez K. Banff 2003 meeting report: new diagnostic insights and standards. *Am J Transplant* 2004; **4**: 1562-1566.
50. 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**: 518-526.
51. ABL PE Applied Biosystems, Method for Gene Expression Monitoring by Real-time PCR. In: *PRISM 7700 User Bulletin*. (vol 2), 1997 pp 11-24.
52. Youinou P, Hillion S, Jamin C et al. B lymphocytes on the front line of autoimmunity. *Autoimmun Rev* 2006; **5**: 215-221.
53. Lanzavecchia A, Bernasconi N, Traggial E et al. Understanding and making use of human memory B cells. *Immunol Rev* 2006; **211**: 303-309.
54. Sutherland SM, Li L, Sigdel TK et al. Protein microarrays identify antibodies to protein kinase Czeta that are associated with a greater risk of allograft loss in pediatric renal transplant recipients. *Kidney Int* 2009; **76**: 1277-1283.
55. Babel I, Barderas R, Diaz-Uriarte R et al. Identification of tumor-associated autoantigens for the diagnosis of colorectal cancer in serum using high density protein microarrays. *Mol Cell Proteomics* 2009; **8**: 2382-2395.

II/ Résultats de l'étude 2

miR-142-3p over-expression in the blood of drug-free kidney transplant recipients

Richard Danger, Annaïck Pallier, Magali Giral, Marc Martínez-Llordella, Juan José Lozano, Nicolas Degauque, Alberto Sanchez-Fueyo, Jean-Paul Soulillou, and Sophie Brouard

En révision

JASN

miR-142-3p over-expression in the blood of drug-free kidney transplant recipients

Journal:	<i>Journal of the American Society of Nephrology</i>
Manuscript ID:	JASN-2011-06-0543
Manuscript Type:	Original Article - Basic Research
Date Submitted by the Author:	07-Jun-2011
Complete List of Authors:	Danger, Richard; INSERM, INSERM U643 -ITUN Pallier, Annaick; INSERM, INSERM U643 -ITUN Giral, Magali Martínez-Llordella, Marc; Hospital Clinic Barcelona, Liver Unit - IDIBAPS -CIBEREHD Lozano, Juan Jose; Centro de Investigación Biomédica en red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD), Plataforma de Bioinformatica Degauque, Nicolas; INSERM, INSERM U643 -ITUN Sanchez-Fueyo, Alberto; Hospital Clinic Barcelona, Liver Unit - IDIBAPS -CIBEREHD SOULILLOU, Jean-Paul; INSERM, INSERM U643 -ITUN brouard, sophie
Keywords:	transplantation, tolerance, transcription regulation, lymphocytes

Title: miR-142-3p over-expression in the blood of drug-free kidney transplant recipients

Running title: miRNA in tolerant recipients

Richard Danger^{*†}, Annaïck Pallier^{*}, Magali Giral^{*‡}, Marc Martínez-Llordella[§], Juan José Lozano[§], Nicolas Degauque^{*}, Alberto Sanchez-Fueyo[§], Jean-Paul Souillou^{*†‡} and Sophie Brouard^{*‡}.

[†]Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM U643) and Institut de Transplantation Urologie, Néphrologie (ITUN), 30 Boulevard Jean Monnet, 44093 Nantes, France.

[†]Université de NANTES, 1 rue Gaston Veil, 44093 Nantes, France

[‡]Centre Hospitalier Universitaire Hôtel-Dieu, 1 Place Alexis Ricordeau, 44093 Nantes, France

[§]Liver Unit, Hospital Clinic Barcelona, IDIBAPS, CIBEREHD, Villarroel 170, 08036, Barcelona, Spain

JPS and SB contributed similarly as senior authors

Corresponding author: Sophie Brouard; sophie.brouard@univ-nantes.fr; INSERM UMR 643- 30 Bd Jean Monnet- 44093 Nantes Cedex 93- France; tel : 332 40 08 78 42; fax: 332 40 08 74 11.

Abbreviations: BANK1: human B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1 gene, FC: Fold Change, GO: Gene Ontology, HV: Healthy Volunteers, IS: immunosuppression, miRNA: microRNA, Op-Tol: drug-free Operationally Tolerant renal recipients, PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells, PCA: Principal Component Analysis, STA: Stable graft function under immunosuppressive regimen, TGF- β : Transforming Growth Factor Beta, TGFBR1: human TGF- β receptor 1 gene, TLDA: Taqman Low Density Array.

Abstract word count: 192 words.

Text word count: 2,908 words.

Abstract

The use of minimal doses of immunosuppression or achievement of drug-free tolerance is a major goal in organ transplantation, encouraged by cases of transplant patients surviving long-term without treatment. Although differential gene expression has been described in the peripheral blood of drug-free operationally tolerant kidney recipients (Op-Tol), no mechanism of peripheral regulation has been reported. We identified a list of 8 microRNA (miRNA) differentially expressed in PBMC from Op-Tol and patients with stable graft function under immunosuppression (STA). We focused on miR-142-3p whose over-expression was validated with individual qPCR assays. miR-142-3p expression was stable over-time and not modulated by immunosuppression. Its over-expression in the blood of Op-Tol was mainly due to its increased expression in B lymphocytes in these patients compared to STA. Its over-expression in stable Raji cells led to the modulation of nearly 1000 genes, suggesting an important role in B cells. Modulated genes were related to immune response of B cells, including molecules previously identified in the blood of Op-Tol and potential miR-142-3p targets. Finally, our results suggest that a negative feedback loop involving TGF- β signaling and miR-142-3p expression in B cells may contribute to the maintenance of tolerance.

Introduction

The use of minimal doses of immunosuppression (IS) or even achievement of drug-free tolerance is a major goal in organ transplantation^{1, 2}. Although the kidney is less susceptible to successful immunosuppressive drug withdrawal than the liver where around 20% of transplant patients can be successfully weaned off IS^{3, 4}, an increasing number of kidney transplant recipients who continue to display good graft function in the absence of immunosuppressive drugs have been described in the literature⁵⁻⁹. We and others have looked at the gene expression profile in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of such "operationally tolerant" (Op-Tol) kidney transplant recipients⁷⁻¹². The blood is a popular choice for analysis because it provides a non invasive means for potential biomarker discovery, which is important in the case of tolerance where biopsying patients can be considered challenging both ethically as well as in terms of patient compliance. In these different studies, several key pathways were highlighted such as a pathway implicating the transforming growth factor beta gene (TGF- β)¹⁰ and several other genes have been highlighted as "key leader genes" such as BANK-1 (B-cell scaffold protein with ankyrin repeats 1)¹¹, a modulator of B cell hyperactivation through AKT upon CD40 activation¹³. The implication of B-cell related genes correlated with a high number of B cells¹⁴ and to a gene signature enriched in B cell-related genes in the blood of operationally tolerant kidney recipients, which was subsequently confirmed in three different studies^{7, 8, 10, 12}. The role of B cells has also been reported in experimental rodent models where B cells from tolerant recipients were able to transfer prolonged graft survival when administered to naïve untreated recipients¹⁵.

The mechanisms involved in the maintenance of this phenomenon remain elusive and the identification of related biomarkers remains instrumental to achieving safe drug minimization or complete weaning in clinical practice.

miRNA are small, endogenous non-coding RNAs that can regulate the expression of a variety of genes by directly destabilizing their target messenger RNA (mRNA)^{16, 17}. Furthermore, the incomplete pattern of target recognition allows a single miRNA to target hundreds of mRNA, and conversely, a single mRNA to be targeted by multiple miRNA, thus impacting a broad range of gene networks¹⁸. Numerous studies have reported on the differential expression of miRNA in physiological disorders or diseases. Many miRNA have been shown to regulate immune function¹⁹ and miRNA

Journal of the American Society of NEPHROLOGY

can have different roles in immunity depending on the cell type in which they are expressed, the differentiation state of the cell and its external stimuli²⁰. Furthermore, miRNA have been found to be modulated in biopsies of kidney transplant recipients²¹⁻²³. In this study, we investigated whether miRNA are modulated in the blood of patients with operational tolerance compared to a cohort of patients with stable graft function under classical immunosuppression (STA).

For Peer Review

Results

miRNA profiling in PBMC from kidney transplant recipients: We first searched for a global miRNA profile in PBMC from kidney transplant recipients using miRNA TLDA. The expression of 381 miRNA was measured in PBMC from 9 Op-Tol and 10 STA recipients. 266 miRNA were expressed with a Cq inferior to 35 in at least half of the samples from each group. We identified 8 miRNA differentially expressed between the two groups of patients with a $p < 0.05$ (represented in the heatmap figure 1A and described in table figure 1B). Based on the expression of these 8 miRNA, the clear separation of the two groups of patients according to their clinical status was further validated using principal component analysis (supplementary figure S1). Among the 8 differentially expressed miRNA, four were significantly over-expressed (miR-450b-5p, miR142-3p, miR-876-3p and miR-106b) and four were under-expressed (miR508-3p, miR-148b, miR-324-5p and miR-98) in PBMC from Op-Tol compared to STA patients.

miRNA profiling in PBMC from healthy volunteers following polyclonal activation: To further analyze the basal expression and modulation of these 8 specific miRNA, we performed miRNA profiling in PBMC from healthy volunteers (HV) before and 24 hours after phytohemagglutinin A (PHA; 2ug/mL) and Interleukin 2 (IL-2; 10ng/mL) stimulation (supplementary figure S2). Among the 258 measured miRNA with a Cq below 35, 52 miRNA displayed a fold change (FC) > 2 and 59 miRNA a FC < 2 , indicating a strong modulation of expression following PHA/IL-2 stimulation (supplementary table S4 and supplementary figure S2). Among the 8 miRNA differentially expressed between Op-Tol and STA recipients, miR-450b-5p, miR-142-3p and miR-324-5p were down regulated (FC= 0.21, 0.29 and 0.42 respectively; table figure 1B) and miR-876-3p was up-regulated (FC=3.4; table figure 1B) after PHA/IL-2 stimulation. We confirmed the down-regulation of miR-142-3p as early as 2 hours and at 24 hours following PHA/IL-2 stimulation, using individual Taqman microRNA assays (figure 2A).

Because miR-142-3p 1) appeared as the highest differentially expressed miRNA (mean Cq =13.8) between Op-Tol and STA recipients, 2) was under-expressed after PHA/IL-2 stimulation (figure 2A), 3) has been shown to be specific to the hematopoietic lineage²⁴⁻²⁶, and 4) described to play a role in lymphocyte functions²⁷, we focused on the potential role of this miRNA in our study.

Validation of miR-142-3p over-expression and stability over time in PBMC from

Op-Tol recipients: Using individual Taqman microRNA assays, we measured the expression of miR-142-3p in a total of 15 Op-Tol and 20 STA recipients, combining PBMC samples from 16 new patients (6 Op-Tol and 10 STA) and the initial 19 patients analyzed using TLDA. Figure 2B confirms the differential expression and significant up-regulation of mir-142-3p in PBMC from Op-Tol compared to STA recipients ($p=0.0225$, $FC=1.58$). The time between transplantation and analysis was significantly higher in Op-Tol than in STA ($p=0.0164$, Table 1), however we did not find any correlation between the post-transplantation time and miR-142-3p expression value ($r=0.0342$, $p=0.8454$, supplementary figure S3). We also found that the expression of mir-142-3p in the blood of Op-Tol patients was stable over time, as tested in PBMC collected from 3 Op-Tol recipients at 2 different time points (5.5, 11 and 13 months) (figure 2C).

The over-expression of miR-142-3p in the blood of Op-Tol recipients is not due to the absence of immunosuppression:

Because Op-Tol patients display stable graft function but no longer receive IS and because healthy volunteers also displayed an increased expression of miR-142-3p compared to STA patients ($p=0.0038$, $FC=1.54$) (*data not shown*), we hypothesized that IS treatment may modulate the blood expression of miR-142-3p. We thus measured its expression in PBMC from tolerant liver transplant recipients before and after entering an immunosuppressive drug weaning protocol ($n=27$), a population not available in the context of kidney transplantation. No difference was found in the PBMC expression of miR-142-3p with or without IS regimen in these liver recipients, suggesting that miR-142-3p expression is not regulated by IS (Figure 2D).

miR-142-3p is over-expressed in B cells from Op-Tol patients:

We then analyzed the expression of miR-142-3p in purified blood leukocyte sub-populations (T and B lymphocytes, monocytes and NK cells) from HV ($n=3$). Purification was typically $>95\%$. Figure 3A shows that miR-142-3p is expressed in all blood cell subsets, confirming previous reports²⁴⁻²⁶. Because miR-142-3p was highly expressed in B and T lymphocytes from HV, we next analyzed its expression in these two lymphocyte populations in transplant recipients. The expression of miR-142-3p was significantly higher in total B cells purified from Op-Tol compared to STA recipients ($p=0.0098$,

FC= 2.84) (figure 3B). In contrast, no difference was observed in the expression of miR-142-3p in the T lymphocyte subset (figure 3C).

miR-142-3p transfection in the Raji B cell line: Because miRNA regulate translation and mRNA destabilization^{16, 17}, we over-expressed mir-142-3p in the Raji B cell line using a synthetic mimic, and performed total gene expression profiling using gene expression microarrays 24 hours after transfection (synthetic mimic of miR-142-3p or synthetic mimic negative control). A total of 22,332 spots were filtered and the over-expression of miR-142-3p was found to induce the up- and down-regulation of 492 and 489 gene transcripts, respectively. In order to provide a more comprehensive biological interpretation of our finding, GOMiner software was used to identify the over-represented Gene ontology (GO) categories based on the differential gene lists compared to all other expressed genes in the microarray²⁸. Among the 492 over-expressed genes, the gene ontology categories "immune response" (GO:0006955) and "B cell activation" (GO:0042113) were identified with a total of 25 genes. Among the 489 under-expressed genes, gene ontology categories related to cell communication (GO:0007154), "vesicle-mediated transport" (GO:0016192) and "small GTPase mediated signal transduction" (GO:0007264) were identified. We then identified 66 potential miR-142-3p targets down-regulated subsequent to the miR-142-3p over-expression among the 242 genes predicted to be miR-142-3p targets (among at least 4 of 11 established miRNA target prediction databases computed by miRecords software)²⁹. Mixing these 66 potential target genes and the 25 up-regulated immune-related genes and using Ingenuity pathways analysis software (IPA), a gene network related to "Inflammation response, antimicrobial response and cell development" with 49 of these genes was found (supplementary figure S4). Within this gene network, we identified a subgroup of TGF- β -related genes in which the TGF- β receptor 1 gene (TGFB1), a possible target of miR-142-3p, plays a central role (figure 4A), together with a subgroup of IFN γ -related genes (figure 4B), and a subgroup of genes related to B cells (figure 4C).

The analysis of the detailed B cell-related gene network following miR-142-3p transfection highlighted the up-regulation of genes previously identified in PBMC from Op-Tol recipients, such as key molecules as MS4A1 (CD20), CR2, CD38¹⁰ and BANK-1^{11, 12}.

We next validated the array expression patterns of a few select targets and miRNA expression. The up-regulation of miR-142-3p, MS4A1 and BANK1 in Raji cells transfected with miR-142-3p mimics was confirmed using individual Taqman assays (figure 5A).

Validation of TGFBR1 modulation and the miR-142-3p regulatory loop: Using individual qPCR, we also confirmed the significant down-regulation of TGFBR1 gene transcripts subsequent to miR-142-3p transfection in the Raji cell line compared to control ($p=0.0268$, $FC=0.47$; figure 5A). We then noted that the addition of TGF- β to the Raji culture media (5ng/mL over 24hours) induced an increase of miR-142-3p expression, whereas PHA stimulation did not (figure 5B).

For Peer Review

Discussion

The achievement of long-term drug-free tolerance in solid organ transplantation is thought to be possible based on observations in both liver⁴ and kidney transplantation^{3, 5}. We and others have reported on an increased number of peripheral B cells and have identified modifications in blood gene expression in operationally tolerant kidney transplant recipients, involving TGF- β signaling and B cell-related pathways^{7, 8, 10, 12, 14}. However, a clear mechanism or biological process of peripheral regulation has yet to be identified in these patients. miRNA are small RNA molecules with important roles in immune modulation, homeostasis, the development of immune diseases and the regulation of physiological processes¹⁹. Deregulated miRNA expression has been shown to be involved in several human immune-related diseases such as multiple sclerosis^{30, 31}, cancer^{32, 33} and rheumatoid arthritis³⁴ but their function and regulation processes are still far from being totally understood today. In renal transplantation, two studies reported on the identification of miRNA profile signatures in biopsies from kidney transplant patients with acute rejection episodes^{21, 23}, suggesting that miRNA expression profiling may be used to monitor allograft status. To our knowledge and particularly in Op-Tol kidney transplant recipients, no miRNA expression analyses have been performed in the blood.

In this study, we report on the differential expression of eight miRNA in PBMC from kidney graft recipients with drug free operational tolerance compared to patients with stable graft function under IS. The choice of adequate control(s) of the Op-Tol state remains unsolved since healthy individuals have not received a transplant and stable kidney transplant recipients are under long-life IS. Our choice to compare Op-Tol patients to patients with stable graft function under IS was based on the fact that the latter population is the most likely to benefit from immunosuppression minimization, whereas patients with chronic rejection or healthy volunteers would not. Supervised hierarchical clustering analysis based on the expression of these eight miRNA only, led to the clustering of Op-Tol patients together (figure 1A). Among these eight miRNA, miR-142-3p was highly expressed in PBMC from Op-Tol patients. This miRNA has been described as a hematopoietic-restricted lineage miRNA²⁴⁻²⁷. We found that miR-142-3p was not increased following PHA activation, rather its expression was decreased after PHA/IL-2 activation, further favoring a regulatory

loop, as already described for other miRNA such as miR-125b, miR-16b or miR-148b³⁵⁻³⁷. miR-142-3p expression has been reported as playing a role in CD4⁺CD25⁺Treg function by regulating the production of cAMP by targeting cyclases²⁷. Although miR-142-3p was highly expressed in T lymphocytes, we did not observe any differential expression in T lymphocytes between Op-Tol and STA recipients (figure 3C). In contrast, we found a significant over-expression of miR-142-3p in the B lymphocyte subset of drug-free tolerant patients compared to patients with stable graft function ($p=0.0098$, FC= 2.84) (figure 3B) and also compared to patients with signs of chronic antibody-mediated rejection (*data not shown*). We also found that its expression in tolerant liver transplant recipients was not modulated by immunosuppressive treatment (figure 2D), indicating that its over-expression in Op-Tol kidney transplant recipients was not just a consequence of the absence of IS.

Interestingly, these data are in accordance with an increased number of peripheral B cells¹⁴ and with the specific B cell-enriched gene profile that we and others previously reported in the blood of these patients^{7, 8, 10, 12}. Although the increased expression of mir-142-3p in PBMC from Op-Tol kidney recipients could have been a simple reflection of the increased number of blood B cells in these patients, this was not the case, since purified B cells from Op-Tol patients also expressed more mir-142-3p. Whereas this miRNA has already been reported to be expressed specifically in hematopoietic tissues and particularly in B cells, a precise role in the B cell compartment has yet to be attributed^{24-27, 38}.

Interestingly, miR-142-3p expression has also been reported to be associated with tubular atrophy and interstitial fibrosis of renal transplants²². Moreover, miR-142-3p was over-expressed in B lymphocytes from the blood of Op-Tol and this analysis performed in peripheral blood does not exclude a different expression profile within the graft itself. Moreover, we did not find any correlation between miR-142-3p expression and post-transplantation time and we found miR-142-3p expression to be stable over time (figure 2C) which indicates that miR-142-3p is independent of post-transplantation time.

Recently, Guo *et al.* demonstrated that miRNA decreased protein production mostly by lowering mRNA levels¹⁷. Thus, we used gene expression microarrays to measure the impact of miR-142-3p over-expression in B cells, looking at the effect of experimental miR-142-3p transfection in a stable Raji B cell line. Whereas the over-

expression of this single miRNA caused repression of a large number of genes, we observed the paradoxical biological effect of miR-142-3p, which also induced gene up-regulation, as already described for other miRNA³⁹. A large number of genes related to B cells, IFN γ and TGF- β signaling were up-regulated following over-expression of miR-142-3p in the Raji B cell line. Interestingly, some of these genes were already observed in our previous studies, such as MS4A1 (CD20), which was part of the 49 gene signature able to correctly classify kidney Op-Tol recipients¹⁰ and was also part of the best classifier genes in the blood and urine of Op-Tol patients in the study by Newell *et al.*⁷. Similarly, miR-142-3p over-expression led to the up-regulation of BANK1 transcripts, one of the key leader genes up-regulated in the blood of kidney Op-Tol recipients¹¹ independently of immunosuppressive treatment¹². BANK1 is an inhibitory adaptor protein highly expressed in peripheral B cells that is a modulator of hyperactive B cell responses by inhibiting AKT activation upon CD40 signalling¹³. Finally, the TGF- β signaling pathway was also affected after miR-142-3p over-expression in the Raji cell line. Interestingly, miR-106b, one of the eight differentially over-expressed miRNA in PBMC from Op-Tol kidney transplant recipients has also been shown to have an effect on downstream effector molecules of TGF- β signaling^{40, 41}. In a previous report, we showed that this cytokine regulated the function of 27% of the genes that defined the naturally acquired tolerance signature in our previous study¹⁰. TGF- β has been shown to be involved in various animal models of tolerance⁴²⁻⁴⁴, in immune regulation and homeostasis of Treg cells⁴⁵ and is known for its intrinsic suppressive properties⁴⁶. Interestingly, we also report here that TGF- β stimulation of Raji cells induced an increased expression of miR-142-3p, suggesting a negative feedback loop between this cytokine and miR-142-3p in B cells. Such a process of regulation, already described for different miRNA⁴⁰, suggest that miRNA act as key gene switches and as fine tuning molecules, depending of the compartment and the specific biological context²⁰. Therefore, our data suggest that mir-142-3p is also implicated in the TGF- β pathway. However, because the modulation of one miRNA may have an impact on multiple mRNAs that are also regulated by several other miRNAs, a direct link between these two molecules cannot be predicted at this stage.

Our findings show that over-expression of miR-142-3p in B cells correlates to the state of operational tolerance in kidney transplant recipients. They also point towards a possible negative feedback loop between TGF- β and miR-142-3p in B cells.

Further investigations are now needed to find out if this over-expression of miR-142-3p in B cells contributes to controlling inflammatory responses and tolerance maintenance or is only a consequence of this tolerance state.

For Peer Review

Concise methods

Patients: A total of 82 individuals were enrolled in this study including 15 Op-Tol, 34 STA, 6 HV, 11 liver recipients with stable graft function and 16 drug-free liver recipients from the Nantes hospital and the Barcelona hospital. The two local Ethics Committees approved all aspects of the study and all patients gave their informed consent. The clinical information are described in **SI Materials and Methods**, summary of clinical data is presented in Table 1 and detailed clinical data is provided in Supplementary Table S5.

miRNA profiling: miRNA profiling was performed using TaqMan Low Density Arrays (TLDA) microRNA Cards pool A set v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in accordance with the manufacturer's recommendations. Normalization was performed by subtracting the mean Cq of the measured miRNA⁴⁷. Differential expression after normalization was determined using the non-parametric Mann-Whitney test.

miRNA individual assays: Individual miRNA expression was measured with the TaqMan miRNA assay protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using probes for miR-142-3p (assay ID: 000464), RNU6 (assay ID: 001973) and miR-374b (assay ID: 001319) starting with 10ng of total RNA, on an ABI Prism 7900 HT.

Gene expression microarray analysis: Gene expression was measured using whole human genome 4x44K Agilent microarrays following the manufacturer's two-color protocol (Agilent Technologies Inc, Palo Alto, CA, USA). A total of 22,332 spots were filtered. GOMiner software and Ingenuity Pathway Analysis 6.5 software (Ingenuity Systems Inc.) were used to assess biological significance of genes selected with Mann-Whitney tests. Raw microarray data were deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database (accession number GSE28456).

Statistical analysis: The non-parametric Mann-Whitney test, Kruskal Wallis test or paired Wilcoxon tests were used for group comparisons with Graph PadPrism v.4 software. Differences were defined as statistically significant when $p < 0.05$ (*) and highly significant when $p < 0.01$ (**).

Additional details can be found in **SI Materials and Methods**.

Acknowledgments

We thank all the patients who participated in this study and the physicians who helped us recruit patients: JF. Subra, F. Villemain, C. Legendre, E. Thervet, FJ. Bemelman, G. Roussey, G. Orlando, A. Garnier, H. Jambon, H. Le Monies De Sagazan, L. Braun, C. Noël, E. Pillebout, MC. Moal, C. Cantarell, A. Hoitsma, M. Ranbant, A. Testa.

The ITUN belongs to the "Fondation Centaure" (RTRS) which supports a French research network in transplantation. R.D. was supported by the "Fondation Centaure" and by a grant from the "Fondation pour la Recherche Médicale" (FRM). We thank the transcriptome core facility of Nantes for technical assistance with gene expression microarrays. We also thank Yohann Foucher for his critical review of the manuscript.

Author contribution

RD, JPS and SB conceived and designed the experiments. RD and SB wrote the article. RD, AP, MML and ND performed the experiments. RD, JJJ and SB analyzed the data. MG and ASF provided materials/analysis tools.

Disclosure

The authors of this manuscript have no conflict of interest to declare.

References

1. Danger, R, Giral, M, Souillou, JP, Brouard, S: Rationale and criteria of eligibility for calcineurin inhibitor interruption following kidney transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*, 13: 609-613, 2008.
2. Ashton-Chess, J, Giral, M, Brouard, S, Souillou, JP: Spontaneous operational tolerance after immunosuppressive drug withdrawal in clinical renal allotransplantation. *Transplantation*, 84: 1215-1219, 2007.
3. Orlando, G, Soker, S, Wood, K: Operational tolerance after liver transplantation. *Journal of Hepatology*, 50: 1247-1257, 2009.
4. Martinez-Llordella, M, Puig-Pey, I, Orlando, G, Ramoni, M, Tisone, G, Rimola, A, Lerut, J, Latinne, D, Margarit, C, Bilbao, I, Brouard, S, Hernandez-Fuentes, M, Souillou, JP, Sanchez-Fueyo, A: Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant*, 7: 309-319, 2007.
5. Roussey-Kesler, G, Giral, M, Moreau, A, Subra, JF, Legendre, C, Noel, C, Pillebout, E, Brouard, S, Souillou, JP: Clinical Operational Tolerance after Kidney Transplantation. *Am J Transplant*, 6: 736-746, 2006.
6. Kawai, T, Cosimi, AB, Spitzer, TR, Tolkoff-Rubin, N, Suthanthiran, M, Saidman, SL, Shaffer, J, Preffer, FI, Ding, R, Sharma, V, Fishman, JA, Dey, B, Ko, DS, Hertl, M, Goes, NB, Wong, W, Williams, WW, Jr., Colvin, RB, Sykes, M, Sachs, DH: HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression. *N Engl J Med*, 358: 353-361, 2008.
7. Newell, KA, Asare, A, Kirk, AD, Gisler, TD, Bourcier, K, Suthanthiran, M, Burlingham, WJ, Marks, WH, Sanz, I, Lechler, RI, Hernandez-Fuentes, MP, Turka, LA, Seyfert-Margolis, VL: Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*, 120: 1836-1847, 2010.
8. Sagoo, P, Perucha, E, Sawitzki, B, Tomiuk, S, Stephens, DA, Miqueu, P, Chapman, S, Craciun, L, Sergeant, R, Brouard, S, Rovis, F, Jimenez, E, Ballow, A, Giral, M, Rebollo-Mesa, I, Le Moine, A, Braudeau, C, Hilton, R, Gerstmayr, B, Bourcier, K, Sharif, A, Krajewska, M, Lord, GM, Roberts, I, Goldman, M, Wood, KJ, Newell, K, Seyfert-Margolis, V, Warrens, AN, Janssen, U, Volk, HD, Souillou, JP, Hernandez-Fuentes, MP, Lechler, RI: Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans. *J Clin Invest*, 120: 1848-1861, 2010.
9. Braud, C, Baeten, D, Giral, M, Pallier, A, Ashton-Chess, J, Braudeau, C, Chevalier, C, Lebars, A, Léger, J, Moreau, A, Pechkova, E, Nicolini, C, Souillou, J-P, Brouard, S: Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: Part I. Blood gene expression statistical analysis. *Journal of Cellular Biochemistry*, 103: 1681-1692, 2008.
10. Brouard, S, Mansfield, E, Braud, C, Li, L, Giral, M, Hsieh, SC, Baeten, D, Zhang, M, Ashton-Chess, J, Braudeau, C, Hsieh, F, Dupont, A, Pallier, A, Moreau, A, Louis, S, Ruiz, C, Salvatierra, O, Souillou, JP, Sarwal, M: Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 15448-15453, 2007.
11. Sivozhelezov, V, Braud, C, Giacomelli, L, Pechkova, E, Giral, M, Souillou, JP, Brouard, S, Nicolini, C: Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplants recipients. Part II. Non-statistical gene microarray analysis. *J Cell Biochem*, 103: 1693-1706, 2008.
12. Pallier, A, Hillion, S, Danger, R, Giral, M, Racape, M, Degauque, N, Dugast, E, Ashton-Chess, J, Pettre, S, Lozano, JJ, Bataille, R, Devys, A, Cesbron-Gautier, A, Braudeau, C, Larrose, C, Souillou, JP, Brouard, S: Patients with drug-free long-term graft function display increased numbers of peripheral B cells with a memory and inhibitory phenotype. *Kidney Int*, 78: 503-513, 2010.

31. Junker, A, Krumbholz, M, Eisele, S, Mohan, H, Augstein, F, Bittner, R, Lassmann, H, Wekerle, H, Hohlfeld, R, Meinl, E: MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47. *Brain*, 132: 3342-3352, 2009.
32. Farazi, TA, Spitzer, JI, Morozov, P, Tuschl, T: miRNAs in human cancer. *J Pathol*, 223: 102-115, 2011.
33. Marcucci, G, Mrozek, K, Radmacher, MD, Garzon, R, Bloomfield, CD: The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood*, 117: 1121-1129, 2011.
34. Pauley, KM, Satoh, M, Chan, AL, Bubb, MR, Reeves, WH, Chan, EK: Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res Ther*, 10: R101, 2008.
35. Tili, E, Michaille, JJ, Cimino, A, Costinean, S, Dumitru, CD, Adair, B, Fabbri, M, Alder, H, Liu, CG, Calin, GA, Croce, CM: Modulation of miR-155 and miR-125b levels following lipopolysaccharide/TNF-alpha stimulation and their possible roles in regulating the response to endotoxin shock. *J Immunol*, 179: 5082-5089, 2007.
36. Liu, X, Zhan, Z, Xu, L, Ma, F, Li, D, Guo, Z, Li, N, Cao, X: MicroRNA-148/152 impair innate response and antigen presentation of TLR-triggered dendritic cells by targeting CaMKIIalpha. *J Immunol*, 185: 7244-7251, 2010.
37. De Santis, G, Ferracin, M, Biondani, A, Caniatti, L, Rosaria Tola, M, Castellazzi, M, Zagatti, B, Battistini, L, Borsellino, G, Fainardi, E, Gavioli, R, Negrini, M, Furlan, R, Granieri, E: Altered miRNA expression in T regulatory cells in course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 226: 165-171, 2010.
38. Malumbres, R, Sarosiek, KA, Cubedo, E, Ruiz, JW, Jiang, X, Gascoyne, RD, Tibshirani, R, Lossos, IS: Differentiation stage-specific expression of microRNAs in B lymphocytes and diffuse large B-cell lymphomas. *Blood*, 113: 3754-3764, 2009.
39. Srikantan, S, Marasa, BS, Becker, KG, Gorospe, M, Abdelmohsen, K: Paradoxical microRNAs: Individual gene repressors, global translation enhancers. *Cell Cycle*, 10: 751-759, 2011.
40. Petrocca, F, Visone, R, Onelli, MR, Shah, MH, Nicoloso, MS, de Martino, I, Iliopoulos, D, Pilozi, E, Liu, CG, Negrini, M, Cavazzini, L, Volinia, S, Alder, H, Ruco, LP, Baldassarre, G, Croce, CM, Vecchione, A: E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell*, 13: 272-286, 2008.
41. Wang, H, Liu, J, Zong, Y, Xu, Y, Deng, W, Zhu, H, Liu, Y, Ma, C, Huang, L, Zhang, L, Qin, C: miR-106b aberrantly expressed in a double transgenic mouse model for Alzheimer's disease targets TGF-beta type II receptor. *Brain Res*, 1357: 166-174, 2010.
42. Chiffolleau, E, Berioux, G, Dutartre, P, Usal, C, Souillou, JP, Cuturi, MC: Role for thymic and splenic regulatory CD4+ T cells induced by donor dendritic cells in allograft tolerance by LF15-0195 treatment. *J Immunol*, 168: 5058-5069, 2002.
43. Gagne, K, Brouard, S, Guillet, M, Cuturi, MC, Souillou, JP: TGF-beta1 and donor dendritic cells are common key components in donor-specific blood transfusion and anti-class II heart graft enhancement, whereas tolerance induction also required inflammatory cytokines down-regulation. *Eur J Immunol*, 31: 3111-3120, 2001.
44. Josien, R, Douillard, P, Guillot, C, Muschen, M, Anegon, I, Chetrit, J, Menoret, S, Vignes, C, Souillou, JP, Cuturi, MC: A critical role for transforming growth factor-beta in donor transfusion-induced allograft tolerance. *J Clin Invest*, 102: 1920-1926, 1998.
45. Bommireddy, R, Doetschman, T: TGFbeta1 and Treg cells: alliance for tolerance. *Trends Mol Med*, 13: 492-501, 2007.
46. Wan, YY, Flavell, RA: 'Yin-Yang' functions of transforming growth factor-beta and T regulatory cells in immune regulation. *Immunol Rev*, 220: 199-213, 2007.
47. Mestdagh, P, Van Vlierberghe, P, De Weer, A, Muth, D, Westermann, F, Speleman, F, Vandesompele, J: A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol*, 10: R64, 2009.

Journal of the American Society of NEPHROLOGY

13. Aiba, Y, Yamazaki, T, Okada, T, Gotoh, K, Sanjo, H, Ogata, M, Kurosaki, T: BANK negatively regulates Akt activation and subsequent B cell responses. *Immunity*, 24: 259-268, 2006.
14. 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.
15. Le Texier, L, Thebault, P, Lavault, A, Usal, C, Merieau, E, Quillard, T, Charreau, B, Souillou, JP, Cuturi, MC, Brouard, S, Chiffolleau, E: Long-term allograft tolerance is characterized by the accumulation of B cells exhibiting an inhibited profile. *Am J Transplant*, 11: 429-438, 2011.
16. Baek, D, Villen, J, Shin, C, Camargo, FD, Gygi, SP, Bartel, DP: The impact of microRNAs on protein output. *Nature*, 455: 64-71, 2008.
17. Guo, H, Ingolia, NT, Weissman, JS, Bartel, DP: Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466: 835-840.
18. Peter, ME: Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step. *Oncogene*, 29: 2161-2164, 2010.
19. O'Connell, RM, Rao, DS, Chaudhuri, AA, Baltimore, D: Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 10: 111-122, 2010.
20. Schott, J, Stoecklin, G: Networks controlling mRNA decay in the immune system. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, 1: 432-456, 2010.
21. Anglicheau, D, Sharma, VK, Ding, R, Hummel, A, Snopkowski, C, Dadhania, D, Seshan, SV, Suthanthiran, M: MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009.
22. Potter, A, Maluf, D, Suh, J, Whitehill, B, Yanek, K, Fisher, R, Posner, M, King, A, Mas, V: Overexpression of microRNAs Associated with Tubular Atrophy and Interstitial Fibrosis Post Kidney Transplantation. *American Transplant Congress 2009*: 250-251, 2009.
23. Sui, W, Dai, Y, Huang, Y, Lan, H, Yan, Q, Huang, H: Microarray analysis of MicroRNA expression in acute rejection after renal transplantation. *Transplant Immunology*, 19: 81-85, 2008.
24. Chen, CZ, Li, L, Lodish, HF, Bartel, DP: MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 303: 83-86, 2004.
25. Landgraf, P, Rusu, M, Sheridan, R, Sewer, A, Iovino, N, Aravin, A, Pfeffer, S, Rice, A, Kamphorst, AO, Landthaler, M, Lin, C, Socci, ND, Hermida, L, Fulci, V, Chiaretti, S, Foa, R, Schliwka, J, Fuchs, U, Novosel, A, Muller, RU, Schermer, B, Bissels, U, Inman, J, Phan, Q, Chien, M, Weir, DB, Choksi, R, De Vita, G, Frezzetti, D, Trompeter, HI, Hornung, V, Teng, G, Hartmann, G, Palkovits, M, Di Lauro, R, Wernet, P, Macino, G, Rogler, CE, Nagle, JW, Ju, J, Papavasiliou, FN, Benzing, T, Lichter, P, Tam, W, Brownstein, MJ, Bosio, A, Borkhardt, A, Russo, JJ, Sander, C, Zavolan, M, Tuschl, T: A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 129: 1401-1414, 2007.
26. Merkerova, M, Belickova, M, Bruchova, H: Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *European Journal of Haematology*, 81: 304-310, 2008.
27. Huang, B, Zhao, J, Lei, Z, Shen, S, Li, D, Shen, GX, Zhang, GM, Feng, ZH: miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+CD25- T cells and CD4+CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA. *EMBO Rep*, 10: 180-185, 2009.
28. Zeeberg, BR, Feng, W, Wang, G, Wang, MD, Fojo, AT, Sunshine, M, Narasimhan, S, Kane, DW, Reinhold, WC, Lababidi, S, Bussey, KJ, Riss, J, Barrett, JC, Weinstein, JN: GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biology*, 4: R28-R28, 2003.
29. Xiao, F, Zuo, Z, Cai, G, Kang, S, Gao, X, Li, T: miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Res*, 37: D105-110, 2009.
30. Otaegui, D, Baranzini, SE, Armananzas, R, Calvo, B, Munoz-Culla, M, Khankhanian, P, Inza, I, Lozano, JA, Castillo-Trivino, T, Asensio, A, Olaskoaga, J, Lopez de Munain, A: Differential micro RNA expression in PBMC from multiple sclerosis patients. *PLoS ONE*, 4: e6309, 2009.

Figure legends

Figure 1: Differential miRNA in PBMC from Op-Tol compared to STA kidney transplant recipients

A) The 8 miRNA with p values inferior to 0.05 according to Mann-Whitney tests are represented in this heatmap where blue and green bars represent STA and Op-Tol patients respectively. The heatmap represents normalized and color-coded relative expression values ($2^{-\Delta\Delta Cq}$) in which red values indicate over-expression and green values indicate under-expression. B) 8 differential miRNA classified according to their p values.

Figure 2: miR-142-3p expression in PBMC

A) miR-142-3p is down-regulated in PBMC from HV after PHA/IL-2 stimulation as early as 2 hours and remains low up to 24 hours. Mean \pm SEM of miR-142-3p relative expression ($2^{-\Delta\Delta Cq}$ relative to RNU6) in total PBMC from 3 HV stimulated with PHA (2ug/mL) and IL-2 (150U/mL) are represented. B) miR-142-3p is significantly over-expressed in PBMC from Op-Tol kidney transplant recipients compared to STA patients ($p=0.0225$, FC=1.58). qPCR measurements were performed using individual assays with PBMC samples (20 STA and 15 Op-Tol). Mean \pm SEM of miR-142-3p relative expression ($2^{-\Delta\Delta Cq}$ relative to miR-374b) are represented. C) miR-142-3p expression is not different in PBMC from liver transplant recipients before ($n=11$) and after IS weaning ($n=16$). Mean \pm SEM of miR-142-3p relative expression ($2^{-\Delta\Delta Cq}$ relative to miR-374b) are represented. D) miR-142-3p expression is stable between the 2 time points (5.5, 11 and 13 months between blood collections) for 3 Op-Tol patients. Mean \pm SEM of miR-142-3p relative expression ($2^{-\Delta\Delta Cq}$ relative to miR-374b) are represented.

Figure 3: miR-142-3p expression in purified blood cell populations

A) miR-142-3p expression in isolated subpopulations from 3 HV PBMC (except NK cells, $n=2$). B) miR-142-3p expression exhibited increased expression in total B lymphocytes isolated from kidney Op-Tol recipients ($n=5$) compared to STA ($n=12$)

($p=0.0098$, $FC= 2.84$). Mean \pm SEM of miR-142-3p relative expression ($2^{-\Delta\Delta Cq}$ relative to RNU6) are represented.

Figure 4: three subgroups of genes with modulated function following miR-142-3p over-expression in Raji cells.

A, B and C) These 3 subgroups of genes were extracted from the gene network created using IPA software (supplementary figure S3). Genes in red and genes in green are up-regulated and down-regulated in Raji transfected by miR-142-3p compared to control mimic, respectively.

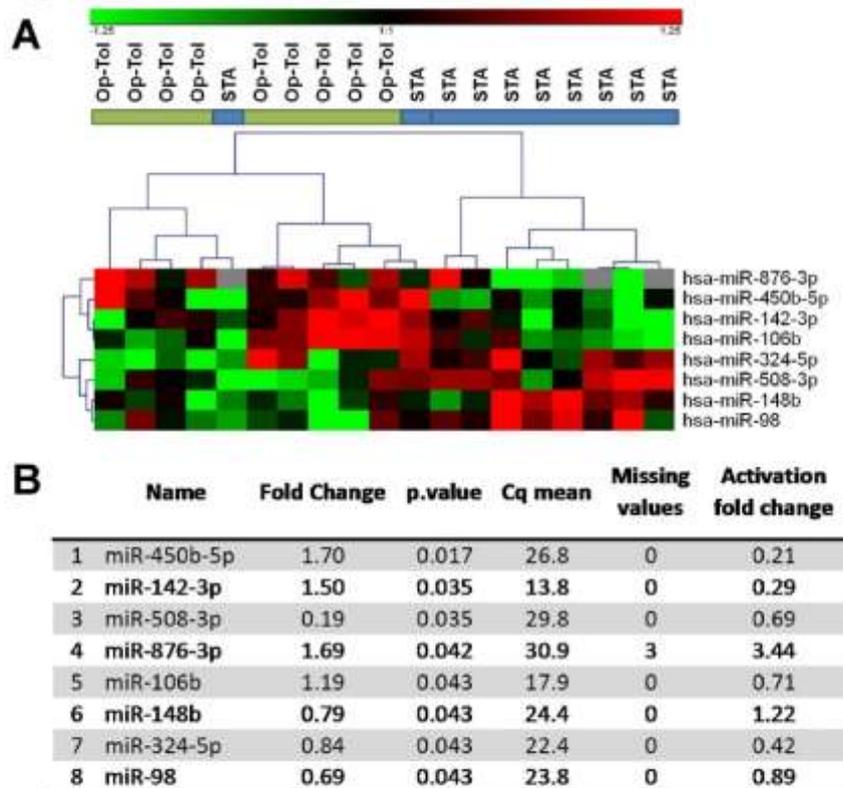
Figure 5: miR-142-3p expression in Raji cells

A) Confirmation of the over-expression of miR-142-3p, BANK1 and CD20 and the under-expression of TGFBR1 in Raji cells transfected with miR-142-3p mimic compared to a control mimic ($n=4$). Mean \pm SEM of gene relative expression ($2^{-\Delta\Delta Cq}$ relative to RNU6 for miR-142-3p or relative to HPRT1 for other genes) are represented. B) miR-142-3p expression is increased by TGF- β in Raji cells whereas PHA has no effects in Raji cells, compared to control (PBS), after 24 hours of culture. Mean \pm SEM of miR-142-3p fold change (control/stimulation) are represented.

Table 1: summary of clinical data for the 35 kidney recipients used for measure of miR-142-3p expression

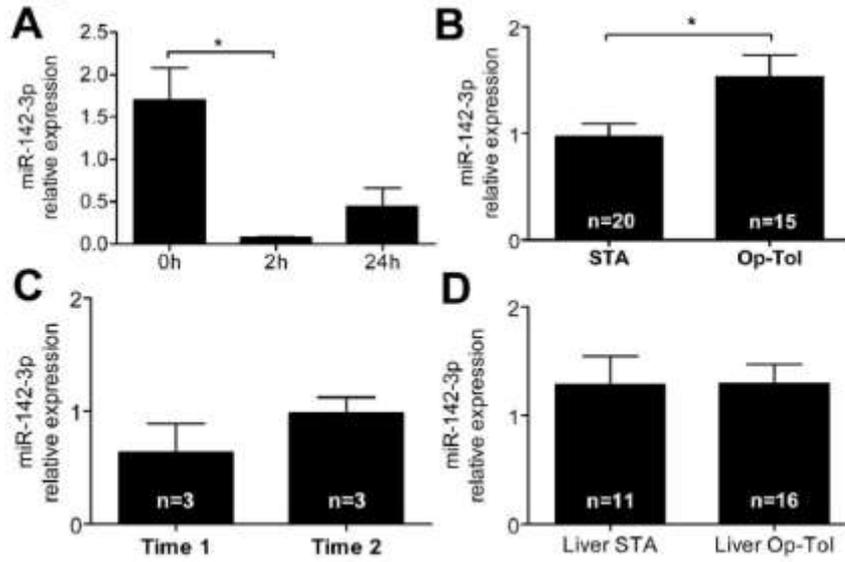
Parameters	STA			Op-TOL			p
	Mean	SD	n	Mean	SD	n	
Recipient age (years)	53.8	11.9	20	50.6	17.0	15	0.3679
Recipient gender (female/all)	9/20			5/15			0.3203
Time between graft and analysis (months)	138.7	84.5	20	208.3	74.0	15	0.0164
Creatinemia ($\mu\text{mol/L}$)	121.1	32.5	20	110.1	22.1	15	0.5833
Proteinuria (g/24h)	0.23	0.17	17	0.25	0.34	11	0.1448
Number of HLA mismatches	3.35	0.99	20	2.40	1.63	15	0.5733
Non Living Donor (NLD) /Living Donor (LD)	0/20			3/15			
Time between immunosuppression withdrawal and analysis (years)	NA			3.3	1.8	15	

Figure 1



85x85mm (600 x 600 DPI)

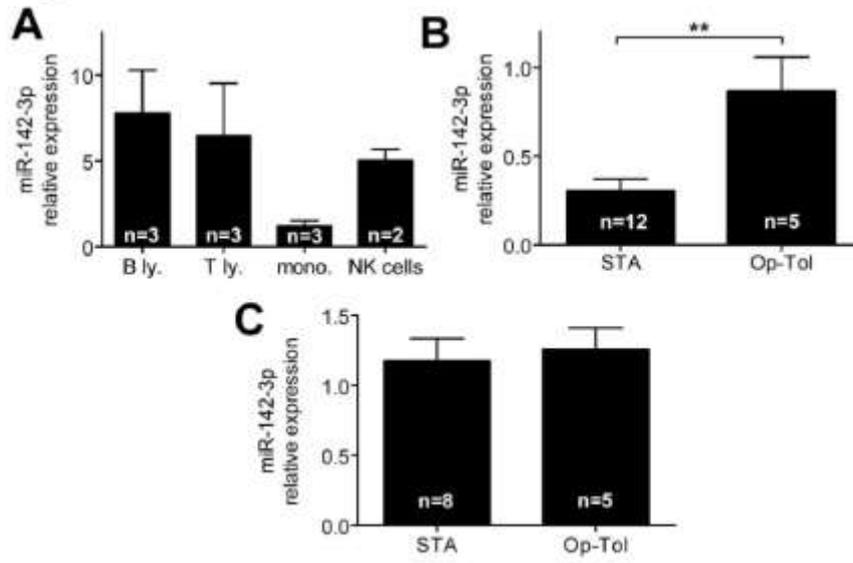
Figure 2



62x44mm (600 x 600 DPI)

Review

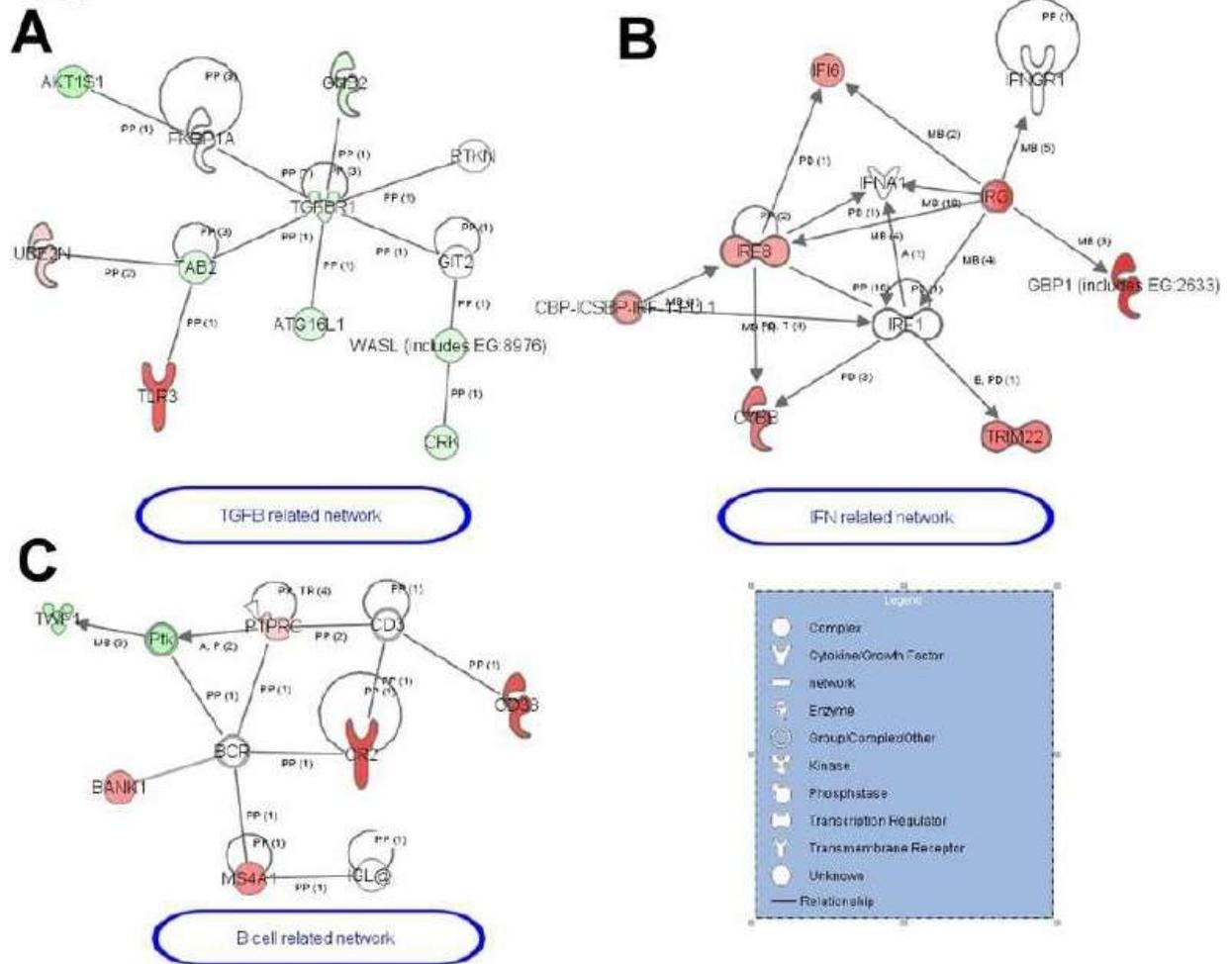
Figure 3



61x44mm (600 x 600 DPI)

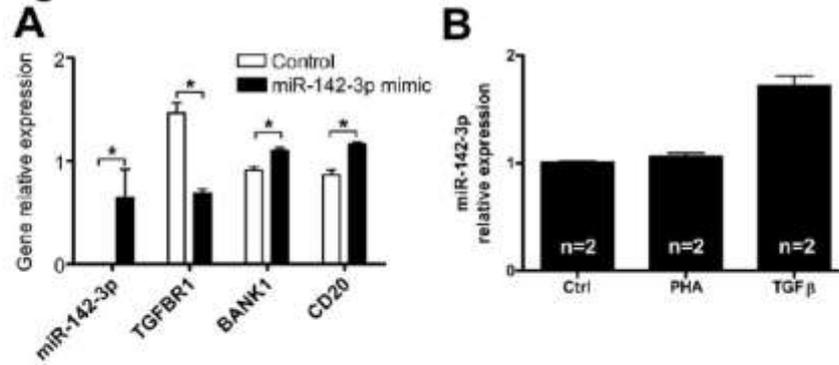
Review

Figure 4



74x64mm (300 x 300 DPI)

Figure 5



41x19mm (600 x 600 DPI)

Peer Review

SI materials and methods

Patients: A total of 82 individuals were enrolled in this study including 49 kidney recipients from Nantes Hospital and 27 liver recipients from Barcelona hospital. A detailed clinical data is provided in Supplementary Table S5. The two local Ethics Committees approved all aspects of the study and all patients gave their informed consent. The following patient groups were included: *1) long-term immunosuppressive drug-free kidney transplant recipients (Op-Tol; n = 15)*: Op-Tol patients had stable kidney graft function (blood creatinemia <150µmol/L and proteinuria <1g/24h) in the absence of immunosuppression for at least one year as previously defined (1). Immunosuppressive treatment was stopped due to non-compliance (n=11), post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD) (n=3) or calcineurin inhibitor toxicity (n=1); *2) Kidney transplant recipients with stable graft function under standard immunosuppression (STA; n= 34)*: Stable patients under standard immunosuppression had proteinuria <1g/24h and a stable creatinemia (variations <25%) for at least 3 years. STA were included as controls. As for the operationally tolerant recipients, no biopsies were available; *3) Healthy volunteers (HV; n=6)*: All had a normal blood formula and no infectious or other concomitant pathology for at least 6 months prior to the study. *4) Liver recipients with stable graft function*: >3 years after transplantation and under standard immunosuppression (n=11). *5) Liver recipients maintaining stable graft function in the absence of immunosuppressive therapy (n=16)*: were intentionally weaned from immunosuppression under medical supervision at least 1 year prior to the study. All liver recipients were hepatitis C virus negative.

Blood sample preparation: Venous blood samples were collected in EDTA vacutainers and processed for analysis within 4 hours. Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) were separated on a Ficoll layer (Eurobio, Les Ulis, France) and frozen in TRIzol® reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) at -80°C. RNA was extracted from peripheral blood using the TRIzol method (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). RNA quality and quantity were determined using an Agilent 2100 BioAnalyzer (Palo Alto, CA, USA) and a Nanodrop (Labtech, Palaiseau, France) respectively.

PBMC sub-population selection and purification: PBMC subpopulations were sequentially purified by positive selection using magnetic CD19, CD3, CD14 and then CD56 Microbeads and an autoMACS™ Separator (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, Germany). Purification was typically >95%. Separated cells were immediately frozen in TRIzol® reagent (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) at -80 °C.

Cell culture and analysis: PBMC from 3 HV (2×10^6 cells/well) or Raji cells (1×10^6 cells/well) were cultured in 6-well plates in RPMI 1640 medium supplemented with penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 µg/ml), sodium pyruvate (1 mM), and 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Gibco, Cergy-Pontoise, France). PBMC were stimulated with phytohemagglutinin A (PHA, 2 µg/mL, Sigma-Merck, Darmstadt, Germany) and IL-2 (150 U/mL) for 2 or 24 hours. Cells were stained with PE-Cy7 anti-CD25, PE anti-CD69 and Alexa 700 anti-CD3 antibodies (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Flow cytometry was performed on a BD LSRII analyzer and analyzed with FlowJo software (TriStar Inc., Ashland, OR, USA). Raji cells were electroporated on an Amaxa Nucleofector using the Amaxa kit V (Lonza, Cologne, Germany) following the manufacturer's instructions with 1.5 µg of meridian Mimic for miR-142-3p or control (Dharmacon-ThermoFisher, Lafayette, CO, USA). Raji stimulations with PHA (10 µg/mL) or TGF-β1 (5 ng/mL, PeproTech Inc, Rocky Hill, NJ, USA) were processed over 24 hours.

miRNA profiling: miRNA profiling was performed using TaqMan Low Density Arrays (TLDA) microRNA Cards pool A set v2.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with pre-amplification in accordance with the manufacturer's recommendations. Briefly, 200 ng of total RNA was reverse-transcribed using the Megaplex RT stem-loop primer pool A set v2.0 and pre-amplified by 12 cycles of PCR reaction using a Megaplex PreAmp Primers pool A. Quantitative PCR was performed with pre-amplified cDNA and with TaqMan Array MicroRNA Cards pool A set v2.0 on an ABI Prism 7900 HT (Applied Biosystems) with SDS software version 2.3. For further data analysis, miRNA values with a Cq value >35 were considered as not expressed. Any miRNA not expressed in more than half of the samples per group was excluded. For each sample, normalization was performed by subtracting the mean Cq of the

measured miRNA (2). Differential expression after normalization was determined using the non-parametric Mann-Whitney test. Hierarchical clustering and principal component analysis (PCA) were performed with Genesis software using the Pearson correlation as a similarity metric and average linkage clustering.

miRNA individual assays: Individual miRNA expression was measured with the TaqMan miRNA assay protocol (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using probes for miR-142-3p (assay ID: 000464), RNU6 (assay ID: 001973) and miR-374b (assay ID: 001319) starting with 10ng of total RNA, on an ABI Prism 7900 HT. miR-374b was chosen as an endogenous control for PBMC samples as it showed the least variance and was one of the miRNA the most correlated to the mean Cq of all miRNA in the TLDA assays. RNU6 was chosen as an endogenous control for sample sources other than PBMC. Relative expression between a sample and a reference was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method (3).

Gene expression assays: RNA was reverse-transcribed using polydT oligonucleotides and Maloney leukemia virus reverse transcription (Invitrogen, Cergy Pontoise, France). Real-time quantitative PCR was performed using commercially available primer and probe sets for HPRT1: Hs99999909_m1, TGFBR1: Hs00610318_m1, BANK1: Hs01009378_m1 and MS4A1 (CD20): Hs00544818_m1 from Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). HPRT1 was used as an endogenous control to normalize for RNA amounts. Relative expression between a sample and a reference was calculated according to the $2^{-\Delta\Delta Cq}$ method (3).

Gene expression microarray analysis: Aliquots of 200ng RNA from Raji cells were prepared with the Agilent Low Input Quick Amp Labeling Kit following the manufacturer's two-color protocol. The labeled cRNA samples were then fragmented by fragmentation hybridization on whole human genome 4x44K Agilent microarrays (Agilent Technologies Inc, Palo Alto, CA, USA). Data extraction of median feature intensity was performed with Feature Extraction software v10.7 (Agilent Technologies). In order to remove signal intensity bias between each array, median feature intensities were normalized with the function lowess (Locally weighted

scatterplot smoothing) method and then spots for which half of the samples exhibited a signal less than the mean of all median signals were removed. A total of 22,332 spots were filtered. A Mann-Whitney test was performed on each spot comparing the control with the miR-142-3p transfection and the threshold of significance was fixed arbitrarily at 5%. To assess the biological significance of selected genes, GOMiner software was used to identify the over-represented GO ontology (GO) categories based on the identified gene list compared to all other expressed genes in the microarray (4). Only GO categories with enrichment p-values inferior to 0.5% and categories with almost 5 genes were selected. Ingenuity Pathway Analysis 6.5 (Ingenuity Systems Inc.) was used to construct network pathways. Raw microarray data were deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO) database (accession number GSE28456).

References

1. Brouard S, *et al.* (2007) Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(39):15448-15453.
2. Mestdagh P, *et al.* (2009) A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 10(6):R64.
3. PE Applied Biosystems FC (1997) *ABI PRISM 7900 user bulletin* 2:11–24.
4. Zeeberg BR, *et al.* (2003) GoMiner: a resource for biological interpretation of genomic and proteomic data. *Genome Biology* 4(4):R28-R28.

SI legends

Supplementary figure S1: Graph representing the principal component analysis of the PBMC samples using the 8 differentially expressed miRNA from Op-Tol and STA kidney transplant recipients.

STA samples and Op-Tol samples are represented in purple and black respectively.

Supplementary figure S2: Activation of PBMC from HV with PHA and IL-2.

A) The use of activation markers CD69 and CD25 demonstrated the activation of CD3 positive gated cells 24 hours after PHA (2ug/mL) and IL-2 (150U/mL) stimulation compared to unstimulated cells. B) This scatter plot represents ΔCq values for unstimulated PBMC as a function of ΔCq values for stimulated PBMC at 24 hours. The red plot indicates miRNA with a 2 fold or more increase in expression and green plots indicates miRNA with a 2 fold or more decrease in expression.

Supplementary figure S3: Post-transplantation time in function of miR-142-3p expression.

No significant correlation was found between post-transplantation time (months) and miR-142-3p relative expression ($r=0.0342$, $p=0.8454$). Dotted line represent the correlation line. Mean \pm SEM of miR-142-3p relative expression ($2^{-\Delta\Delta Cq}$ relative to miR-374b) from the 35 PBMC samples (15Op-Tol, 20 STA) are represented.

Supplementary figure S4: gene network obtained with up-regulated immune-related genes and possible miR-142-3p target genes

Among the 25 up-regulated immune-related genes and the 66 possible target genes of miR-142-3p, 49 genes are presented in this gene network obtained with IPA software. Genes in red and genes in green are up-regulated and down-regulated in Raji transfected by miR-142-3p compared to control mimic respectively.

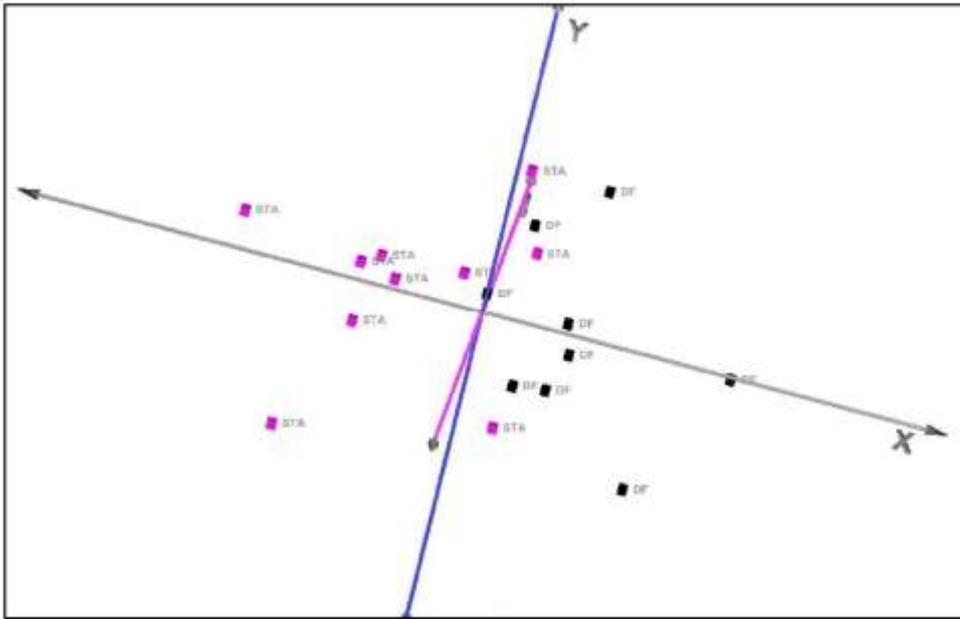
Supplementary table S5: detailed clinical table for kidney (n=49) and liver (n=27) transplanted recipients

Supplementary table S6: Expression value (dCq) for miRNA modulated following PHA/IL-2 stimulation in PBMC from HV

Among the 258 measured miRNA with a Cq below 35, 52 miRNA displayed a fold change (FC) > 2 and 59 miRNA a FC < 2 following 24hours of PHA/IL-2 stimulation in PBMC from HV.

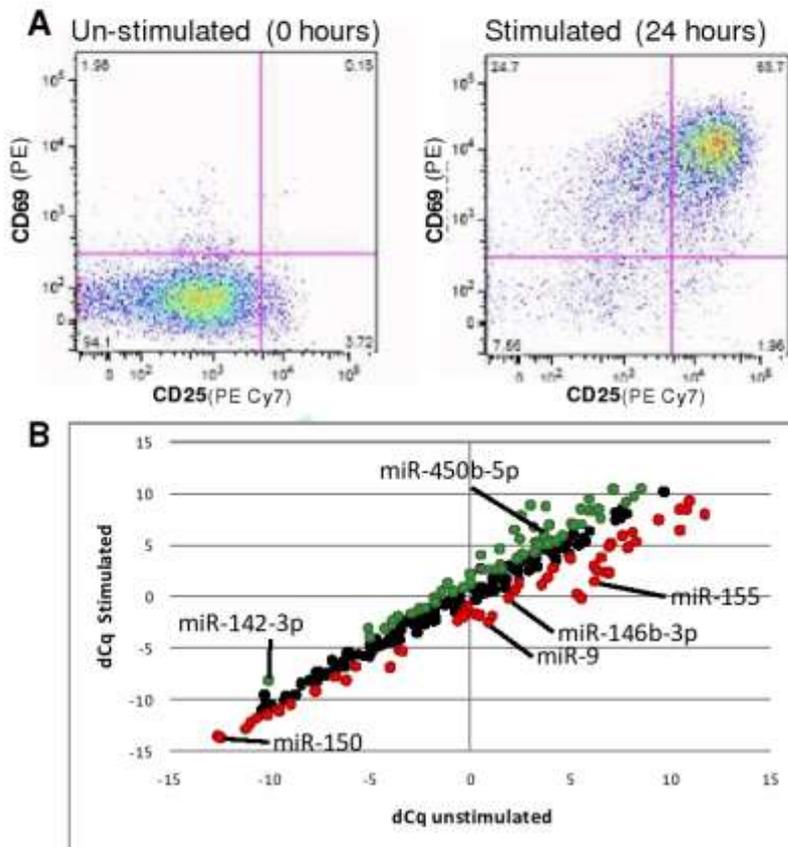
For Peer Review

Supplementary figures

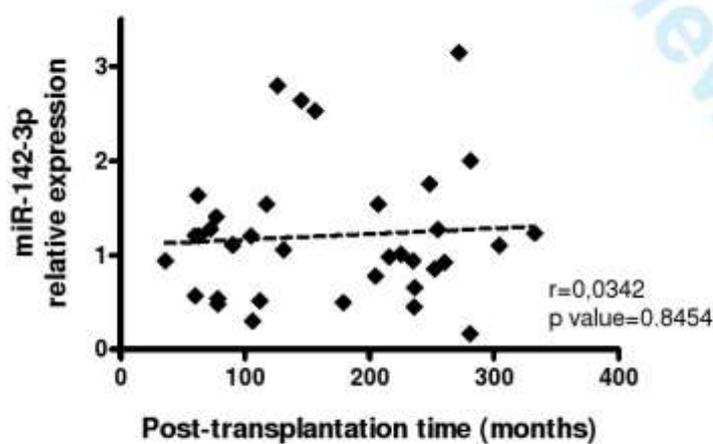


Supplementary figure 1

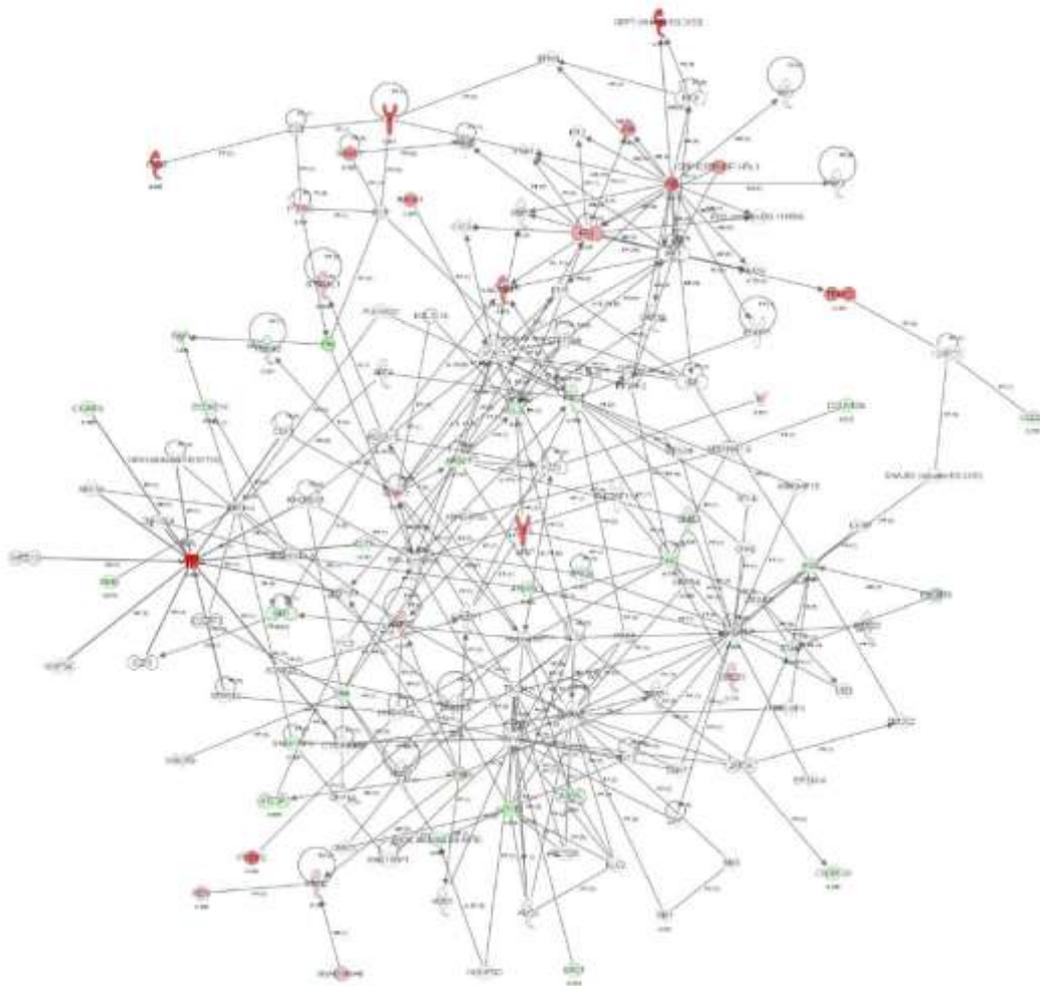
Review



Supplementary figure 2



Supplementary figure 3



Supplementary figure 4

iew

Supplementary table 1

Group	FBMC use	ID	Recipient age (year)	Recipient gender	Previous episode of acute rejection	lymphoma status, donor	Episode of acute infection (CMV, EBV, HB)	Time between graft and analysis (months)	Creatinemia (μmol/L)	Proteinuria (g/24h)	Non Living Donor (NLD)/Living Donor (LD)	Donor gender	Donor age	Number of HLA mismatches	medial treatment	Previous transplantation	Event	Time between immune suppression withdrawal and analysis (years)
STA	TLDA	S1A.1	58	F	0	0	0	305	88	0.07	NLD	M	21	3	Fc+AZA+CS	0	E	
		S1A.2	43	F	1	0	0	214	133	0.12	NLD	M	33	5	CS+AZA	0	E	
		S1A.3	43	M	0	1	1	78	174	0.28	NLD	F	58	2	FK506A	0	E	
		S1A.4	54	F	0	0	0	40	93	0.12	NLD	F	48	4	FK506A	0	E	
		S1A.5	49	F	0	0	0	225	131	0.07	NLD	M	47	3	CS+AZA	0	E	
		S1A.6	58	M	0	0	0	40	131	0.14	NLD	M	52	3	FK506A	0	E	
		S1A.7	54	M	0	0	0	40	94	0.08	NLD	M	52	4	FK506A	0	E	
		S1A.8	41	M	0	0	0	72	154	0.17	NLD	M	58	3	FK	0	E	
		S1A.9	38	M	0	0	0	77	170	0.36	NLD	M	38	3	FK506A	0	E	
		S1A.10	52	M	0	0	0	145	149	0.32	NLD	M	39	3	FK506A	0	E	
	S1A.11	44	F	1	0	0	281	111	nc	NLD	M	29	4	FK	0	E		
	S1A.12	43	M	0	1	0	78	90	0.12	NLD	M	31	2	FK506A	0	E		
	S1A.13	48	F	0	0	0	204	138	0.58	NLD	M	25	2	CS+AZA	0	E		
	S1A.14	55	F	0	0	1	252	118	nc	NLD	M	30	2	CSA	0	E		
	S1A.15	57	F	0	1	1	240	80	nc	NLD	M	25	3	CSA	0	E		
	S1A.16	75	F	0	1	0	16	53	0.17	NLD	M	66	4	FK506A	1	E		
	S1A.17	47	M	0	0	0	214	117	0.44	NLD	M	17	5	CS+AZA	0	E		
	S1A.18	51	M	1	0	1	191	142	0.15	NLD	F	34	5	CS+AZA	0	E		
	S1A.19	26	M	0	0	0	30	85	0.58	NLD	F	24	4	FK+AZA+CS	0	E		
	S1A.20	61	M	0	0	0	62	126	0.12	NLD	M	57	3	FK506A	0	E		
Op-Td	TLDA	Op-Td1	72	F	2	1	1	105	82	nc	NLD	M	39	3		0	E	7.4
		Op-Td2	26	M	1	1	1	104	121	0.33	NLD	M	21	3		0	E	5.3
		Op-Td3	38	M	1	0	1	272	144	0.89	NLD	M	17	3		0	E	13.8
		Op-Td4	62	M	0	0	1	25	105	0.07	NLD	M	17	4		0	E	9.3
		Op-Td5	42	M	0	0	0	117	118	nc	LD	M	38	0		0	E	3.3
		Op-Td6	52	M	0	0	0	128	135	nc	LD	F	45	0		0	E	7.5
		Op-Td7	54	F	0	2	1	281	40	0.04	LD	F	44	0		0	E	4.1
		Op-Td8	54	M	0	1	0	179	164	+0.1	NLD	M	49	5		0	E	7.7
		Op-Td9	47	F	0	0	0	112	89	nc	NLD	F	14	1		1	E	7.5
		Op-Td10	88	M	0	0	1	207	134	+0.1	NLD	F	48	3		0	E	5.3
	Op-Td11	38	M	1	1	1	305	122	0.88	NLD	M	18	3		0	E	3.8	
	Op-Td12	38	F	nc	1	1	248	120	0.28	NLD	M	30	2		0	E	7.2	
	Op-Td13	52	F	0	1	1	125	89	nc	NLD	M	30	4		0	E	1.8	
	Op-Td14	75	M	0	2	0	304	133	0.059	NLD	nc	60	1		0	E	5.8	
	Op-Td15	46	M	1	0	0	333	84	0.66	NLD	F	8	4		0	E	14.9	
	Op-Td16	25	M	1	1	1	184	132	nc	NLD	M	21	3		0	E	8.4	
	Op-Td17	42	M	0	0	0	128	114	0.03	LD	M	38	0		0	E	3.7	
	Op-Td18	81	M	0	0	1	213	151	nc	NLD	F	40	3		0	E	5.4	

Group	BBMC case	ID	Recipient age (years)	Recipient gender	Previous episode of acute rejection	Lymphoma status, grade	Episode of acute infection (CMV, EBV, HB)	Time between graft and analysis (months)	Creatinine (µmol/L)	Proteinuria (g/24h)	Non Living Donor (NLD) / Living Donor (LD)	Donor gender	Donor age	Number of HLA mismatches	Immunosuppressive treatment	Previous transplantation	Graft	Time between immunosuppression with dialysis and analysis (years)
STA	Tand E lymphocyte analysis	STA 21	57	M	1	0	0	177	78	0.04	NLD	F	20	5	FK506	0	K	
		STA 22	62	M	0	1	0	118	118	0.00	NLD	F	52	3	CSA+MPA	0	K	
		STA 23	69	F	0	0	0	141	53	0.05	nd	nd	nd	nd	FK506	0	K	
		STA 24	53	M	0	0	1	54	120	0.14	NLD	NA	44	3	CSA+MPA+CS	0	K	
		STA 25	68	F	0	0	0	58	80	0.08	NLD	NA	58	4	FK506	0	K	
		STA 26	60	M	1	1	0	161	128	0.14	NLD	NA	57	2	FK506	0	K	
		STA 27	67	M	0	1	0	142	84	0.04	NLD	NA	31	2	Sirolimus	0	K	
		STA 28	55	M	0	0	1	164	78	0.4	NLD	NA	52	4	CSA+MPA	0	K	
		STA 29	50	F	0	0	0	129	101	0.11	NLD	NA	26	6	FK506	0	K	
		STA 30	57	M	0	0	0	210	142	0.05	NLD	NA	32	3	CSA+CS	0	K	
		STA 31	48	F	1	0	0	393	303	0.09	NLD	NA	23	4	FK	0	K	
		STA 32	60	M	1	0	0	161	184	0.41	NLD	F	44	2	FK506	0	K	
		STA 33	77	M	0	1	0	128	87	0.04	NLD	NA	48	3	CSA+MPA	0	K	
		STA 34	62	F	0	0	0	192	102	0.00	NLD	F	28	2	AZA	0	K	
Op-to	Tand E lymphocyte analysis	Op-to11	35	F	0	0	1	389	80	0.02	LD	F	16	0		0	K	8.3
		Op-to11	30	M	1	1	1	205	122	0.03	NLD	nd	18	3		0	K	3.0
		Op-to16	62	M	0	0	1	265	385	0.07	NLD	NA	17	4		0	K	8.3
		Op-to12	35	F	nd	1	1	248	120	0.28	NLD	NA	30	2		0	K	7.2
		Op-to10	80	M	0	0	1	287	134	0	NLD	F	48	3		0	K	5.2
Liver-to-L after resection	qPCR	Liv-to1	64	M	nd	0	nd	173	nd	nd	NLD	nd	nd	nd		0	L	3.0
		Liv-to2	20	M	nd	0	nd	74	nd	nd	NLD	nd	nd	nd		0	L	3.2
		Liv-to3	53	M	nd	0	nd	281	nd	nd	NLD	nd	nd	nd		0	L	1.0
		Liv-to4	53	M	nd	0	nd	177	nd	nd	NLD	nd	nd	nd		0	L	1.0
		Liv-to5	49	M	nd	0	nd	159	nd	nd	NLD	nd	nd	nd		0	L	6.0
		Liv-to6	58	M	nd	0	nd	56	nd	nd	NLD	nd	nd	nd		0	L	1.0
		Liv-to7	57	M	nd	0	nd	46	nd	nd	NLD	nd	nd	nd		0	L	1.0
		Liv-to8	62	M	nd	0	nd	113	nd	nd	NLD	nd	nd	nd		0	L	6.0
		Liv-to9	62	M	1	0	0	214	104.08	nd	NLD	nd	nd	nd		0	L	1.0
		Liv-to10	66	M	0	0	0	222	120.74	nd	NLD	nd	nd	nd		0	L	1.0
		Liv-to11	71	M	1	0	0	192	104.312	nd	NLD	NA	31	3		0	L	1.0
		Liv-to12	69	M	0	0	0	94	390.64	nd	NLD	NA	48	4		0	L	1.0
		Liv-to13	74	M	1	0	0	129	105.194	nd	NLD	NA	45	3		0	L	1.0
Liv-to14	75	M	1	0	0	108	88.3	nd	NLD	F	82	8		0	L	1.0		
Liv-to15	65	M	0	0	0	122	192.4	nd	NLD	nd	nd	nd		0	L	1.0		
Liv-to18	53	M	1	0	0	128	106.08	nd	NLD	F	78	3		0	L	1.0		
Liver-to-L before resection	qPCR	Liv-to1	59	M	1	0	0	192	104.964	nd	NLD	nd	44	nd	CSA	0	L	
		Liv-to2	69	M	1	0	0	178	103.984	nd	NLD	NA	31	5	CSA	0	L	
		Liv-to3	37	M	0	0	0	53	74.024	nd	NLD	F	41	nd	CSA	0	L	
		Liv-to4	68	F	0	0	0	54	124.644	nd	LD	F	31	4	FK506	0	L	
		Liv-to5	55	M	1	0	1	36	148.744	nd	NLD	NA	47	4	FK506	0	L	
		Liv-to6	39	M	1	0	0	142	95.472	nd	NLD	F	42	6	MPA	0	L	
		Liv-to7	70	M	0	0	0	120	44.2	nd	NLD	F	51	8	MPA	0	L	
		Liv-to8	61	M	0	0	0	164	131.316	nd	NLD	nd	76	nd	Atorvastatin	0	L	
		Liv-to9	48	M	0	0	0	36	68.008	nd	NLD	F	84	8	FK	0	L	
		Liv-to10	67	M	1	0	1	113	108.192	nd	NLD	F	42	5	FK	0	L	
Liv-to11	27	M	0	0	0	91	108.252	nd	NLD	NA	18	4	MPA	0	L			

nd: not determined

NLD: Non Living Donor
LD: Living Donor

CSA: cyclosporine A
MPA: Mycophenolic acid
FK: tacrolimus
CS: Calcineurin

K: Kidney
L: Liver

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Supplementary table 2

Assay	HV_t0	HV_t24h	dCq_HV_t0	dCq_HV_t24h	FC	log2(FC)
hsa-miR-874-4395379	25.7	33.2	3.07	8.81	0.02	-5.74
hsa-miR-431-4395173	25.3	32.4	2.58	7.97	0.02	-5.39
hsa-miR-517a-4395513	26.4	33.1	3.77	8.66	0.03	-4.90
hsa-miR-545-4395378	24.9	31.0	2.26	6.58	0.05	-4.32
hsa-miR-503-4373228	25.8	31.2	3.17	6.83	0.08	-3.66
hsa-miR-323-3p-4395338	25.7	27.9	0.58	4.09	0.09	-3.51
hsa-miR-455-3p-4395355	28.7	33.9	6.00	9.51	0.09	-3.51
hsa-miR-509-3-5p-4395266	29.8	34.8	7.18	10.38	0.11	-3.20
hsa-miR-542-5p-4395351	25.2	30.1	2.52	5.67	0.11	-3.15
hsa-miR-200a-4378069	24.2	29.0	1.50	4.58	0.12	-3.08
hsa-miR-506-4373231	26.6	31.3	3.98	6.92	0.13	-2.95
hsa-miR-199b-5p-4373100	28.2	32.8	5.49	8.42	0.13	-2.93
hsa-miR-651-4381007	28.7	32.7	5.98	8.34	0.19	-2.36
hsa-miR-15a-4373123	21.6	25.6	-1.10	1.20	0.20	-2.30
hsa-miR-889-4395313	26.4	30.3	3.69	5.92	0.21	-2.23
hsa-miR-450b-5p-4395318	26.4	30.4	3.72	5.96	0.21	-2.23
hsa-miR-758-4395180	26.0	29.8	3.30	5.41	0.23	-2.11
hsa-miR-590-5p-4395176	17.6	21.4	-5.11	-3.01	0.23	-2.10
hsa-miR-138-4395395	23.5	25.2	0.57	2.67	0.23	-2.09
hsa-miR-370-4395386	22.7	26.5	0.06	2.09	0.24	-2.03
hsa-miR-654-3p-4395350	28.9	32.7	6.26	8.26	0.25	-2.00
hsa-miR-409-5p-4395442	31.3	35.0	8.60	10.58	0.25	-1.98
hsa-miR-326-4373050	29.1	32.8	6.46	8.44	0.25	-1.98
hsa-miR-190-4373110	27.8	31.4	5.14	7.02	0.27	-1.87
hsa-miR-29b-4373288	21.2	24.8	-1.45	0.39	0.28	-1.84
hsa-miR-141-4373137	24.0	27.0	-10.01	-8.23	0.29	-1.78
hsa-miR-142-3p-4373136	12.7	16.2	-3.55	-1.83	0.30	-1.72
hsa-miR-301b-4395503	23.6	27.1	0.97	2.68	0.30	-1.71
hsa-miR-486-3p-4395204	26.1	29.5	3.46	5.11	0.32	-1.65
hsa-miR-147b-4395373	30.8	34.2	8.16	9.79	0.32	-1.63
hsa-miR-134-4373299	24.2	27.4	5.24	6.85	0.33	-1.61
hsa-miR-376c-4395233	20.8	24.2	-1.84	-0.23	0.33	-1.61
hsa-miR-133b-4395358	26.1	29.3	1.48	3.01	0.35	-1.53
hsa-miR-376a-4373026	21.0	24.2	-1.71	-0.21	0.35	-1.51
hsa-miR-672-4395438	28.2	31.5	5.56	7.06	0.35	-1.50
hsa-miR-133a-4395357	20.7	22.3	3.44	4.92	0.36	-1.48
hsa-miR-338-3p-4395363	25.3	28.4	2.64	4.03	0.38	-1.39
hsa-miR-340-4395369	18.9	22.0	-3.82	-2.44	0.39	-1.37
hsa-miR-199a-5p-4373272	25.0	28.0	2.29	3.64	0.39	-1.35

8

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

hsa-miR-452-4395440	25.0	28.1	2.37	3.71	0.39	-1.34
hsa-miR-301a-4373064	19.8	22.8	-2.87	-1.59	0.41	-1.29
hsa-miR-570-4395458	30.4	33.4	7.77	9.04	0.41	-1.27
hsa-miR-324-5p-4373052	21.8	24.8	-0.84	0.42	0.42	-1.26
hsa-miR-493-4395475	26.7	29.7	4.07	5.33	0.42	-1.26
hsa-miR-140-5p-4373374	15.7	18.1	1.37	2.60	0.42	-1.24
hsa-miR-223-4395406	10.1	10.8	-2.47	-1.23	0.43	-1.23
hsa-miR-382-4373019	22.7	25.7	0.06	1.29	0.43	-1.23
hsa-miR-616-4395525	27.4	30.3	4.68	5.87	0.44	-1.19
hsa-miR-27b-4373068	20.5	23.3	-2.21	-1.06	0.45	-1.16
hsa-miR-597-4380960	26.6	29.5	3.94	5.07	0.46	-1.12
hsa-miR-411-4381013	22.7	25.6	0.07	1.19	0.46	-1.11
hsa-miR-361-5p-4373035	22.4	25.2	-0.27	0.83	0.46	-1.11
hsa-miR-509-5p-4395346	25.9	28.7	3.24	4.34	0.47	-1.10
hsa-miR-100-4373160	23.7	25.0	-1.67	-0.60	0.48	-1.07
hsa-miR-455-5p-4378098	29.2	32.0	6.51	7.55	0.48	-1.05
hsa-miR-618-4380996	24.2	27.0	1.57	2.61	0.49	-1.04
hsa-miR-345-4395297	18.4	21.2	-4.23	-3.20	0.49	-1.03
hsa-miR-27a-4373287	17.7	20.5	-4.95	-3.92	0.49	-1.03
hsa-miR-218-4373081	27.0	29.7	4.29	5.31	0.49	-1.02
hsa-miR-215-4373084	26.6	29.4	3.96	4.96	0.50	-0.99
hsa-miR-369-5p-4373195	30.3	33.0	7.67	8.61	0.52	-0.94
hsa-miR-204-4373094	25.0	27.6	2.29	3.23	0.52	-0.94
hsa-miR-142-5p-4395359	19.1	22.6	-0.92	0.01	0.53	-0.93
hsa-miR-486-5p-4378096	24.7	27.3	1.99	2.91	0.53	-0.91
hsa-miR-502-5p-4373227	26.4	29.0	3.72	4.63	0.53	-0.91
hsa-miR-148a-4373130	20.7	23.4	-1.95	-1.04	0.53	-0.91
hsa-miR-193a-3p-4395361	30.0	32.6	7.34	8.23	0.54	-0.89
hsa-miR-335-4373045	19.5	22.0	-3.22	-2.38	0.56	-0.83
hsa-miR-128-4395327	22.2	24.3	-3.35	-2.53	0.56	-0.82
hsa-miR-487b-4378102	24.0	26.5	1.30	2.08	0.58	-0.78
hsa-miR-548d-3p-4381008	27.9	30.3	5.18	5.95	0.59	-0.77
hsa-miR-598-4395179	21.2	23.7	-1.50	-0.74	0.59	-0.76
hsa-miR-143-4395360	21.8	24.4	2.51	3.23	0.61	-0.72
hsa-miR-655-4381015	27.2	29.6	4.49	5.20	0.61	-0.71
hsa-miR-433-4373205	25.0	27.5	2.37	3.07	0.62	-0.70
hsa-let-7a-4373169	18.0	20.4	-4.71	-4.04	0.63	-0.67
hsa-miR-194-4373106	20.7	23.1	-2.01	-1.34	0.63	-0.67
hsa-miR-224-4395210	22.9	25.2	0.18	0.81	0.65	-0.62
hsa-miR-199a-3p-4395415	16.6	18.9	-6.11	-5.49	0.65	-0.62
hsa-miR-140-3p-4395345	20.4	21.8	-6.92	-6.30	0.65	-0.62
hsa-miR-337-5p-4395267	27.4	29.7	4.73	5.33	0.66	-0.61

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

hsa-miR-125b-4373148	22.4	22.4	-10.21	-9.63	0.67	-0.58
hsa-miR-379-4373349	23.9	26.1	1.19	1.73	0.68	-0.55
hsa-miR-508-3p-4373233	24.0	26.2	1.30	1.85	0.68	-0.55
hsa-miR-320-4395388	16.0	16.6	3.00	3.53	0.69	-0.53
hsa-let-7f-4373164	20.2	22.4	-2.49	-1.98	0.70	-0.52
hsa-miR-106a-4395280	13.2	13.2	-6.00	-5.50	0.71	-0.50
hsa-miR-625-4395542	22.2	24.4	-0.47	0.03	0.71	-0.50
hsa-miR-451-4373360	21.4	23.7	-1.24	-0.74	0.71	-0.50
hsa-miR-185-4395382	19.7	21.9	-2.98	-2.49	0.71	-0.49
hsa-miR-362-3p-4395228	24.2	26.4	1.52	1.99	0.72	-0.47
hsa-miR-330-5p-4395341	28.6	30.8	5.95	6.42	0.72	-0.47
hsa-miR-627-4380967	27.5	29.7	4.82	5.28	0.73	-0.46
hsa-miR-429-4373203	27.1	29.3	4.43	4.89	0.73	-0.46
hsa-miR-145-4395389	20.4	22.5	-2.30	-1.86	0.74	-0.44
hsa-miR-542-3p-4378101	26.7	28.9	4.06	4.49	0.74	-0.43
hsa-miR-410-4378093	23.8	25.9	1.08	1.51	0.74	-0.43
hsa-miR-152-4395170	20.9	23.0	-1.77	-1.39	0.76	-0.39
hsa-miR-127-3p-4373147	22.1	23.8	-0.48	-0.11	0.77	-0.37
hsa-miR-10a-4373153	23.9	25.0	9.72	10.09	0.77	-0.37
hsa-miR-424-4373201	26.0	28.1	3.33	3.70	0.78	-0.37
hsa-miR-374a-4373028	15.1	17.1	-7.61	-7.25	0.78	-0.36
hsa-miR-487a-4378097	30.4	32.4	7.68	8.04	0.78	-0.36
hsa-miR-579-4395509	24.9	27.0	2.28	2.63	0.78	-0.36
hsa-miR-888-4395323	27.2	29.3	4.58	4.92	0.79	-0.35
hsa-miR-708-4395452	21.4	23.5	-1.23	-0.89	0.79	-0.34
hsa-miR-505-4395200	25.0	27.0	2.29	2.62	0.79	-0.33
hsa-miR-744-4395435	17.7	19.7	-4.97	-4.66	0.81	-0.31
hsa-miR-381-4373020	30.5	32.5	7.84	8.12	0.83	-0.27
hsa-miR-192-4373108	19.3	21.3	-3.40	-3.13	0.83	-0.26
hsa-miR-214-4395417	29.9	31.9	7.24	7.47	0.85	-0.24
hsa-miR-495-4381078	23.2	25.1	0.49	0.70	0.86	-0.21
hsa-miR-339-3p-4395295	20.4	22.3	-2.27	-2.08	0.88	-0.19
hsa-miR-106b-4373155	16.7	18.9	0.60	0.79	0.88	-0.18
hsa-miR-660-4380925	19.1	21.0	-3.59	-3.41	0.88	-0.18
hsa-miR-22-4373079	20.2	23.2	-4.69	-4.51	0.89	-0.17
hsa-miR-98-4373009	21.7	23.6	-0.93	-0.76	0.89	-0.17
hsa-miR-523-4395497	27.2	29.1	4.55	4.71	0.89	-0.16
hsa-miR-181a-4373117	18.8	20.7	-3.86	-3.71	0.90	-0.15
hsa-miR-139-3p-4395424	23.2	27.1	-4.95	-4.80	0.90	-0.15
hsa-miR-196b-4395326	23.2	25.1	0.55	0.69	0.90	-0.15
hsa-miR-539-4378103	21.9	23.7	-0.81	-0.68	0.91	-0.14
hsa-miR-21-4373090	15.5	16.7	0.38	0.49	0.92	-0.11
hsa-miR-628-5p-4395544	19.9	21.7	-2.80	-2.70	0.94	-0.10
hsa-miR-422a-4395408	24.2	26.0	1.54	1.63	0.94	-0.08
hsa-miR-182-4395445	26.8	28.6	4.12	4.20	0.95	-0.08

10

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

hsa-miR-210-4373089	23.0	24.9	4.22	4.29	0.95	-0.07
hsa-miR-501-5p-4373226	23.3	25.1	0.64	0.68	0.97	-0.04
hsa-let-7g-4395393	15.2	17.0	-7.48	-7.45	0.98	-0.03
hsa-miR-19a-4373099	16.7	18.5	-5.94	-5.91	0.98	-0.03
hsa-miR-181c-4373115	25.0	26.8	2.35	2.37	0.99	-0.02
hsa-miR-29c-4395171	17.1	18.8	-5.56	-5.55	1.00	0.00
hsa-miR-99a-4373008	23.2	24.9	0.48	0.47	1.01	0.01
hsa-miR-329-4373191	30.2	31.9	7.54	7.52	1.02	0.02
hsa-miR-26a-4395166	14.2	15.9	-8.46	-8.48	1.02	0.02
hsa-miR-485-3p-4378095	24.4	26.1	1.70	1.67	1.02	0.03
hsa-miR-101-4395364	21.0	23.8	-3.97	-4.01	1.03	0.04
hsa-miR-132-4373143	18.7	17.5	-2.01	-2.06	1.04	0.05
hsa-miR-137-4373301	31.0	29.8	0.84	0.77	1.05	0.07
hsa-miR-454-4395434	16.1	17.7	-6.59	-6.67	1.06	0.08
hsa-miR-126-4395339	12.5	14.8	-0.53	-0.62	1.07	0.10
hsa-miR-195-4373105	18.0	19.6	-4.69	-4.79	1.07	0.10
hsa-miR-532-5p-4380928	18.9	20.6	-3.72	-3.84	1.09	0.12
hsa-miR-92a-4395169	16.5	16.2	-6.30	-6.43	1.10	0.13
hsa-miR-30b-4373290	14.2	15.8	-8.46	-8.59	1.10	0.13
hsa-miR-489-4395469	28.4	30.0	5.75	5.60	1.11	0.15
hsa-miR-362-5p-4378092	22.1	23.6	-0.58	-0.75	1.13	0.17
hsa-miR-16-4373121	12.4	13.9	-10.26	-10.45	1.14	0.19
hsa-miR-30c-4373060	14.6	16.1	-8.05	-8.25	1.15	0.20
hsa-miR-652-4395463	18.6	20.2	-4.04	-4.25	1.15	0.21
hsa-let-7d-4395394	18.1	19.6	-4.53	-4.75	1.16	0.22
hsa-miR-328-4373049	19.1	20.6	-3.61	-3.84	1.17	0.23
hsa-let-7c-4373167	23.2	24.6	0.48	0.25	1.17	0.23
hsa-miR-885-5p-4395407	24.5	26.0	1.85	1.62	1.18	0.23
hsa-miR-374b-4381045	15.5	17.0	-7.12	-7.36	1.18	0.24
hsa-miR-548d-5p-4395348	28.4	29.8	5.69	5.45	1.19	0.25
hsa-miR-186-4395396	15.5	17.0	-7.16	-7.40	1.19	0.25
hsa-miR-28-5p-4373067	19.1	20.6	-3.57	-3.82	1.19	0.25
hsa-let-7b-4395446	18.1	19.6	-4.54	-4.82	1.22	0.28
hsa-miR-148b-4373129	23.1	24.6	0.44	0.16	1.22	0.28
hsa-miR-26b-4395167	16.0	17.4	-6.71	-7.00	1.23	0.29
hsa-miR-34a-4395168	22.1	23.6	-0.55	-0.85	1.23	0.30
hsa-miR-494-4395476	23.7	25.1	1.02	0.70	1.25	0.32
hsa-miR-15b-4373122	16.2	17.7	-6.43	-6.74	1.25	0.32
hsa-miR-139-5p-4395400	17.7	19.6	-2.31	-2.63	1.25	0.32
hsa-miR-197-4373102	18.3	19.7	-4.35	-4.72	1.29	0.37
hsa-miR-18a-4395533	20.3	21.7	-2.37	-2.75	1.30	0.38
hsa-miR-502-3p-4395194	24.4	25.8	1.77	1.38	1.31	0.39
hsa-miR-339-5p-4395368	20.4	21.7	-2.26	-2.65	1.32	0.40
hsa-miR-425-4380926	18.6	19.9	-4.10	-4.50	1.32	0.40

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

hsa-miR-484-4381032	13.5	14.8	-9.17	-9.58	1.33	0.41
hsa-miR-548c-5p-4395540	28.4	29.7	5.76	5.35	1.33	0.41
hsa-miR-31-4395390	17.8	19.1	-4.89	-5.34	1.36	0.44
hsa-miR-342-5p-4395258	22.0	23.3	-0.70	-1.15	1.36	0.44
hsa-miR-629-4395547	26.1	27.3	3.38	2.93	1.37	0.45
hsa-miR-200b-4395362	23.6	24.8	0.89	0.44	1.37	0.45
hsa-miR-1-4395333	25.2	27.6	1.02	0.56	1.37	0.45
hsa-miR-574-3p-4395460	17.4	18.7	-5.24	-5.70	1.37	0.46
hsa-miR-130a-4373145	19.3	21.9	-1.80	-2.27	1.39	0.47
hsa-miR-450a-4395414	28.1	29.4	5.46	4.96	1.41	0.49
hsa-miR-331-3p-4373046	16.4	17.6	-6.26	-6.76	1.42	0.50
hsa-miR-363-4378090	23.5	24.7	0.80	0.29	1.42	0.51
hsa-miR-212-4373087	23.2	22.5	-7.16	-7.67	1.43	0.51
hsa-miR-149-4395366	25.7	26.9	2.99	2.47	1.44	0.52
hsa-miR-191-4395410	12.2	13.4	-10.47	-11.00	1.44	0.53
hsa-miR-423-5p-4395451	22.4	23.6	-0.24	-0.81	1.48	0.56
hsa-miR-324-3p-4395272	21.0	22.1	-1.72	-2.28	1.48	0.57
hsa-miR-95-4373011	20.8	22.0	-1.85	-2.43	1.49	0.58
hsa-miR-500-4395539	23.0	24.1	0.32	-0.28	1.52	0.60
hsa-let-7e-4395517	15.1	16.2	-7.61	-8.24	1.55	0.63
hsa-miR-146b-5p-4373178	12.4	13.5	-10.23	-10.87	1.56	0.64
hsa-miR-18b-4395328	24.5	25.5	1.79	1.13	1.58	0.66
hsa-miR-532-3p-4395466	19.2	20.3	-3.49	-4.14	1.58	0.66
hsa-miR-25-4373071	18.9	19.9	-3.80	-4.48	1.60	0.68
hsa-miR-107-4373154	23.3	25.2	1.27	0.58	1.61	0.69
hsa-miR-491-5p-4381053	21.9	22.9	-0.79	-1.50	1.63	0.71
hsa-miR-19b-4373098	12.8	13.7	-9.89	-10.67	1.72	0.78
hsa-miR-342-3p-4395371	12.8	13.7	-9.92	-10.70	1.72	0.78
hsa-miR-24-4373072	13.3	14.3	-9.33	-10.14	1.76	0.82
hsa-miR-23a-4373074	27.0	27.9	4.33	3.51	1.77	0.82
hsa-miR-200c-4395411	20.0	20.9	-2.64	-3.49	1.81	0.85
hsa-miR-28-3p-4395557	17.6	18.5	-5.06	-5.92	1.82	0.87
hsa-miR-330-3p-4373047	24.5	25.3	1.78	0.88	1.87	0.91
hsa-miR-20a-4373286	14.0	14.8	-8.70	-9.65	1.93	0.95
hsa-miR-589-4395520	27.7	28.4	4.98	4.00	1.97	0.98
hsa-miR-518f-4395499	25.1	25.8	2.43	1.45	1.98	0.98
hsa-miR-20b-4373263	17.0	17.7	-5.69	-6.73	2.06	1.04
hsa-miR-642-4380995	22.6	23.3	-0.07	-1.14	2.10	1.07
hsa-miR-222-4395387	12.6	12.8	-12.55	-13.62	2.11	1.08
hsa-miR-32-4395220	23.2	28.5	-6.68	-7.78	2.14	1.10
hsa-miR-671-3p-4395433	22.3	22.9	-0.32	-1.48	2.23	1.16
hsa-miR-146a-4373132	12.1	12.6	-10.62	-11.78	2.23	1.16
hsa-miR-576-3p-4395462	25.1	25.6	2.42	1.24	2.28	1.19

12

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

hsa-miR-365-4373194	22.4	22.8	-0.26	-1.57	2.47	1.31
hsa-miR-203-4373095	26.9	27.2	4.20	2.84	2.58	1.37
hsa-miR-331-5p-4395344	27.7	28.1	5.04	3.66	2.60	1.38
hsa-miR-150-4373127	10.2	10.6	-12.43	-13.81	2.61	1.38
RNU48-4373383	11.7	12.0	-10.99	-12.39	2.64	1.40
hsa-miR-221-4373077	18.0	19.9	-10.09	-11.60	2.85	1.51
hsa-miR-17-4395419	13.1	13.3	-9.57	-11.11	2.90	1.54
hsa-miR-29a-4395223	13.7	13.9	-8.99	-10.55	2.94	1.56
RNU44-4373384	15.0	15.1	-7.69	-9.29	3.02	1.60
hsa-miR-103-4373158	18.7	20.4	-9.51	-11.15	3.11	1.64
MammU6-4395470	11.5	11.6	-11.16	-12.80	3.12	1.64
hsa-miR-296-5p-4373066	24.9	25.0	2.22	0.57	3.14	1.65
hsa-miR-125a-3p-4395310	29.4	26.8	-3.47	-5.18	3.29	1.72
hsa-miR-125a-5p-4395309	19.2	19.2	-0.29	-2.02	3.32	1.73
hsa-miR-205-4373093	33.7	33.6	10.99	9.23	3.37	1.75
hsa-miR-99b-4373007	22.0	22.0	-0.65	-2.42	3.41	1.77
hsa-miR-876-3p-4395336	30.8	30.7	8.10	6.31	3.44	1.78
hsa-miR-219-1-3p-4395206	30.3	30.2	7.68	5.84	3.58	1.84
hsa-miR-135a-4373140	27.9	31.3	3.90	1.92	3.94	1.98
hsa-miR-193b-4395478	19.3	19.0	-3.37	-5.36	3.98	1.99
hsa-miR-202-4395474	29.7	29.5	7.07	5.08	3.98	1.99
hsa-miR-576-5p-4395461	32.1	31.8	9.45	7.43	4.04	2.01
hsa-miR-9-4373285	23.6	21.9	-6.16	-8.19	4.10	2.04
hsa-miR-367-4373034	33.2	32.8	10.53	8.43	4.28	2.10
hsa-miR-193a-5p-4395392	23.0	22.6	0.33	-1.79	4.34	2.12
hsa-miR-146b-3p-4395472	24.6	24.1	1.88	-0.25	4.39	2.13
hsa-miR-449b-4381011	29.7	29.2	6.98	4.84	4.42	2.14
hsa-miR-548a-5p-4395523	33.5	32.8	10.84	8.45	5.25	2.39
hsa-miR-211-4373088	26.9	28.7	0.53	-1.87	5.30	2.41
hsa-miR-636-4395199	26.2	25.4	3.57	1.03	5.79	2.53
hsa-miR-184-4373113	29.3	28.3	6.58	3.85	6.64	2.73
hsa-miR-886-5p-4395304	23.7	22.6	1.08	-1.81	7.40	2.89
hsa-miR-135b-4395372	26.6	26.3	8.33	5.38	7.71	2.95
hsa-miR-130b-4373144	20.9	22.1	-3.93	-6.90	7.84	2.97
hsa-miR-548b-5p-4395519	30.6	29.1	7.92	4.67	9.52	3.25
hsa-miR-449a-4373207	28.9	27.3	6.24	2.90	10.10	3.34
hsa-miR-93-4373302	16.4	18.0	0.88	-2.49	10.33	3.37
hsa-miR-511-4373236	29.0	27.0	6.37	2.58	13.89	3.80
hsa-miR-518b-4373246	34.4	32.3	11.71	7.89	14.07	3.81

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

hsa-miR-519d-4395514	33.2	30.8	10.51	6.38	17.57	4.13
hsa-miR-124-4373295	32.4	34.5	6.68	2.42	19.17	4.26
has-miR-155-4395459	29.0	25.9	6.28	1.54	26.76	4.74
hsa-miR-187-4373307	29.7	26.6	6.99	2.20	27.58	4.79
hsa-miR-483-5p-4395449	28.1	24.5	5.38	0.13	38.05	5.25
hsa-miR-886-3p-4395305	28.3	24.2	5.59	-0.19	54.78	5.78

For Peer Review

III/ Résultats de l'étude 3

miR-142-5p over-expression in blood and kidney graft from patients exhibiting chronic antibody mediated rejection

Richard Danger, Amélie Lavault, Magali Giral, Jean-Paul Duong Van Huyen, Yohann Foucher, Annaïck Pallier, Nicolas Degauque, Jean-Paul Soullillou and Sophie Brouard

Résumé du poster présenté à l'ATC 2011-Philadelphie :

Chronic antibody mediated rejection (CAMR) is characterized by specific histopathological lesions described by the BANFF classification and progressive but irreversible degradation of the kidney function despite immunosuppressive regimens. Gene expression modifications have been reported in organ biopsies as well as peripheral blood from transplanted recipients with CAMR which implicate *de facto* mechanisms of gene expression regulation during this process. Among gene expression regulating molecules, microRNA (miARN), small non-coding RNA, have been clearly shown to be involved in various biological mechanisms and diseases. We performed miARN expression profiling of 381 miARN using Taqman low density arrays in total RNA from peripheral blood mononuclear cells from 9 patients with CAMR and 10 recipients with stable graft function (STA). Among the 231 miARN expressed in at least half of samples for each groups, we highlighted on the differential expression of several miARN involved in immune response including miR-142-5p, with a Mann-Whitney test corrected with a multitesting procedure. miR-142-5p over-expression was confirmed with individual qPCR assays on same PBMC samples (9 CAMR and 10 STA) and furthermore validated with 20 independent PBMC samples (10 CAMR or suspicious CAMR and 10 STA). We could not demonstrate a difference of miR-142-5p expression in PBMC from non-transplanted patients with terminal renal failure suggesting that the modulation of miR-142-5p in patients with CAMR is not due to renal dysfunction but rather related to immunological mechanisms. Moreover, miR-142-5p was also increased in biopsies from 5 CAMR patients compared to biopsies from 8 STA patients with normal histology. Altogether, these data suggest that miR-142-5p could be a biomarker of CAMR and may improve our understanding of chronic rejection mechanisms after transplantation.

Poster présenté à l'ATC 2011-Philadelphie :



Inserm
U643

miR-142-5p over-expression in blood and kidney graft from patients exhibiting chronic antibody mediated rejection



institut
transplantation
urologie
néphrologie
INSERM U643

Richard Danger^{1,2}, Amélie Lavault¹, Magali Giral^{1,3}, Jean-Paul Duong Van Huyen¹, Yohann Foucher², Annaïck Pallier¹, Nicolas Degauque¹, Jean-Paul Soullillou^{1,2,3} and Sophie Brouard¹

1-Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale INSERM U643, and Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation I.T.E.R.T., Nantes, F-44093 France. 2-Université de NANTES, Faculté de médecine, Nantes, F-44000 France. 3 Centre Hospitalier Universitaire Hôtel Dieu Nantes, Nantes, F-44000 France. 4-Hôpital Européen Georges Pompidou, Paris, F-75015 France.

Objectives

Chronic antibody mediated rejection (CAMR) is characterized by a progressive but irreversible degradation of the kidney function despite immunosuppressive regimens. The identification of molecular markers of CAMR would be beneficial to adjust treatment the earlier in order to limit graft injuries, but described biomarkers have to be validated on large cohorts of patients.

Among gene expression regulating molecules, **microRNA (miRNA)**, small non-coding RNA, have been clearly shown to be involved in various biological mechanisms and diseases.

We decided **to investigate their possible implication and diagnostic use in CAMR.**

Patients & Methods

We performed **miRNA expression profiling** of 381 miRNA using Taqman low density arrays in total RNA from PBMC from:

- 9 patients with CAMR,
- 10 recipients with long-term stable graft function (STA).

miR-142-5p expression was measured by qPCR using individual Taqman miRNA assay in total RNA from PBMC from:

- 19 patients with CAMR,
- 20 STA recipients,
- 11 patients with acute rejection episode (ARE),
- 10 untransplanted patients with renal dysfunction (RF).

Recipients were classified according to the updated 2009 Banff classification criteria (Sis *et al.* 2010).

Results

We highlighted **10-top ranked differential miRNA** (figure 1) among the 231 miRNA expressed in at least half of samples for CAMR and STA groups, using a Mann-Whitney test corrected with a multitest procedure.

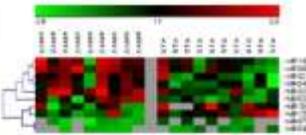


Figure 1: Heatmap of the 10-top ranked differential miRNA

ROC curve analysis of these measures together indicates a good discrimination among the patients with an area under the curve of 0.76 ± 0.08 ($p=0.006$) (figure 2).

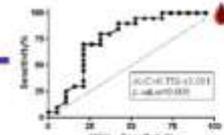


Figure 2: ROC curve for miR-142-5p between all listed CAMR and STA samples

No increase of miR-142-5p expression was observed in PBMC from STA patients, patients with acute rejection episode (ARE) and untransplanted patients with renal dysfunction (RF) (figure 3).

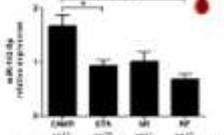


Figure 3: miR-142-5p expression in PBMC from 19 CAMR, 20 STA, 11 ARE and 10 RF

Increase expression of miR-142-5p in biopsies was observed from patients with CAMR lesions compared to patients with no evidence of histological lesions ($p=0.101$; figure 4), as previously reported in biopsies from renal transplanted patients with ARE (Anglicheau *et al.* 2009).

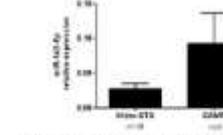


Figure 4: miR-142-5p expression in biopsies without or with histological proven CAMR lesions

Conclusion

We highlighted the **over-expression of miR-142-5p in blood and kidney graft from patients exhibiting chronic antibody mediated rejection compared to recipients with stable graft function.**

We could not observe any difference of miR-142-5p expression in PBMC from STA compared to non-transplanted patients with terminal renal failure, suggesting that the modulation of miR-142-5p in patients with CAMR is not due to renal dysfunction but rather related to immunological mechanisms. Similarly, we did not observe any increase of miR-142-5p expression in PBMC from patients with acute rejection episode.

Altogether, these data suggest that miR-142-5p could be a biomarker of CAMR and may improve our understanding of chronic rejection mechanisms. Ongoing investigations on miR-142-5p gene targets may bring us better understood of the role of this miRNA in CAMR.

INSERM U643 - ITUN

CHU Jean Monnet
30, Boulevard Jean Monnet
44 093 Nantes Cedex
<http://www.lfr26.nantes.inserm.fr/ITERT/>

Contact :

Richard Danger
E-mail : richard.danger@nantes.inserm.fr
Tel. +33 (0)2 40 08 75 65
Fax +33 (0)2 40 08 74 11

Work supported by :



Discussion générale

Les dernières études concernant la tolérance opérationnelle dans le cadre de la transplantation rénale montrent une implication des lymphocytes B chez ces patients (Newell, *et al.* 2010; Louis, *et al.* 2006; Sagoo, *et al.* 2010; Pallier, *et al.* 2010; Lozano, *et al.* 2011; Brouard, *et al.* 2007). Ainsi, ces études montrent une augmentation en valeur absolue du nombre des lymphocytes B totaux, et plus particulièrement des lymphocytes B naïfs, mémoires et transitionnels chez les patients opérationnellement tolérants par rapport aux patients stables (Newell, *et al.* 2010; Pallier, *et al.* 2010). Une des conséquences de cette augmentation est une surreprésentation des gènes reliés aux fonctions des lymphocytes B parmi l'ensemble du transcriptome des PBMC ; c'est ce qui est observé dans les 4 études transcriptomiques récentes (Newell, *et al.* 2010; Sagoo, *et al.* 2010; Pallier, *et al.* 2010; Lozano, *et al.* 2011), mais aussi dans les urines (Newell, *et al.* 2010). De plus, la mise en évidence de gènes associés à la prolifération et la survie cellulaire indique une plus grande prolifération de ces lymphocytes qui peut expliquer leur nombre plus important en périphérie. Cependant, la signature B présente aussi des caractéristiques particulières. La mise en évidence d'un profil inhibé ou inhibiteur des cellules B avec une diminution du ratio CD32a/CD32b, une augmentation du ratio BAFF/BAFFR et une augmentation de la molécule BANK1 est en faveur d'un mécanisme de régulation de ces lymphocytes B (Pallier, *et al.* 2010).

Notre étude a montré une augmentation en valeur absolue du nombre de lymphocytes B mémoires alors que Sagoo *et al.* observent une diminution de la fréquence en lymphocytes B mémoires par rapport à la population totale de lymphocytes B CD19⁺. Ces résultats ne sont pas contradictoires puisque des résultats récents de notre équipe confirment une augmentation en valeur absolue du nombre de lymphocytes B mémoires associée à une diminution de leur fréquence par rapport à la population totale de lymphocytes B, tout comme une augmentation de la fréquence en lymphocytes B naïfs (Faouzi *et al.* en préparation).

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle tolérogénique des cellules B naïves chez l'animal impliquant des mécanismes de délétion clonale et d'anergie des cellules T (Lassila, *et al.* 1988; Eynon and Parker 1992). En effet, les cellules B naïves peuvent induire l'anergie de lymphocytes T naïfs (Lassila, *et al.* 1988) et aussi mémoires (Dalai, *et al.* 2008). De plus, les descriptions de lymphocytes Breg et B10 chez l'Homme, suggèrent leur implication en transplantation, mais celle-ci n'a pas encore été démontrée (Blair, *et al.* 2010; Mauri and Ehrenstein 2008). En effet, la mise en évidence d'une augmentation du nombre de cellules CD19⁺CD1d⁺/CD19⁺CD5⁺ est en faveur d'une population B

régulatrice (Iwata, *et al.* 2010). De même, l'augmentation du nombre de lymphocytes B transitionnels CD19⁺CD38⁺CD24⁺IgD⁺ dans l'étude de Newell *et al.*, décrits comme pouvant contenir ces lymphocytes Bregs sécrétant d'IL-10 (Blair, *et al.* 2010), suggère la présence de lymphocytes B régulateurs en plus grand nombre dans le sang des patients opérationnellement tolérants. Newell *et al.* montrent que cette population de lymphocytes B transitionnels expriment plus d'IL-10 chez les patients opérationnellement tolérants que chez les patients stables renforçant l'hypothèse que des lymphocytes B régulateurs participent au phénomène de tolérance opérationnelle (Newell, *et al.* 2010). Sagoo *et al.* n'ont pas reporté de différence d'expression de TGFβ1 ni d'IL-10 par ces cellules. Cependant, puisqu'il semble que la sécrétion d'IL-10 par des lymphocytes B régulateurs est dépendante de stimuli particuliers (Iwata, *et al.* 2010), ces analyses doivent être approfondies. Par ailleurs, une meilleure caractérisation des lymphocytes B régulateurs chez l'Homme permettrait de mieux définir la population à analyser. Les différences observées entre ces études peuvent aussi être dues à une hétérogénéité dans les populations de patients étudiés. Par exemple, les patients du consortium américain ITN sont tous HLA-identiques (Newell, *et al.* 2010), le mécanisme de tolérance peut être différent de celui des patients présentant des incompatibilités HLA majoritaires dans l'étude européenne (Sagoo, *et al.* 2010) et de Nantes (Pallier, *et al.* 2010), même si dans tous les cas une signature B a été mise en évidence.

Une des limites de ces études est le nombre de patients tolérants disponibles. De par leur rareté, il est difficile d'analyser de grandes cohortes de patients, ce qui limite la validation des résultats. De plus, l'analyse de sous-populations lymphocytaires B, notamment transcriptomique, requiert un nombre minimal de lymphocytes B et le prélèvement d'un volume de sang conséquent. Les patients opérationnellement tolérants, ayant souvent arrêté leur traitement par non-observance, refusent le prélèvement sanguin. Les patients en RCHA et les patients présentant une fonction stable de leur greffon ne refusent généralement pas les prélèvements de sang, mais présentent souvent une lymphopénie consécutive aux traitements immunosuppresseurs. Ces aspects, purement pratiques, sont importants puisqu'ils limitent les possibilités d'analyses et doivent donc être pris en compte dans nos projets.

A partir de l'analyse de l'expression des miARN, nous avons mis en évidence une surexpression du miR-142-3p dans les lymphocytes B des patients opérationnellement tolérants. Ce résultat renforce l'idée d'un phénotype particulier des lymphocytes B des patients tolérants. Puisque la fonction de ce miARN dans les lymphocytes B n'est pas élucidée, nous ne pouvons conclure quant à son rôle dans la tolérance. Cependant, la possibilité d'une implication de ce miARN dans un rétrocontrôle du TGFβ1 (figure 17) renforce le caractère inhibé des lymphocytes B trouvé dans l'étude de Pallier *et al.*, car le TGFβ1 exerce, entre autres, des fonctions immunosuppressives

(Kosiewicz and Alard 2004). Une implication possible du TGF β 1 est renforcée par l'observation de la signature de 49 gènes associée à la tolérance où 27% des gènes sont reliés au TGF β 1 (Brouard, *et al.* 2007).

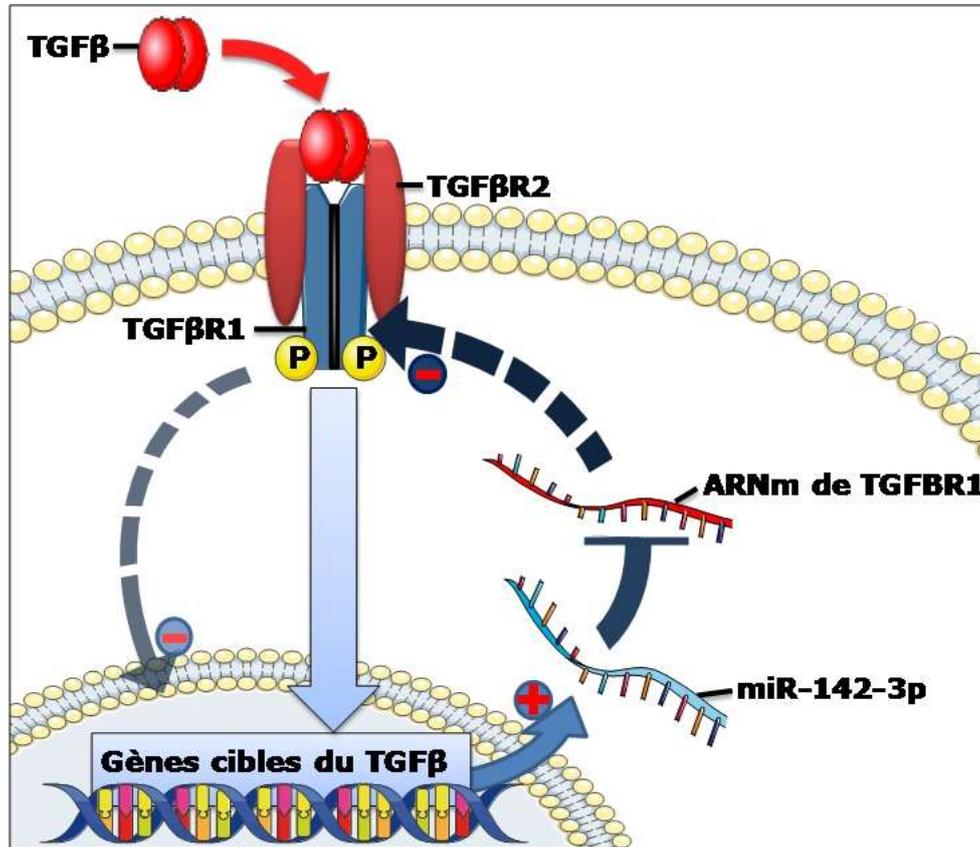


Figure 17: Hypothèse de rétrocontrôle négatif de la signalisation du TGF β 1 par miR-142-3p dans les lymphocytes B

Puisque les patients opérationnellement tolérants présentent un nombre plus important de lymphocytes B naïfs que les patients stables, nous ne pouvons exclure la possibilité que l'augmentation de miR-142-3p est seulement une conséquence de l'augmentation de ces lymphocytes B naïfs. En effet, des résultats préliminaires montrent que miR-142-3p est plus exprimé dans des lymphocytes B naïfs que mémoires et régulateurs de patients sains (figure 18), ce qui corrèle avec l'étude de Basso *et al.* où miR-142-3p est plus exprimé dans des lymphocytes B naïfs que mémoires ou issus de centres germinatifs (Basso, *et al.* 2009). Cette hypothèse doit être vérifiée ainsi que l'implication de miR-142-3p dans la fonction des lymphocytes B. Mais la modulation d'expression de ce miARN en fonction du stade de différenciation des lymphocytes B ainsi qu'en fonction du stimuli (par exemple TGF β 1 et IFN γ) suggère un rôle actif de ce miARN lors de la différenciation des lymphocytes B.

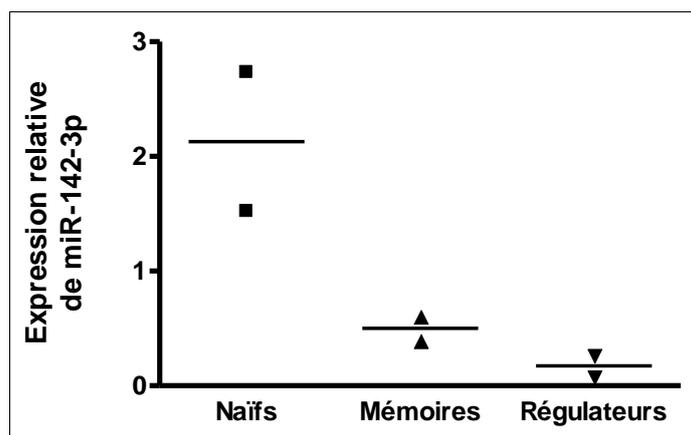


Figure 18: Expression de miR-142-3p dans des lymphocytes B naïfs, mémoires et régulateurs triés à partir de PBMC d'individus sains (n=2).

Le TGF β 1 a aussi une action pro-fibrotique sur le rein (Liu, Y. 2006) et miR-142-3p a été récemment décrit dans un modèle de fibrose rénale (Zarjou, *et al.* 2011). Or en absence de biopsies des patients opérationnellement tolérants, nous ne pouvons exclure la présence d'une fibrose au sein de leur greffon. Cela ne serait pas étonnant puisque certains patients ont un greffon depuis plusieurs dizaines d'années. Cependant, la mise en évidence de la surexpression de miR-142-3p dans les lymphocytes B de patients tolérants uniquement suggère une implication de ce miARN dans le contrôle de la fonction immunitaire. Par ailleurs, la présence d'une inflammation dans les reins des souris atteintes de fibrose et la présence d'un infiltrat de cellules immunitaires peut indiquer que miR-142-3p participe au contrôle d'une réponse immunitaire dans ce modèle, et non directement à la fibrose (Zarjou, *et al.* 2011).

miR-142-3p a aussi été décrit pour participer à la fonction des Treg (Huang, B., *et al.* 2009). Bien que nous n'ayons pas mis en évidence d'expression différentielle de miR-142-3p dans les lymphocytes T totaux des différents groupes de patients, il ne peut être exclu une différence d'expression dans des sous-types lymphocytaires T, notamment CD4⁺CD25⁺, et une implication dans le contrôle de leurs fonctions.

Nous nous sommes focalisés sur miR-142-3p, notamment parce qu'il a été décrit spécifiquement dans la lignée hématopoïétique, mais l'implication d'autres miARN différentiels entre patients tolérants et stables n'est pas exclue.

Le profil d'expression des miARN dans les PBMC de patients en RCHA nous a permis d'identifier miR-142-5p comme surexprimé dans le sang de ces patients. La confirmation de sa surexpression dans un groupe indépendant renforce son potentiel biomarqueur, avec une AUC de 0,78 en courbe

ROC. L'analyse de ce miARN de façon prospective permettrait de définir si ce miARN est un bon biomarqueur du RCHA, et son augmentation permettrait d'être une indication de biopsie.

Ces deux études nous montrent que miR-142-3p et miR-142-5p sont tous les deux augmentés dans le RCHA et la tolérance. Cependant, l'augmentation de ces miARN dans les lymphocytes B est spécifique aux patients opérationnellement tolérants. Les cellules responsables de la surexpression de ces miARN dans les PBMC des patients en RCHA restent à identifier. Ces résultats suggèrent que ces miARN n'ont pas les mêmes rôles selon le type cellulaire où ils sont exprimés, ce qui est en accord avec plusieurs autres miARN, comme miR-155 (Schott and Stoecklin 2010).

Perspectives

I/ Implication des lymphocytes B dans la tolérance opérationnelle

1) Analyse de la différenciation lymphocytaire B

Puisque la fréquence des lymphocytes B naïfs est supérieure à celle des lymphocytes B mémoires chez les patients opérationnellement tolérants, nous faisons l'hypothèse d'un défaut de différenciation de ces lymphocytes B chez ces patients. L'analyse de la différenciation *in vitro* de ces lymphocytes B issus de patients opérationnellement tolérants est en cours. La première analyse consiste à observer si, au cours de leur prolifération puis de leur différenciation *in vitro*, les lymphocytes B de patients tolérants se comportent de la même façon (phénotype, transcriptome, analyse du surnageant pour la production de cytokines et des facteurs de différenciation de survie et de prolifération) que les cellules d'individus sains, et s'ils répondent de façon similaire à différents stimuli. Nous étudions également leur capacité à proliférer et leur sensibilité à l'apoptose aux différents stades de différenciation.

2) Etude des propriétés suppressives des lymphocytes B

Nous avons mis en évidence une augmentation du nombre de cellules CD19⁺CD1d⁺/CD19⁺CD5⁺ dans le sang des patients opérationnellement tolérants (Pallier, *et al.* 2010; Iwata, *et al.* 2010). Nous étudierons les capacités suppressives de ces lymphocytes B isolés en utilisant le protocole décrit par l'équipe de T. Tedder (Iwata, *et al.* 2010), après une stimulation spécifique par le CD40 ligand et des oligonucléotides CpG. Nous étudierons en détail leur phénotype, leur capacité à produire de l'IL-10 et à inhiber *in vitro* une réaction lymphocytaire mixte.

II/ Analyse de l'expression des miARN chez les patients transplantés

1) Rôle du miR-142-3p dans la tolérance opérationnelle

a) Implication du miR-142-3p dans la voie de signalisation du TGFβ1

La surexpression de miR-142-3p, en utilisant un *mimic* dans des Raji, et une analyse par puces à ADN ont permis de mettre en évidence 66 gènes sous-exprimés étant des cibles potentielles de miR-142-3p. Une analyse des réseaux de gènes a permis d'identifier plusieurs réseaux dont l'un impliqué dans la signalisation du TGFβ1, incluant les gènes TGFBR1 et *TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2* (TAB2) (Danger *et al.*, en révision).

Après confirmation en qPCR de la sous-expression de TGFBR1 par un *mimic* de miR-142-3p, nous devons maintenant confirmer au niveau protéique la répression de ces cibles potentielles. La mise en évidence de la répression directe du gène TGFBR1 par miR-142-3p est en cours grâce à l'utilisation d'un clone exprimant l'ARNm de la GFP associée à la région 3' UTR du TGFBR1. L'analyse par cytométrie en flux de la fluorescence de la GFP devrait montrer une diminution de son expression lorsque ce clone sera co-transfecté avec le *mimic* de miR-142-3p dans des lignées n'exprimant pas miR-142-3p en conditions normales. De plus, des résultats préliminaires concernant TGFBR1 nous montrent une diminution d'environ 15% et reproductible 48 heures après la transfection au niveau protéique. Cette faible diminution est compatible avec la régulation fine des miARN, et peut aussi s'expliquer par un faible taux de transfection de ces cellules B et une dilution du nombre de cellules transfectées à 48 heures par la prolifération des Raji.

L'hypothèse d'un rétrocontrôle négatif du TGFβ1 par le miR-142-3p est illustrée en figure 17. Parce que les cellules Raji sont insensibles à l'apoptose induite par le TGFβ1, elles ne constituent donc pas le meilleur modèle pour continuer notre analyse ; la confirmation sera réalisée dans des cellules sensibles au TGFβ1 telles que les lignées Ramos, BL2 ou BL40 (Spender, *et al.* 2009). Pour cela, l'analyse par PCR quantitative et par *Western Blot* de la signalisation du TGFβ1 sera réalisée, en commençant par les molécules SMAD2, SMAD3 et p21, mais aussi les molécules faisant partie du réseau de gènes liés au TGFβ1 et cibles de miR-142-3p dont TAB2 et *integrin alpha V* (ITGAV). Des analyses phénotypiques de la prolifération et de l'apoptose induites par le TGFβ1 seront réalisées en parallèle dans ces cellules. Nous supposons que la surexpression de miR-142-3p induira alors une diminution de la réponse au TGFβ1.

Par ailleurs, nous avons montré une concentration plus faible de TGFβ1 dans le plasma des patients opérationnellement tolérants par rapport à des patients transplantés présentant une fonction stable de leur greffon (figure 19) (collaboration D. Baeten, Amsterdam, Pays-Bas). Même si la raison d'une diminution de TGFβ1 reste à élucider, ces résultats suggèrent une régulation de la

production de TGF β 1 dans la tolérance et renforcent notre intérêt pour la signalisation de cette molécule.

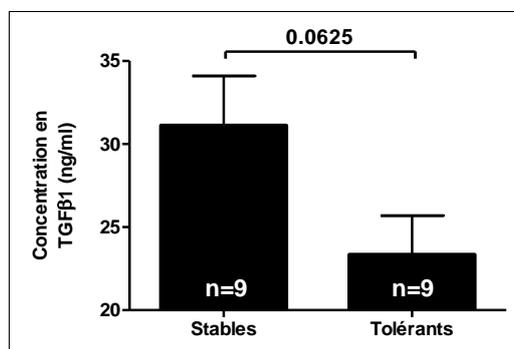


Figure 19: Concentration du TGF β 1 dans le plasma de patients stables et opérationnellement tolérants

b) Répression de la production d'IL-6 par miR-142-3p

Par ailleurs, l'étude de Sun *et al.* a montré une répression directe de l'IL6 par miR-142-3p dans des cellules dendritiques (Sun, Y., *et al.* 2011). Ce gène est faiblement exprimé dans les puces à ADN que nous avons réalisées ; nous ne pouvons donc pas conclure quant à la répression de l'IL6 dans notre expérience. Cette faible détection du gène de l'IL-6 dans les puces à ADN n'est toutefois pas étonnante puisque les interleukines sont faiblement exprimées et généralement non détectées par puces à ADN (Park and Stegall 2007). Nous allons donc mesurer l'expression de l'IL6 dans les lymphocytes B transfectés avec un *mimic* miR-142-3p et après stimulation des lymphocytes B des différents groupes de patients. Puisque la surexpression de miR-142-3p peut être due à d'autres types cellulaires que les lymphocytes B, dont les cellules dendritiques, nous réaliserons la mesure de la concentration plasmatique de l'IL-6 chez les patients opérationnellement tolérants et stables.

c) Rôle de miR-142-3p sur la fonction des lymphocytes B

L'expression de miR-142-3p dans des lymphocytes B est modulée par différents stimuli dont le TGF β 1 et l'IFN γ . De plus, l'expression de miR-142-3p est modulée dans les lymphocytes B d'individus sains en fonction de leur stade de différenciation (figure 18 et Basso, *et al.* 2009). Ces résultats suggèrent une modulation active de l'expression de miR-142-3p dans les lymphocytes B et une implication de ce miARN dans leurs fonctions. Nous allons donc étudier les effets de la sur- et sous-expression de miR-142-3p sur la fonction des lymphocytes B issus d'individus sains.

Les lymphocytes B primaires étant des cellules difficiles à transfecter nous avons besoin d'utiliser des vecteurs viraux pour les transduire. Nous avons produit un clone de vecteur lentiviral codant pour un ARNm de la GFP associée à 4 séquences cibles de miR-142-3p. Afin de transduire de façon

maximale les lymphocytes B quiescents, nous utiliserons des particules virales en collaboration avec l'équipe de E. Verheijen (Frecha, *et al.* 2011) ; les particules virales de ce vecteur éponge sont en cours de production. Par ailleurs, un vecteur lentiviral codant pour le gène de miR-142 couplé à un gène rapporteur, une protéine fluorescente rouge (RFP), est en cours de synthèse.

Ces vecteurs nous permettront d'analyser la fonction de miR-142-3p dans les lymphocytes B. Ainsi, nous pourrions analyser si leur différenciation n'est pas altérée et mesurer la production de cytokines, notamment de TGFβ1, d'IL-6 et d'IL-10, la production d'Ig, leur prolifération, leur réponse à différents stimuli dont l'apoptose et la capacité suppressive de ces lymphocytes B dans des réactions lymphocytaires mixtes.

d) Implications *in vivo* de miR-142-3p

La surexpression de miR-142-3p dans le sang des patients opérationnellement tolérants suggère un rôle de ce miARN dans la tolérance. Nous analyserons l'effet de la surexpression de miR-142-3p sur la survie d'allogreffe dans un modèle de transplantation rénale chez le rat (Degauque, *et al.* 2006 ; Gagne, *et al.* 2001). Nous utiliserons le vecteur lentiviral pour permettre une expression à long-terme de miR-142-3p. Après vérification de l'expression de miR-142-3p dans les lymphocytes B périphériques, une prolongation de survie de la greffe permettrait de mettre en évidence un rôle majeur de ce miARN dans le contrôle de la réponse immunitaire après tolérance. Afin de s'affranchir des contraintes liées à la manipulation de lentivirus, nous envisageons aussi d'injecter en intraveineuse le *mimic* de miR-142-3p.

2) Implications de miR-142-5p dans le RCHA

a) Identification des cellules responsables de la surexpression de miR-142-5p

Nous avons mis en évidence une surexpression de miR-142-5p dans le sang des patients atteints de RCHA, mais nous n'avons pas identifié les cellules responsables de sa surexpression ; cette identification est en cours. Pour cela, nous mesurons l'expression de marqueurs de cellules sanguines, tels que CD3, CD14, CD19 et CD56, afin de rechercher une corrélation positive entre leur expression et celle de miR-142-5p dans les PBMC de patients en RCHA.

Lorsque ces cellules seront identifiées, similairement aux études réalisées pour miR-142-3p, nous étudierons les cibles de miR-142-5p, et le rôle de ce miARN dans ces cellules.

b) Implications *in vivo* de miR-142-5p dans le RCHA

Puisque le miR-142-5p semble impliqué dans le RCHA, nous étudierons l'implication de ce miARN dans un modèle de rejet chronique dépendant des Ac après transplantation cardiaque hétérotopique chez le rat et transfusion de sang du donneur avant la greffe (DST); Ballet, *et al.* 2009). Nous avons

déjà montré une surexpression de l'expression de miR-142-5p, ainsi que de miR-21, dans la greffe de ces animaux souffrant de rejet chronique 100 jours après la transplantation en comparaison des greffes d'animaux ayant reçu une greffe syngénique, ce qui est cohérent avec l'augmentation de miR-142-5p observée dans les biopsies de patients atteints de RCHA (figure 20). Par hybridation *in situ*, technique mise au point sur des coupes de reins humains détransplantés, nous allons mettre en évidence la présence de miR-142-5p dans les coupes de rein de rats DST. Nous identifierons les cellules responsables de la surexpression de miR-142-5p par colocalisation avec des marqueurs phénotypiques des cellules infiltrant le greffon.

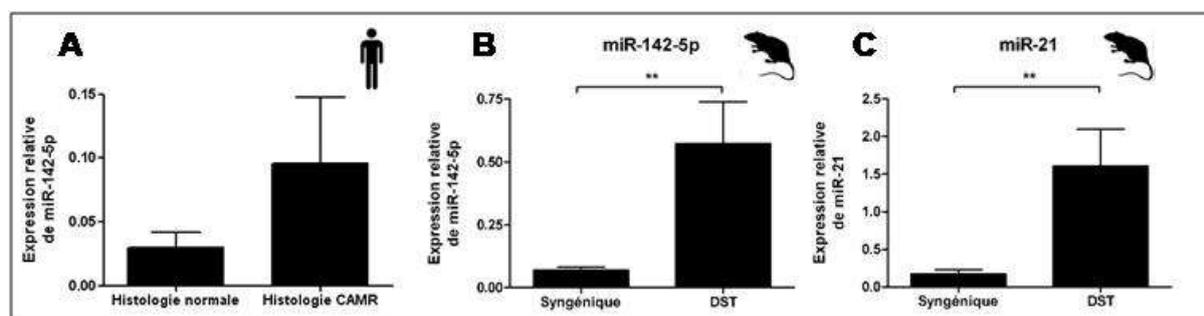


Figure 20: Expression de miR142-5p et miR-21 dans les reins de rats syngéniques et DST à J100

(A) L'expression de miR-142-5p est augmentée dans les biopsies de patients en RCHA par rapport à des biopsies de patients ne présentant pas de lésions histologiques particulières (échantillons fournis par J.P. Duong Van Huyen). L'expression de miR-142-5p (B) et de miR-21 (C) sont significativement augmentées dans les greffes des animaux souffrant de rejet chronique 100 jours après la transplantation (DST) en comparaison des greffes d'animaux ayant reçu une greffe syngénique.

L'intérêt thérapeutique d'un *antagomir* de miR-142-5p sera aussi étudié dans ce modèle, de façon similaire à ce qui a été réalisé dans un modèle de fibrose rénale chez la souris (Zarjou, *et al.* 2011). Une augmentation de la survie, une diminution de la concentration de DSA, de l'infiltrat et de la fibrose seront les principaux facteurs analysés.

c) Confirmation du potentiel biomarqueur de miR-142-5p

Nous avons montré une surexpression de miR-142-5p dans les PBMC de 9 patients en RCHA par rapport à 10 patients stables et confirmé cette surexpression dans des échantillons indépendants de PBMC de 10 patients en RCHA par rapport à 10 patients stables. De plus, cette augmentation n'est pas observée dans les PBMC de patients transplantés présentant des lésions de rejet aigu cellulaire, de patients non transplantés en insuffisance terminale pour cause non immunologique et d'individus sains. miR-142-5p semble donc être un biomarqueur potentiel du RCHA et nous allons continuer sa validation dans le cadre d'une étude prospective avec 300 échantillons de patients, prélevés 1 an après la greffe (projet ValBio12). De plus, puisque les urines sont un compartiment au contact du

greffon et que leur recueil est un acte non invasif, nous allons réaliser la mesure de ce miARN dans les urines de patients transplantés rénaux en RCHA et stables en collaboration avec D. Anglicheau qui maîtrise la technique d'extraction d'ARN à partir des urines.

III/ Comparaison rein-foie

Puisque les mécanismes de régulation de la tolérance aux allogreffes sont probablement différents entre la greffe de rein et de foie (Lozano, *et al.* 2011), nous avons analysé le profil d'expression de 381 miARN dans des PBMC de patients transplantés hépatiques tolérants et non tolérants, en collaboration avec l'équipe d'A. Sanchez-Fueyo (Barcelone). Ces patients opérationnellement tolérants ont arrêté leur traitement dans le cadre d'un protocole d'arrêt d'IS, les non-tolérants sont des patients qui ont expérimenté un épisode de rejet aigu après l'arrêt des immunosuppresseurs, pour lequel le traitement a été réintroduit et qui présentent une fonction normale au moment du prélèvement.

Nous avons identifié 5 miARN différentiellement exprimés entre tolérants hépatiques et non-tolérants (figure 21). De plus, puisque nous ne trouvons aucun miARN différentiel commun entre la tolérance rénale et hépatique, ces résultats préliminaires confirment l'idée d'une tolérance spécifique de l'organe, ou faisant intervenir des mécanismes différents (Lozano, *et al.* 2011). Finalement, l'analyse des 5 miARN différentiels va permettre d'identifier des biomarqueurs de la tolérance hépatique et de mieux comprendre les différences entre tolérance hépatique et rénale.

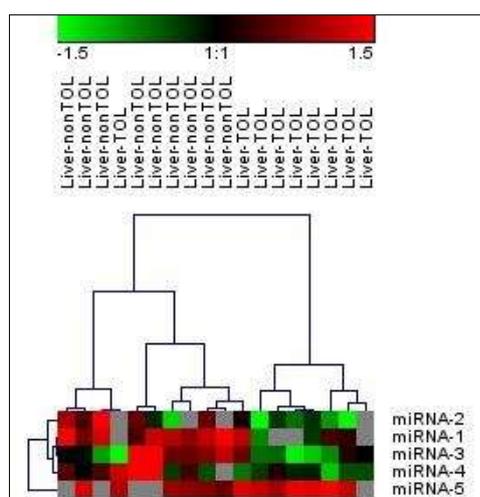


Figure 21: Regroupement hiérarchique des 5 miARN différentiels mis en évidence entre transplantés hépatiques opérationnellement tolérants (TOL) et non tolérants (nonTOL).

Les valeurs d'expression des miARN (2^{-ddCt}) sont représentées en rouge pour des fortes expressions et en vert pour des faibles expressions.

Bibliographie

- ABM (Agence de la Biomédecine). (2009). "Rapport annuel de l'agence de la biomédecine, 2008".
- Afaneh, C., Muthukumar, T., *et al.* (2010). "Urinary cell levels of mRNA for OX40, OX40L, PD-1, PD-L1, or PD-L2 and acute rejection of human renal allografts." *Transplantation* **90**(12): 1381-7.
- Aiba, Y., Yamazaki, T., Okada, T., Gotoh, K., Sanjo, H., Ogata, M. and Kurosaki, T. (2006). "BANK negatively regulates Akt activation and subsequent B cell responses." *Immunity* **24**(3): 259-68.
- Akalin, E., Dinavahi, R., *et al.* (2007). "Transplant glomerulopathy may occur in the absence of donor-specific antibody and C4d staining." *Clin J Am Soc Nephrol* **2**(6): 1261-7.
- Alvarez, C. M., Opelz, G., *et al.* (2005). "Evaluation of T-cell receptor repertoires in patients with long-term renal allograft survival." *Am J Transplant* **5**(4 Pt 1): 746-56.
- Anglicheau, D., Sharma, V. K., Ding, R., Hummel, A., Snopkowski, C., Dadhania, D., Seshan, S. V. and Suthanthiran, M. (2009b). "MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(13): 5330-5.
- Anglicheau, D. and Suthanthiran, M. (2008). "Noninvasive prediction of organ graft rejection and outcome using gene expression patterns." *Transplantation* **86**(2): 192-9.
- Ansari, M. J. and Sayegh, M. H. (2004). "Clinical transplantation tolerance: the promise and challenges." *Kidney Int* **65**(5): 1560-3.
- Ashton-Chess, J., Giral, M., *et al.* (2008). "Tribbles-1 as a Novel Biomarker of Chronic Antibody-Mediated Rejection." *J Am Soc Nephrol* **19**(6): 1116-1127.
- Ashton-Chess, J., Giral, M., Soulillou, J. P. and Brouard, S. (2009). "Can immune monitoring help to minimize immunosuppression in kidney transplantation?" *Transpl Int* **22**(1): 110-9.
- Ashton-Chess, J., Mai, H. L., *et al.* (2010). "Immunoproteasome beta subunit 10 is increased in chronic antibody-mediated rejection." *Kidney Int* **77**(10): 880-90.
- Baek, D., Villen, J., Shin, C., Camargo, F. D., Gygi, S. P. and Bartel, D. P. (2008). "The impact of microRNAs on protein output." *Nature* **455**(7209): 64-71.
- Baeten, D., Louis, S., *et al.* (2006). "Phenotypically and functionally distinct CD8+ lymphocyte populations in long-term drug-free tolerance and chronic rejection in human kidney graft recipients." *J Am Soc Nephrol* **17**(1): 294-304.
- Ballet, C., Renaudin, K., *et al.* (2009). "Indirect CD4+ TH1 response, antidonor antibodies and diffuse C4d graft deposits in long-term recipients conditioned by donor antigens priming." *Am J Transplant* **9**(4): 697-708.
- Ballet, C., Roussey-Kesler, G., Aubin, J. T., Brouard, S., Giral, M., Miqueu, P., Louis, S., van der Werf, S. and Soulillou, J. P. (2006). "Humoral and cellular responses to influenza vaccination in human recipients naturally tolerant to a kidney allograft." *Am J Transplant* **6**(11): 2796-801.
- Banerjee, A., Schambach, F., DeJong, C. S., Hammond, S. M. and Reiner, S. L. (2009). "Micro-RNA-155 inhibits IFN-gamma signaling in CD4+ T cells." *Eur J Immunol* **40**(1): 225-31.
- Banfi, G., Villa, M., Cresseri, D. and Ponticelli, C. (2005). "The clinical impact of chronic transplant glomerulopathy in cyclosporine era." *Transplantation* **80**(10): 1392-7.
- Barad, O., Meiri, E., *et al.* (2004). "MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues." *Genome Res* **14**(12): 2486-94

- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* **116**(2): 281-97.
- Barton-Burke, M., Dwinell, D. M., Kafkas, L., Lavalley, C., Sands, H., Proctor, C. and Johnson, E. (2008). "Graft-versus-host disease: a complex long-term side effect of hematopoietic stem cell transplant." *Oncology (Williston Park)* **22**(11 Suppl Nurse Ed): 31-45.
- Bashuda, H., Kimikawa, M., Seino, K., Kato, Y., Ono, F., Shimizu, A., Yagita, H., Teraoka, S. and Okumura, K. (2005). "Renal allograft rejection is prevented by adoptive transfer of anergic T cells in nonhuman primates." *J Clin Invest* **115**(7): 1896-902.
- Basso, K., Sumazin, P., *et al.* (2009). "Identification of the human mature B cell miRNome." *Immunity* **30**(5): 744-52.
- Becker, B. N., Jacobson, L. M., Hullett, D. A., Radke, N. A., Oberley, T. D., Brazy, P. C. and Kirk, A. D. (2002). "Type 2 angiotensin II receptor expression in human renal allografts: an association with chronic allograft nephropathy." *Clin Nephrol* **57**(1): 19-26.
- Belver, L., de Yebenes, V. G. and Ramiro, A. R. (2010). "MicroRNAs prevent the generation of autoreactive antibodies." *Immunity* **33**(5): 713-22.
- Bennett, W. M., DeMattos, A., Meyer, M. M., Andoh, T. and Barry, J. M. (1996). "Chronic cyclosporine nephropathy in renal transplantation." *Transplant Proc* **28**(4): 2100-3.
- Berezikov, E., Chung, W. J., Willis, J., Cuppen, E. and Lai, E. C. (2007). "Mammalian mirtron genes." *Mol Cell* **28**(2): 328-36.
- Berezikov, E., Robine, N., *et al.* (2011). "Deep annotation of *Drosophila melanogaster* microRNAs yields insights into their processing, modification, and emergence." *Genome Res* **21**(2): 203-15.
- Bestard, O., Cassis, L., Cruzado, J. M., Torras, J., Franquesa, M., Gil-Vernet, S., Lucia, M. and Grinyo, J. M. (2011). "Costimulatory blockade with mTor inhibition abrogates effector T-cell responses allowing regulatory T-cell survival in renal transplantation." *Transpl Int* **24**(5): 451-60.
- Billingham, R. E., Brent, L. and Medawar, P. B. (1953). "Actively acquired tolerance of foreign cells." *Nature* **172**(4379): 603-6.
- Biomarkers Definitions Working Group (2001). "Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework." *Clin Pharmacol Ther* **69**(3): 89-95.
- Blair, P. A., Norena, L. Y., Flores-Borja, F., Rawlings, D. J., Isenberg, D. A., Ehrenstein, M. R. and Mauri, C. (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): 129-40.
- Bolling, T., Kreuziger, D. C., Ernst, I., Elsayed, H. and Willich, N. (2011). "Retrospective, monocentric analysis of late effects after Total Body Irradiation (TBI) in adults." *Strahlenther Onkol* **187**(5): 311-5.
- Bracken, C. P., Gregory, P. A., Kolesnikoff, N., Bert, A. G., Wang, J., Shannon, M. F. and Goodall, G. J. (2008). "A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition." *Cancer Res* **68**(19): 7846-54.
- Braudeau, C., Ashton-Chess, J., *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): 130-6.
- Braudeau, C., Racape, M., *et al.* (2007). "Variation in numbers of CD4+CD25highFOXP3+ T cells with normal immuno-regulatory properties in long-term graft outcome." *Transpl Int* **20**(10): 845-55.

- Brouard, S., Dupont, A., *et al.* (2005). "Operationally tolerant and minimally immunosuppressed kidney recipients display strongly altered blood T-cell clonal regulation." Am J Transplant **5**(2): 330-40.
- Brouard, S., Le Bars, A., *et al.* (2011). "Identification of a gene expression profile associated with operational tolerance among a selected group of stable kidney transplant patients." Transpl Int **24**(6): 536-47.
- Brouard, S., Mansfield, E., *et al.* (2007). "Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(39): 15448-53.
- Brown, B. D., Venneri, M. A., Zingale, A., Sergi Sergi, L. and Naldini, L. (2006). "Endogenous microRNA regulation suppresses transgene expression in hematopoietic lineages and enables stable gene transfer." Nat Med **12**(5): 585-91.
- Buhler, L. H., Spitzer, T. R., *et al.* (2002). "Induction of kidney allograft tolerance after transient lymphohematopoietic chimerism in patients with multiple myeloma and end-stage renal disease." Transplantation **74**(10): 1405-9.
- Busque, S., Scandling, J. D., *et al.* (2011). "Successful Tolerance Induction with a Post Kidney Transplantation (Tx) Regimen of Total Lymphoid Irradiation (TLI), Antithymocyte Globulin (ATG) and Donor Purified CD34 Progenitor Cells in HLA-Matched Recipients." American Congress of Transplantation 2011, Philadelphia **Oral communication**.
- Bustin, S. A. (2000). "'Lymphochips' and cancer profiles." Mol Med Today **6**(6): 218.
- Butcher, J. A., Hariharan, S., Adams, M. B., Johnson, C. P., Roza, A. M. and Cohen, E. P. (1999). "Renal transplantation for end-stage renal disease following bone marrow transplantation: a report of six cases, with and without immunosuppression." Clin Transplant **13**(4): 330-5.
- Calne, R., Friend, P., Moffatt, S., Bradley, A., Hale, G., Firth, J., Bradley, J., Smith, K. and Waldmann, H. (1998). "Prope tolerance, perioperative campath 1H, and low-dose cyclosporin monotherapy in renal allograft recipients." Lancet **351**(9117): 1701-2.
- Calne, R. and Watson, C. J. (2011). "Some observations on prope tolerance." Curr Opin Organ Transplant.
- Carter, J. T., Lee, C. M., Weinstein, R. J., Lu, A. D., Dafoe, D. C. and Alfrey, E. J. (2000). "Evaluation of the older cadaveric kidney donor: the impact of donor hypertension and creatinine clearance on graft performance and survival." Transplantation **70**(5): 765-71.
- Cecka, J. M. (2010). "HLA matching for organ transplantation...why not?" Int J Immunogenet **37**(5): 323-7.
- Chai, J. G., Bartok, I., Chandler, P., Vendetti, S., Antoniou, A., Dyson, J. and Lechler, R. (1999). "Anergic T cells act as suppressor cells in vitro and in vivo." Eur J Immunol **29**(2): 686-92.
- Chen, C., Ridzon, D. A., *et al.* (2005). "Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR." Nucleic Acids Res **33**(20): e179.
- Chen, C. Z., Li, L., Lodish, H. F. and Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation." Science **303**(5654): 83-6.
- Cho, B. K., Rao, V. P., Ge, Q., Eisen, H. N. and Chen, J. (2000). "Homeostasis-stimulated proliferation drives naive T cells to differentiate directly into memory T cells." J Exp Med **192**(4): 549-56.
- Choi, W. Y., Giraldez, A. J. and Schier, A. F. (2007). "Target protectors reveal dampening and balancing of Nodal agonist and antagonist by miR-430." Science **318**(5848): 271-4.

- Christensen, L. L., Grunnet, N., Rudiger, N., Moller, B. and Birkeland, S. A. (1998). "Indications of immunological tolerance in kidney transplantation." Tissue Antigens **51**(6): 637-44.
- Chung, A. C., Huang, X. R., Meng, X. and Lan, H. Y. (2010). "miR-192 mediates TGF-beta/Smad3-driven renal fibrosis." J Am Soc Nephrol **21**(8): 1317-25.
- Cissell, K. A., Rahimi, Y., Shrestha, S., Hunt, E. A. and Deo, S. K. (2008). "Bioluminescence-based detection of microRNA, miR21 in breast cancer cells." Anal Chem **80**(7): 2319-25.
- Cobb, B. S., Nesterova, T. B., *et al.* (2005). "T cell lineage choice and differentiation in the absence of the RNase III enzyme Dicer." J Exp Med **201**(9): 1367-73.
- Cortesini, R. and Suci-Foca, N. (2004). "The concept of "partial" clinical tolerance." Transpl Immunol **13**(2): 101-4.
- Czech, B., Zhou, R., Erlich, Y., Brennecke, J., Binari, R., Villalta, C., Gordon, A., Perrimon, N. and Hannon, G. J. (2009). "Hierarchical rules for Argonaute loading in Drosophila." Mol Cell **36**(3): 445-56.
- Dalai, S. K., Mirshahidi, S., Morrot, A., Zavala, F. and Sadegh-Nasseri, S. (2008). "Anergy in memory CD4+ T cells is induced by B cells." J Immunol **181**(5): 3221-31.
- Danger, R., Racape, M., Soulillou, J. P. and Brouard, S. (2010). "What can we learn from the transcriptional characterization of spontaneously tolerant transplant recipients?" Curr Opin Organ Transplant **15**(4): 435-40.
- Dantal, J., Hourmant, M., Cantarovich, D., Giral, M., Blanco, G., Dreno, B. and Soulillou, J. P. (1998). "Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens." Lancet **351**(9103): 623-8.
- Degauque N, Lair D, Dupont A, Moreau A, Roussey G, Moizant F, Hubert FX, Louvet C, Hill M, Haspot F, Josien R, Usal C, Vanhove B, Soulillou JP, Brouard S. (2006). "Dominant tolerance to kidney allografts induced by anti-donor MHC class II antibodies: cooperation between T and non-T CD103+ cells." J Immunol **176**(7):3915-22.
- Delis, S., Ciancio, G., Burke, G. W., 3rd, Garcia-Morales, R. and Miller, J. (2004). "Donor bone marrow transplantation: chimerism and tolerance." Transpl Immunol **13**(2): 105-15.
- Deng, S., Moore, D. J., *et al.* (2007). "Cutting edge: transplant tolerance induced by anti-CD45RB requires B lymphocytes." J Immunol **178**(10): 6028-32.
- Einecke, G., Reeve, J., *et al.* (2010). "A molecular classifier for predicting future graft loss in late kidney transplant biopsies." J Clin Invest **120**(6): 1862-72.
- Einecke, G., Sis, B., Reeve, J., Mengel, M., Campbell, P. M., Hidalgo, L. G., Kaplan, B. and Halloran, P. F. (2009). "Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure." Am J Transplant **9**(11): 2520-31.
- Eiring, A. M., Harb, J. G., *et al.* (2010). "miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts." Cell **140**(5): 652-65.
- El-Zoghby, Z. M., Stegall, M. D., Lager, D. J., Kremers, W. K., Amer, H., Gloor, J. M. and Cosio, F. G. (2009). "Identifying Specific Causes of Kidney Allograft Loss." Am J Transplant **9**(3):527-35.
- Eulalio, A., Rehwinkel, J., *et al.* (2007). "Target-specific requirements for enhancers of decapping in miARN-mediated gene silencing." Genes Dev **21**(20): 2558-70.
- Eynon, E. E. and Parker, D. C. (1992). "Small B cells as antigen-presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens." J Exp Med **175**(1): 131-8.

- Eystathioy, T., Chan, E. K., Tenenbaum, S. A., Keene, J. D., Griffith, K. and Fritzler, M. J. (2002). "A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles." Mol Biol Cell **13**(4): 1338-51.
- Fehr, T. and Sykes, M. (2004). "Tolerance induction in clinical transplantation." Transpl Immunol **13**(2): 117-30.
- Ferguson, E. L., Sternberg, P. W. and Horvitz, H. R. (1987). "A genetic pathway for the specification of the vulval cell lineages of *Caenorhabditis elegans*." Nature **326**(6110): 259-67.
- Fillatreau, S., Sweenie, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D. and Anderton, S. M. (2002). "B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10." Nat Immunol **3**(10): 944-50.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. and Mello, C. C. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." Nature **391**(6669): 806-11.
- Fotheringham, J., Angel, C., Goodwin, J., Harmer, A. W. and McKane, W. S. (2011). "Natural history of proteinuria in renal transplant recipients developing de novo human leukocyte antigen antibodies." Transplantation **91**(9): 991-6.
- Foucher, Y., Daguin, P., *et al.* (2010). "A clinical scoring system highly predictive of long-term kidney graft survival." Kidney Int **78**(12): 1288-94.
- Frecha, C., Levy, C., Costa, C., Negre, D., Amirache, F., Buckland, R., Russell, S. J., Cosset, F. L. and Verhoeven, E. (2011). "Measles virus glycoprotein-pseudotyped lentiviral vector-mediated gene transfer into quiescent lymphocytes requires binding to both SLAM and CD46 entry receptors." J Virol **85**(12): 5975-85.
- Fudaba, Y., Spitzer, T. R., *et al.* (2006). "Myeloma responses and tolerance following combined kidney and nonmyeloablative marrow transplantation: in vivo and in vitro analyses." Am J Transplant **6**(9): 2121-33.
- Gagne K, Brouard S, Guillet M, Cuturi MC, Souillou JP. (2001). "TGF-beta1 and donor dendritic cells are common key components in donor-specific blood transfusion and anti-class II heart graft enhancement, whereas tolerance induction also required inflammatory cytokines down-regulation." Eur J Immunol **31**(10):3111-20.
- Gajewski, J. L., Ippoliti, C., Ma, Y. and Champlin, R. (2002). "Discontinuation of immunosuppression for prevention of kidney graft rejection after receiving a bone marrow transplant from the same HLA identical sibling donor." Am J Hematol **71**(4): 311-3.
- Gallon, L., Gagliardini, E., Benigni, A., Kaufman, D., Waheed, A., Noris, M. and Remuzzi, G. (2006). "Immunophenotypic analysis of cellular infiltrate of renal allograft biopsies in patients with acute rejection after induction with alemtuzumab (Campath-1H)." Clin J Am Soc Nephrol **1**(3): 539-45.
- Garzon, R., Marcucci, G. and Croce, C. M. (2010). "Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges." Nat Rev Drug Discov **9**(10): 775-89.
- Germani, G., Lazzaro, S., *et al.* (2011). "Nonadherent behaviors after solid organ transplantation." Transplant Proc **43**(1): 318-23.
- Ghildiyal, M., Xu, J., Seitz, H., Weng, Z. and Zamore, P. D. (2010). "Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway." RNA **16**(1): 43-56.
- Giral-Classe, M., Hourmant, M., Cantarovich, D., Dantal, J., Blancho, G., Daguin, P., Ancelet, D. and Souillou, J. P. (1998). "Delayed graft function of more than six days strongly decreases long-term survival of transplanted kidneys." Kidney Int **54**(3): 972-8.

- Giral, M., Foucher, Y., *et al.* (2010a). "Kidney and recipient weight incompatibility reduces long-term graft survival." J Am Soc Nephrol **21**(6): 1022-9.
- Giral, M., Martinez, F., Noël, L. H., Rabant, M. and Renaudin, K. (2010b). Atlas de néphropathologie du transplant, Novartis.
- Godwin, J. G., Ge, X., Stephan, K., Jurisch, A., Tullius, S. G. and Iacomini, J. (2010). "Identification of a microRNA signature of renal ischemia reperfusion injury." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(32): 14339-44.
- Greenstein, S. and Siegal, B. (1998). "Compliance and noncompliance in patients with a functioning renal transplant: a multicenter study." Transplantation **66**(12): 1718-26.
- Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S. and Bartel, D. P. (2010). "Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels." Nature **466**(7308): 835-40.
- Hamawi, K., De Magalhaes-Silverman, M. and Bertolatus, J. A. (2003). "Outcomes of renal transplantation following bone marrow transplantation." Am J Transplant **3**(3): 301-5.
- Hanke, M., Hoefig, K., Merz, H., Feller, A. C., Kausch, I., Jocham, D., Warnecke, J. M. and Sczakiel, G. (2009). "A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer." Urol Oncol **28**(6): 655-61.
- Harvey, S. J., Jarad, G., Cunningham, J., Goldberg, S., Schermer, B., Harfe, B. D., McManus, M. T., Benzing, T. and Miner, J. H. (2008). "Podocyte-specific deletion of dicer alters cytoskeletal dynamics and causes glomerular disease." J Am Soc Nephrol **19**(11): 2150-8.
- Helg, C., Chapuis, B., Bolle, J. F., Morel, P., Salomon, D., Roux, E., Antonioli, V., Jeannet, M. and Leski, M. (1994). "Renal transplantation without immunosuppression in a host with tolerance induced by allogeneic bone marrow transplantation." Transplantation **58**(12): 1420-2.
- Ho, J., Ng, K. H., Rosen, S., Dostal, A., Gregory, R. I. and Kreidberg, J. A. (2008). "Podocyte-specific loss of functional microRNAs leads to rapid glomerular and tubular injury." J Am Soc Nephrol **19**(11): 2069-75.
- Holm, A. M., Sivertsen, E. A., Tunheim, S. H., Haug, T., Bjerkeli, V., Yndestad, A., Aukrust, P. and Froland, S. S. (2004). "Gene expression analysis of peripheral T cells in a subgroup of common variable immunodeficiency shows predominance of CCR7(-) effector-memory T cells." Clin Exp Immunol **138**(2): 278-89.
- Hori, S., Nomura, T. and Sakaguchi, S. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299**(5609): 1057-61.
- Horwitz, P. A., Tsai, E. J., *et al.* (2004). "Detection of cardiac allograft rejection and response to immunosuppressive therapy with peripheral blood gene expression." Circulation **110**(25): 3815-21.
- Hotchkiss, H., Chu, T. T., Hancock, W. W., Schroppel, B., Kretzler, M., Schmid, H., Liu, Y., Dikman, S. and Akalin, E. (2006). "Differential expression of profibrotic and growth factors in chronic allograft nephropathy." Transplantation **81**(3): 342-9.
- Hourmant, M., Cesbron-Gautier, A., *et al.* (2005). "Frequency and clinical implications of development of donor-specific and non-donor-specific HLA antibodies after kidney transplantation." J Am Soc Nephrol **16**(9): 2804-12.
- Huang, B., Zhao, J., Lei, Z., Shen, S., Li, D., Shen, G. X., Zhang, G. M. and Feng, Z. H. (2009). "miR-142-3p restricts cAMP production in CD4+CD25- T cells and CD4+CD25+ TREG cells by targeting AC9 mRNA." EMBO Rep **10**(2): 180-5.

- Huang, Y., Shen, X. J., Zou, Q., Wang, S. P., Tang, S. M. and Zhang, G. Z. (2011). "Biological functions of microRNAs: a review." J Physiol Biochem **67**(1): 129-39.
- Hunt, E. A., Goulding, A. M. and Deo, S. K. (2009). "Direct detection and quantification of microRNAs." Anal Biochem **387**(1): 1-12.
- Huntzinger, E. and Izaurralde, E. (2011). "Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay." Nat Rev Genet **12**(2): 99-110.
- Hwang, H. W., Wentzel, E. A. and Mendell, J. T. (2007). "A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import." Science **315**(5808): 97-100.
- Inui, M., Martello, G., Piccolo, S. (2010). « MicroRNA control of signal transduction." Nat Rev Mol Cell Biol **11**(4):252-63.
- Iwata, Y., Matsushita, T., *et al.* (2010). "Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells." Blood **117**(2): 530-41.
- Jacobsen, N., Taaning, E., Ladefoged, J., Kristensen, J. K. and Pedersen, F. K. (1994). "Tolerance to an HLA-B,DR disparate kidney allograft after bone-marrow transplantation from same donor." Lancet **343**(8900): 800.
- Jinek, M. and Doudna, J. A. (2009). "A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference." Nature **457**(7228): 405-12.
- Jordan, S. C., Reinsmoen, N., Peng, A., Lai, C. H., Cao, K., Villicana, R., Toyoda, M., Kahwaji, J. and Vo, A. A. (2010). "Advances in diagnosing and managing antibody-mediated rejection." Pediatr Nephrol **25**(10): 2035-45; quiz 2045-8.
- Jovanovic, V., Lair, D., Soullillou, J. P. and Brouard, S. (2008). "Transfer of tolerance to heart and kidney allografts in the rat model." Transpl Int **21**(3): 199-206.
- Junker, A., Krumbholz, M., *et al.* (2009). "MicroRNA profiling of multiple sclerosis lesions identifies modulators of the regulatory protein CD47." Brain **132**(Pt 12): 3342-52.
- Kaplan, B., Gangemi, A., Thielke, J., Oberholzer, J., Sankary, H. and Benedetti, E. (2007). "Successful rescue of refractory, severe antibody mediated rejection with splenectomy." Transplantation **83**(1): 99-100.
- Kato, M., Putta, S., *et al.* (2009). "TGF-beta activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN." Nat Cell Biol **11**(7): 881-9.
- Kato, M., Zhang, J., Wang, M., Lanting, L., Yuan, H., Rossi, J. J. and Natarajan, R. (2007). "MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF-beta-induced collagen expression via inhibition of E-box repressors." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3432-7.
- Kawai, T., Cosimi, A. B., *et al.* (2008). "HLA-mismatched renal transplantation without maintenance immunosuppression." N Engl J Med **358**(4): 353-61.
- Khvorova, A., Reynolds, A. and Jayasena, S. D. (2003). "Functional siRNAs and miARNs exhibit strand bias." Cell **115**(2): 209-16.
- Kiriakidou, M., Tan, G. S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P. T. and Mourelatos, Z. (2007). "An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation." Cell **129**(6): 1141-51.
- Kirk, A. D., Hale, D. A., *et al.* (2003). "Results from a human renal allograft tolerance trial evaluating the humanized CD52-specific monoclonal antibody alemtuzumab (CAMPATH-1H)." Transplantation **76**(1): 120-9.
- Koralov, S. B., Muljo, S. A., *et al.* (2008). "Dicer ablation affects antibody diversity and cell survival in the B lymphocyte lineage." Cell **132**(5): 860-74.

- Kosiewicz, M. M. and Alard, P. (2004). "Tolerogenic antigen-presenting cells: regulation of the immune response by TGF-beta-treated antigen-presenting cells." *Immunol Res* **30**(2): 155-70.
- Kota, J., Chivukula, R. R., *et al.* (2009). "Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model." *Cell* **137**(6): 1005-17.
- Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S. (2011). "miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data." *Nucleic Acids Res* **39**(Database issue): D152-7.
- Krek, A., Grun, D., *et al.* (2005). "Combinatorial microRNA target predictions." *Nat Genet* **37**(5): 495-500.
- Krupa, A., Jenkins, R., Luo, D. D., Lewis, A., Phillips, A. and Fraser, D. (2010). "Loss of MicroRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy." *J Am Soc Nephrol* **21**(3): 438-47.
- Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K. G., Tuschl, T., Manoharan, M. and Stoffel, M. (2005). "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'." *Nature* **438**(7068): 685-9.
- Kuchen, S., Resch, W., *et al.* (2010). "Regulation of microRNA expression and abundance during lymphopoiesis." *Immunity* **32**(6): 828-39.
- Kulkarni, M., Ozgur, S. and Stoecklin, G. (2010). "On track with P-bodies." *Biochem Soc Trans* **38**(Pt 1): 242-51.
- Kumarswamy, R., Volkmann, I. and Thum, T. (2011). "Regulation and function of miARN-21 in health and disease." *RNA Biol* **8**(5).
- Lachmann, N., Terasaki, P. I., *et al.* (2009). "Anti-human leukocyte antigen and donor-specific antibodies detected by luminex posttransplant serve as biomarkers for chronic rejection of renal allografts." *Transplantation* **87**(10): 1505-13.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2002). "Identification of tissue-specific microRNAs from mouse." *Curr Biol* **12**(9): 735-9.
- Landgraf, P., Rusu, M., *et al.* (2007). "A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing." *Cell* **129**(7): 1401-14.
- Lanford, R. E., Hildebrandt-Eriksen, E. S., Petri, A., Persson, R., Lindow, M., Munk, M. E., Kauppinen, S. and Orum, H. (2010). "Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection." *Science* **327**(5962): 198-201.
- Larsen, C. P., Grinyo, J., *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): 1528-35.
- Larsen, C. P., Pearson, T. C., *et al.* (2005). "Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties." *Am J Transplant* **5**(3): 443-53.
- Lassila, O., Vainio, O. and Matzinger, P. (1988). "Can B cells turn on virgin T cells?" *Nature* **334**(6179): 253-5.
- Laupacis, A., Keown, P., Pus, N., Krueger, H., Ferguson, B., Wong, C. and Muirhead, N. (1996). "A study of the quality of life and cost-utility of renal transplantation." *Kidney Int* **50**(1): 235-42.
- Lee, A. J., Morgan, C. L., Conway, P. and Currie, C. J. (2005). "Characterisation and comparison of health-related quality of life for patients with renal failure." *Curr Med Res Opin* **21**(11): 1777-83.
- Lee, C. M., Carter, J. T., Randall, H. B., Hiose, R., Stock, P. G., Melzer, J. S., Dafoe, D. C., Freise, C. E. and Alfrey, E. J. (2000). "The effect of age and prolonged cold ischemia times on the national allocation of cadaveric renal allografts." *J Surg Res* **91**(1): 83-8.

- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. and Ambros, V. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-54.
- Lee, S. O., Masyuk, T., Splinter, P., Banales, J. M., Masyuk, A., Stroope, A. and Larusso, N. (2008). "MicroRNA15a modulates expression of the cell-cycle regulator *Cdc25A* and affects hepatic cystogenesis in a rat model of polycystic kidney disease." J Clin Invest **118**(11): 3714-24.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H. and Kim, V. N. (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." EMBO J **23**(20): 4051-60.
- Lefaucheur, C., Loupy, A., *et al.* (2010). "Preexisting donor-specific HLA antibodies predict outcome in kidney transplantation." J Am Soc Nephrol **21**(8): 1398-406.
- Lemy, A., Toungouz, M. and Abramowicz, D. (2010). "Bortezomib: a new player in pre- and post-transplant desensitization?" Nephrol Dial Transplant **25**(11): 3480-9.
- Lerut, J. and Sanchez-Fueyo, A. (2006). "An appraisal of tolerance in liver transplantation." Am J Transplant **6**(8): 1774-80.
- Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. and Burge, C. B. (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." Cell **115**(7): 787-98.
- Li, W. and Ruan, K. (2009). "MicroRNA detection by microarray." Anal Bioanal Chem **394**(4): 1117-24.
- Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L. and Chen, C. (2007). "Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues." BMC Genomics **8**: 166.
- Liu, J., Rivas, F. V., Wohlschlegel, J., Yates, J. R., 3rd, Parker, R. and Hannon, G. J. (2005a). "A role for the P-body component GW182 in microRNA function." Nat Cell Biol **7**(12): 1261-6.
- Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J. and Parker, R. (2005b). "MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies." Nat Cell Biol **7**(7): 719-23.
- Liu, Q., Zhang, M., *et al.* (2011a). "miR-223 suppresses differentiation of tumor-induced CD11b(+)Gr1(+)myeloid derived suppressor cells from bone marrow cells." Int J Cancer.
- Liu, Y. (2006). "Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics." Kidney Int **69**(2): 213-7.
- Liu, Y., Chen, Q., Song, Y., Lai, L., Wang, J., Yu, H., Cao, X. and Wang, Q. (2011b). "MicroRNA-98 negatively regulates IL-10 production and endotoxin tolerance in macrophages after LPS stimulation." FEBS Lett **585**(12): 1963-8.
- Louis, S., Braudeau, C., Giral, M., Dupont, A., Moizant, F., Robillard, N., Moreau, A., Souillou, J. P. and Brouard, S. (2006). "Contrasting CD25hiCD4+T cells/FOXP3 patterns in chronic rejection and operational drug-free tolerance." Transplantation **81**(3): 398-407.
- Loupy, A., Hill, G. S., *et al.* (2011). "Significance of C4d Banff scores in early protocol biopsies of kidney transplant recipients with preformed donor-specific antibodies (DSA)." Am J Transplant **11**(1): 56-65.
- Lozano, J. J., Pallier, A., *et al.* (2011). "Comparison of transcriptional and blood cell phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients." American Journal of Transplantation **accepted**.
- Lu, L. F., Boldin, M. P., Chaudhry, A., Lin, L. L., Taganov, K. D., Hanada, T., Yoshimura, A., Baltimore, D. and Rudensky, A. Y. (2010). "Function of miR-146a in controlling Treg cell-mediated regulation of Th1 responses." Cell **142**(6): 914-29.
- Lytle, J. R., Yario, T. A. and Steitz, J. A. (2007). "Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(23): 9667-72.

- Mai, H. L., Cesbron, A., *et al.* (2009). "Bortezomib in the treatment of antibody-mediated rejection--a report of 3 cases." Clin Transpl: 361-8.
- Maluf, D. G., Mas, V. R., Archer, K. J., Yanek, K., Gibney, E. M., King, A. L., Cotterell, A., Fisher, R. A. and Posner, M. P. (2008). "Molecular pathways involved in loss of kidney graft function with tubular atrophy and interstitial fibrosis." Molecular Medicine (Cambridge, Mass.) **14**(5-6): 276-285.
- Mao, Q., Terasaki, P. I., Cai, J., Briley, K., Catrou, P., Haisch, C. and Rebellato, L. (2007). "Extremely high association between appearance of HLA antibodies and failure of kidney grafts in a five-year longitudinal study." Am J Transplant **7**(4): 864-71.
- Maragkakis, M., Alexiou, P., *et al.* (2009). "Accurate microRNA target prediction correlates with protein repression levels." BMC Bioinformatics **10**: 295.
- Marfo, K., Lu, A., Ling, M. and Akalin, E. (2011). "Desensitization protocols and their outcome." Clin J Am Soc Nephrol **6**(4): 922-36.
- Martin, M. M., Lee, E. J., Buckenberger, J. A., Schmittgen, T. D. and Elton, T. S. (2006). "MicroRNA-155 regulates human angiotensin II type 1 receptor expression in fibroblasts." J Biol Chem **281**(27): 18277-84.
- Martinez-Llordella, M., Puig-Pey, I., *et al.* (2007). "Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation." Am J Transplant **7**(2): 309-19.
- Mas, V., Maluf, D., *et al.* (2007). "Establishing the molecular pathways involved in chronic allograft nephropathy for testing new noninvasive diagnostic markers." Transplantation **83**(4): 448-57.
- Masaki, S., Ohtsuka, R., Abe, Y., Muta, K. and Umemura, T. (2007). "Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis." Biochem Biophys Res Commun **364**(3): 509-14.
- Mathonnet, G., Fabian, M. R., *et al.* (2007). "MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F." Science **317**(5845): 1764-7.
- Mauviyyedi, S., Pelle, P. D., *et al.* (2001). "Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries." J Am Soc Nephrol **12**(3): 574-82.
- Mauri, C. and Ehrenstein, M. R. (2008). "The 'short' history of regulatory B cells." Trends Immunol **29**(1): 34-40.
- Maziere, P. and Enright, A. J. (2007). "Prediction of microRNA targets." Drug Discov Today **12**(11-12): 452-8.
- Mehra, M. R., Kobashigawa, J. A., *et al.* (2008). "Clinical implications and longitudinal alteration of peripheral blood transcriptional signals indicative of future cardiac allograft rejection." J Heart Lung Transplant **27**(3): 297-301.
- Meier-Kriesche, H. U., Schold, J. D., Srinivas, T. R. and Kaplan, B. (2004). "Lack of improvement in renal allograft survival despite a marked decrease in acute rejection rates over the most recent era." Am J Transplant **4**(3): 378-83.
- Merkerova, M., Belickova, M. and Bruchova, H. (2008a). "Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages." European Journal of Haematology **81**(4): 304-10.
- Merkerova, M., Belickova, M. and Bruchova, H. (2008b). "Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages." Eur J Haematol **81**(4): 304-10.

- Mestdagh, P., Feys, T., Bernard, N., Guenther, S., Chen, C., Speleman, F. and Vandesompele, J. (2008). "High-throughput stem-loop RT-qPCR miARN expression profiling using minute amounts of input RNA." Nucleic Acids Res **36**(21): e143.
- Millan, M. T., Shizuru, J. A., *et al.* (2002). "Mixed chimerism and immunosuppressive drug withdrawal after HLA-mismatched kidney and hematopoietic progenitor transplantation." Transplantation **73**(9): 1386-91.
- Miranda, K. C., Huynh, T., Tay, Y., Ang, Y. S., Tam, W. L., Thomson, A. M., Lim, B. and Rigoutsos, I. (2006). "A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes." Cell **126**(6): 1203-17.
- Mitchell, P. S., Parkin, R. K., *et al.* (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(30): 10513-8.
- Moraes-Vieira, P. M., Silva, H. M., Takenaka, M. C., Monteiro, S. M., Lemos, F., Saitovitch, D., Kalil, J. and Coelho, V. (2010). "Differential monocyte STAT6 activation and CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) T cells in kidney operational tolerance transplanted individuals." Hum Immunol **71**(5): 442-50.
- Morris, P. J. (2004). "Transplantation--a medical miracle of the 20th century." N Engl J Med **351**(26): 2678-80.
- Nadazdin, O., Boskovic, S., *et al.* (2011). "Host alloreactive memory T cells influence tolerance to kidney allografts in nonhuman primates." Sci Transl Med **3**(86): 86ra51.
- Nankivell, B. J., Borrows, R. J., Fung, C. L., O'Connell, P. J., Allen, R. D. and Chapman, J. R. (2003). "The natural history of chronic allograft nephropathy." N Engl J Med **349**(24): 2326-33.
- Newell, K. A., Asare, A., *et al.* (2010). "Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans." J Clin Invest **120**(6): 1836-47.
- Nottrott, S., Simard, M. J. and Richter, J. D. (2006). "Human let-7a miARN blocks protein production on actively translating polyribosomes." Nat Struct Mol Biol **13**(12): 1108-14.
- Nuovo, G. J. (2008). "In situ detection of precursor and mature microRNAs in paraffin embedded, formalin fixed tissues and cell preparations." Methods **44**(1): 39-46.
- Oba, S., Kumano, S., *et al.* (2010). "miR-200b precursor can ameliorate renal tubulointerstitial fibrosis." PLoS One **5**(10): e13614.
- Okamura, K., Liu, N. and Lai, E. C. (2009). "Distinct mechanisms for microRNA strand selection by *Drosophila* Argonautes." Mol Cell **36**(3): 431-44.
- Okamura, K., Phillips, M. D., Tyler, D. M., Duan, H., Chou, Y. T. and Lai, E. C. (2008). "The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution." Nat Struct Mol Biol **15**(4): 354-63.
- Olsen, P. H. and Ambros, V. (1999). "The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation." Dev Biol **216**(2): 671-80.
- Opelz, G. and Dohler, B. (2007). "Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival: comparative analysis of two decades." Transplantation **84**(2): 137-43.
- Opelz, G. and Dohler, B. (2008). "Influence of time of rejection on long-term graft survival in renal transplantation." Transplantation **85**(5): 661-6.
- Orlando, G., Hematti, P., Stratta, R. J., Burke, G. W., 3rd, Cocco, P. D., Pisani, F., Soker, S. and Wood, K. (2010). "Clinical operational tolerance after renal transplantation: current status and future challenges." Ann Surg **252**(6): 915-28.

- Ozsolak, F., Poling, L. L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X. S., Roeder, R. G., Zhang, X., Song, J. S. and Fisher, D. E. (2008). "Chromatin structure analyses identify miARN promoters." Genes Dev **22**(22): 3172-83.
- Pallier, A., Hillion, S., *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 Int **78**(5): 503-13.
- Pandey, P., Brors, B., Srivastava, P. K., Bott, A., Boehn, S. N., Groene, H. J. and Gretz, N. (2008). "Microarray-based approach identifies microRNAs and their target functional patterns in polycystic kidney disease." BMC Genomics **9**: 624.
- Pandey, P., Qin, S., Ho, J., Zhou, J. and Kreidberg, J. A. (2011). "Systems biology approach to identify transcriptome reprogramming and candidate microRNA targets during the progression of polycystic kidney disease." BMC Syst Biol **5**: 56.
- Park, W. D. and Stegall, M. D. (2007). "A meta-analysis of kidney microarray datasets: investigation of cytokine gene detection and correlation with rt-PCR and detection thresholds." BMC Genomics **8**: 88.
- Pascual, M., Theruvath, T., Kawai, T., Tolkoff-Rubin, N. and Cosimi, A. B. (2002). "Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation." N Engl J Med **346**(8): 580-90.
- Pasquinelli, A. E., Reinhart, B. J., *et al.* (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." Nature **408**(6808): 86-9.
- Pauley, K. M., Satoh, M., Chan, A. L., Bubb, M. R., Reeves, W. H. and Chan, E. K. (2008). "Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients." Arthritis Res Ther **10**(4): R101.
- Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J. and Sharp, P. A. (2006). "Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells." Mol Cell **21**(4): 533-42.
- Place, R. F., Li, L. C., Pookot, D., Noonan, E. J. and Dahiya, R. (2008). "MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(5): 1608-13.
- Poirier, N., Azimzadeh, A. M., *et al.* (2010). "Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation." Sci Transl Med **2**(17): 17ra10.
- Porcheray, F., Wong, W., *et al.* (2009). "B-cell immunity in the context of T-cell tolerance after combined kidney and bone marrow transplantation in humans." Am J Transplant **9**(9): 2126-35.
- Raver-Shapira, N., Marciano, E., Meiri, E., Spector, Y., Rosenfeld, N., Moskovits, N., Bentwich, Z. and Oren, M. (2007). "Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis." Mol Cell **26**(5): 731-43.
- Ravetch JV et Lanier LL (2000). "Immune inhibitory receptors." Science **290**(5489):84-9.
- Reinhart, B. J., Slack, F. J., Basson, M., Pasquinelli, A. E., Bettinger, J. C., Rougvie, A. E., Horvitz, H. R. and Ruvkun, G. (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." Nature **403**(6772): 901-6.
- Reinsmoen, N. L., Lai, C. H., *et al.* (2010). "Anti-angiotensin type 1 receptor antibodies associated with antibody mediated rejection in donor HLA antibody negative patients." Transplantation **90**(12): 1473-7.

- Reinsmoen, N. L., Lai, C. H., Vo, A., Cao, K., Ong, G., Naim, M., Wang, Q. and Jordan, S. C. (2008). "Acceptable donor-specific antibody levels allowing for successful deceased and living donor kidney transplantation after desensitization therapy." Transplantation **86**(6): 820-5.
- Robbiani, D. F., Bunting, S., *et al.* (2009). "AID produces DNA double-strand breaks in non-Ig genes and mature B cell lymphomas with reciprocal chromosome translocations." Mol Cell **36**(4): 631-41.
- Rödter, S., Scherer, A., Raulf, F., Berthier, C. C., Hertig, A., Couzi, L., Durrbach, A., Rondeau, E. and Marti, H. P. (2009). "Renal allografts with IF/TA display distinct expression profiles of metzincins and related genes." Am J Transplant **9**(3): 517-26.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L. and Bradley, A. (2004). "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units." Genome Res **14**(10A): 1902-10.
- Rodriguez, A., Vigorito, E., *et al.* (2007). "Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function." Science **316**(5824): 608-11.
- Rouas, R., Fayyad-Kazan, H., *et al.* (2009). "Human natural Treg microRNA signature: role of microRNA-31 and microRNA-21 in FOXP3 expression." Eur J Immunol **39**(6): 1608-18.
- Roussey-Kesler, G., Giral, M., Moreau, A., Subra, J. F., Legendre, C., Noel, C., Pillebout, E., Brouard, S. and Soulillou, J. P. (2006). "Clinical operational tolerance after kidney transplantation." Am J Transplant **6**(4): 736-46.
- Sagoo, P., Ali, N., Garg, G., Nestle, F. O., Lechler, R. I. and Lombardi, G. (2011). "Human regulatory T cells with alloantigen specificity are more potent inhibitors of alloimmune skin graft damage than polyclonal regulatory T cells." Sci Transl Med **3**(83): 83ra42.
- Sagoo, P., Perucha, E., *et al.* (2010). "Development of a cross-platform biomarker signature to detect renal transplant tolerance in humans." J Clin Invest **120**(6): 1848-61.
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J. M., Chuang, J. C., Coetzee, G. A. and Jones, P. A. (2006). "Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells." Cancer Cell **9**(6): 435-43.
- Sayegh, M. H., Fine, N. A., Smith, J. L., Rennke, H. G., Milford, E. L. and Tilney, N. L. (1991). "Immunologic tolerance to renal allografts after bone marrow transplants from the same donors." Ann Intern Med **114**(11): 954-5.
- Scandling, J. D., Busque, S., *et al.* (2008). "Tolerance and chimerism after renal and hematopoietic-cell transplantation." N Engl J Med **358**(4): 362-8.
- Schanen, B. C. and Li, X. (2011). "Transcriptional regulation of mammalian miARN genes." Genomics **97**(1): 1-6.
- Scherer, A., Krause, A., Walker, J. R., Korn, A., Niese, D. and Raulf, F. (2003). "Early prognosis of the development of renal chronic allograft rejection by gene expression profiling of human protocol biopsies." Transplantation **75**(8): 1323-30.
- Schmitter, D., Filkowski, J., Sewer, A., Pillai, R. S., Oakeley, E. J., Zavolan, M., Svoboda, P. and Filipowicz, W. (2006). "Effects of Dicer and Argonaute down-regulation on mRNA levels in human HEK293 cells." Nucleic Acids Res **34**(17): 4801-15.
- Schott, J. and Stoecklin, G. (2010). "Networks controlling mRNA decay in the immune system." Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA **1**(3): 432-456.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N. and Zamore, P. D. (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." Cell **115**(2): 199-208.

- Selbach, M., Schwanhauser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R. and Rajewsky, N. (2008). "Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs." *Nature* **455**(7209): 58-63.
- Sellers, M. T., Deierhoi, M. H., Curtis, J. J., Gaston, R. S., Julian, B. A., Lanier, D. C., Jr. and Diethelm, A. G. (2001). "Tolerance in renal transplantation after allogeneic bone marrow transplantation-6-year follow-up." *Transplantation* **71**(11): 1681-3.
- Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E. and Ambros, V. (2004). "Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation." *Genome Biol* **5**(3): R13.
- Sheedy, F. J., Palsson-McDermott, E., Hennessy, E. J., Martin, C., O'Leary, J. J., Ruan, Q., Johnson, D. S., Chen, Y. and O'Neill, L. A. (2010). "Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21." *Nat Immunol* **11**(2): 141-7.
- Shi, S., Yu, L., *et al.* (2008). "Podocyte-selective deletion of dicer induces proteinuria and glomerulosclerosis." *J Am Soc Nephrol* **19**(11): 2159-69.
- Singh, N. (2005). "Infectious complications in organ transplant recipients with the use of calcineurin-inhibitor agent-based immunosuppressive regimens." *Curr Opin Infect Dis* **18**(4): 342-5.
- Sis, B., Jhangri, G. S., Bunnag, S., Allanach, K., Kaplan, B. and Halloran, P. F. (2009). "Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining." *Am J Transplant* **9**(10): 2312-23.
- Sis, B., Mengel, M., *et al.* (2010). "Banff '09 meeting report: antibody mediated graft deterioration and implementation of Banff working groups." *Am J Transplant* **10**(3): 464-71.
- Solez, K., Colvin, R. B., *et al.* (2007). "Banff '05 Meeting Report: differential diagnosis of chronic allograft injury and elimination of chronic allograft nephropathy ('CAN')." *Am J Transplant* **7**(3): 518-26.
- Sonkoly, E. and Pivarcsi, A. (2009). "microRNAs in inflammation." *Int Rev Immunol* **28**(6): 535-61.
- Sorof, J. M., Koerper, M. A., Portale, A. A., Potter, D., DeSantes, K. and Cowan, M. (1995). "Renal transplantation without chronic immunosuppression after T cell-depleted, HLA-mismatched bone marrow transplantation." *Transplantation* **59**(11): 1633-5.
- Spender, L. C., O'Brien, D. I., Simpson, D., Dutt, D., Gregory, C. D., Allday, M. J., Clark, L. J. and Inman, G. J. (2009). "TGF-beta induces apoptosis in human B cells by transcriptional regulation of BIK and BCL-XL." *Cell Death Differ* **16**(4): 593-602.
- Spierings, D. C., McGoldrick, D., Hamilton-Easton, A. M., Neale, G., Murchison, E. P., Hannon, G. J., Green, D. R. and Withoff, S. (2011). "Ordered progression of stage-specific miARN profiles in the mouse B2 B-cell lineage." *Blood* **117**(20): 5340-9.
- Spitzer, T. R., Delmonico, F., *et al.* (1999). "Combined histocompatibility leukocyte antigen-matched donor bone marrow and renal transplantation for multiple myeloma with end stage renal disease: the induction of allograft tolerance through mixed lymphohematopoietic chimerism." *Transplantation* **68**(4): 480-4.
- Stallone, G., Schena, A., *et al.* (2005). "Sirolimus for Kaposi's sarcoma in renal-transplant recipients." *N Engl J Med* **352**(13): 1317-23.
- Stanczyk, J., Pedrioli, D. M., Brentano, F., Sanchez-Pernaute, O., Kolling, C., Gay, R. E., Detmar, M., Gay, S. and Kyburz, D. (2008). "Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* **58**(4): 1001-9.
- Starzl, T. E. (2000). "History of clinical transplantation." *World J Surg* **24**(7): 759-82.

- Strober, S., Benike, C., Krishnaswamy, S., Engleman, E. G. and Grumet, F. C. (2000). "Clinical transplantation tolerance twelve years after prospective withdrawal of immunosuppressive drugs: studies of chimerism and anti-donor reactivity." Transplantation **69**(8): 1549-54.
- Strober, S., Dhillon, M., *et al.* (1989). "Acquired immune tolerance to cadaveric renal allografts. A study of three patients treated with total lymphoid irradiation." N Engl J Med **321**(1): 28-33.
- Sui, W., Dai, Y., Huang, Y., Lan, H., Yan, Q. and Huang, H. (2008). "Microarray analysis of MicroRNA expression in acute rejection after renal transplantation." Transpl Immunol **19**(1): 81-5.
- Sun, W., Shen, W., Yang, S., Hu, F., Li, H. and Zhu, T. H. (2010). "miR-223 and miR-142 attenuate hematopoietic cell proliferation, and miR-223 positively regulates miR-142 through LMO2 isoforms and CEBP-beta." Cell Res **20**(10): 1158-69.
- Sun, Y., Varambally, S., *et al.* (2011). "Targeting of microRNA-142-3p in dendritic cells regulates endotoxin-induced mortality." Blood **117**(23): 6172-83.
- Supon, P., Constantino, D., Hao, P., Cagle, L., Hahn, A., Conti, D. J. and Freed, B. M. (2001). "Prevalence of donor-specific anti-HLA antibodies during episodes of renal allograft rejection." Transplantation **71**(4): 577-80.
- Tanaka, K. and Kasahara, M. (1998). "The MHC class I ligand-generating system: roles of immunoproteasomes and the interferon-gamma-inducible proteasome activator PA28." Immunol Rev **163**: 161-76.
- Tay, S. C., van Riet, R., Kazunari, T., Amrami, K. K., An, K. N. and Berger, R. A. (2010). "In-vivo kinematic analysis of forearm rotation using helical axis analysis." Clin Biomech (Bristol, Avon) **25**(7): 655-9.
- Thai, T. H., Calado, D. P., *et al.* (2007). "Regulation of the germinal center response by microRNA-155." Science **316**(5824): 604-8.
- Thaunat, O., Legendre, C., Morelon, E., Kreis, H. and Mamzer-Bruneel, M.-F. (2007). "To biopsy or not to biopsy? Should we screen the histology of stable renal grafts?" Transplantation **84**(6): 671-6.
- Thervet, E., Zuber, J., Sberro, R., Canaud, G., Anglicheau, D., Snanoudj, R., Mamzer-Bruneel, M. F., Martinez, F. and Legendre, C. (2011). "[Immunosuppressive treatments: Mechanisms of action and clinical use.]." Nephrol Ther.
- Tili, E., Croce, C. M. and Michaille, J. J. (2009). "miR-155: on the crosstalk between inflammation and cancer." Int Rev Immunol **28**(5): 264-84.
- Torrealba, J. R., Katayama, M., *et al.* (2004). "Metastable tolerance to rhesus monkey renal transplants is correlated with allograft TGF-beta 1+CD4+ T regulatory cell infiltrates." J Immunol **172**(9): 5753-64.
- Trivedi, H. L., Terasaki, P. I., *et al.* (2010). "Clonal deletion with bortezomib followed by low or no maintenance immunosuppression in renal allograft recipients." Transplantation **90**(2): 221-2.
- Tu, W., Lau, Y. L., Zheng, J., Liu, Y., Chan, P. L., Mao, H., Dionis, K., Schneider, P. and Lewis, D. B. (2008). "Efficient generation of human alloantigen-specific CD4+ regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells." Blood **112**(6): 2554-62.
- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A. and Burwinkel, B. (2011). "Characterization of extracellular circulating microRNA." Nucleic Acids Res.
- Valoczi, A., Hornyik, C., Varga, N., Burgyan, J., Kauppinen, S. and Havelda, Z. (2004). "Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes." Nucleic Acids Res **32**(22): e175.

- Valujskikh, A. and Lakkis, F. G. (2003). "In remembrance of things past: memory T cells and transplant rejection." Immunol Rev **196**: 65-74.
- VanBuskirk, A. M., Burlingham, W. J., Jankowska-Gan, E., Chin, T., Kusaka, S., Geissler, F., Pelletier, R. P. and Orosz, C. G. (2000). "Human allograft acceptance is associated with immune regulation." J Clin Invest **106**(1): 145-55.
- Vasudevan, S., Tong, Y. and Steitz, J. A. (2007). "Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation." Science **318**(5858): 1931-4.
- Vigorito, E., Perks, K. L., *et al.* (2007). "microRNA-155 regulates the generation of immunoglobulin class-switched plasma cells." Immunity **27**(6): 847-59.
- Vitale, G., Mion, F. and Pucillo, C. (2010). "Regulatory B cells: evidence, developmental origin and population diversity." Mol Immunol **48**(1-3): 1-8.
- Wang, B., Li, S., Qi, H. H., Chowdhury, D., Shi, Y. and Novina, C. D. (2009). "Distinct passenger strand and mRNA cleavage activities of human Argonaute proteins." Nat Struct Mol Biol **16**(12): 1259-66.
- Wang, G., Kwan, B. C., Lai, F. M., Choi, P. C., Chow, K. M., Li, P. K. and Szeto, C. C. (2010a). "Intrarenal expression of microRNAs in patients with IgA nephropathy." Lab Invest **90**(1): 98-103.
- Wang, G., Tam, L. S., Li, E. K., Kwan, B. C., Chow, K. M., Luk, C. C., Li, P. K. and Szeto, C. C. (2010b). "Serum and urinary cell-free MiR-146a and MiR-155 in patients with systemic lupus erythematosus." J Rheumatol **37**(12): 2516-22.
- Wang, H., Arp, J., *et al.* (2007). "Inhibition of terminal complement components in presensitized transplant recipients prevents antibody-mediated rejection leading to long-term graft survival and accommodation." J Immunol **179**(7): 4451-63.
- Watson, C. J., Bradley, J. A., *et al.* (2005). "Alemtuzumab (CAMPATH 1H) induction therapy in cadaveric kidney transplantation--efficacy and safety at five years." Am J Transplant **5**(6): 1347-53.
- Weaver, T. A., Charafeddine, A. H., *et al.* (2009). "Alefacept promotes co-stimulation blockade based allograft survival in nonhuman primates." Nat Med **15**(7): 746-9.
- Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., Galas, D. J. and Wang, K. (2010). "The microRNA spectrum in 12 body fluids." Clin Chem **56**(11): 1733-41.
- Wei, Q., Bhatt, K., He, H. Z., Mi, Q. S., Haase, V. H. and Dong, Z. (2010). "Targeted deletion of Dicer from proximal tubules protects against renal ischemia-reperfusion injury." J Am Soc Nephrol **21**(5): 756-61.
- Wightman, B., Ha, I. and Ruvkun, G. (1993). "Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*." Cell **75**(5): 855-62.
- Wolf, S. D., Dittel, B. N., Hardardottir, F. and Janeway, C. A., Jr. (1996). "Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice." J Exp Med **184**(6): 2271-8.
- Worthington, J. E., Martin, S., Al-Husseini, D. M., Dyer, P. A. and Johnson, R. W. (2003). "Posttransplantation production of donor HLA-specific antibodies as a predictor of renal transplant outcome." Transplantation **75**(7): 1034-40.
- Wu, H., Neilson, J. R., Kumar, P., Manocha, M., Shankar, P., Sharp, P. A. and Manjunath, N. (2007). "miARN profiling of naive, effector and memory CD8 T cells." PLoS One **2**(10): e1020.
- Wu, L., Cai, C., Wang, X., Liu, M., Li, X. and Tang, H. (2011). "MicroRNA-142-3p, a new regulator of RAC1, suppresses the migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells." FEBS Lett **585**(9): 1322-30.

- Wu, L., Fan, J. and Belasco, J. G. (2006). "MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(11): 4034-9.
- Wu, Z., Bensinger, S. J., *et al.* (2004). "Homeostatic proliferation is a barrier to transplantation tolerance." Nat Med **10**(1): 87-92.
- Yang, J., Brook, M. O., Carvalho-Gaspar, M., Zhang, J., Ramon, H. E., Sayegh, M. H., Wood, K. J., Turka, L. A. and Jones, N. D. (2007). "Allograft rejection mediated by memory T cells is resistant to regulation." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(50): 19954-9.
- Yi, R., Doehle, B. P., Qin, Y., Macara, I. G. and Cullen, B. R. (2005). "Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs." RNA **11**(2): 220-6.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. and Cullen, B. R. (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Genes Dev **17**(24): 3011-6.
- Zarjou, A., Yang, S., Abraham, E., Agarwal, A. and Liu, G. (2011). "Identification of a microRNA signature in renal fibrosis: Role of miR-21." Am J Physiol Renal Physiol.
- Zhang, Y., Liu, D., *et al.* (2010). "Secreted monocytic miR-150 enhances targeted endothelial cell migration." Mol Cell **39**(1): 133-44.
- Zhdanova, O., Srivastava, S., *et al.* (2011). "The inducible deletion of Drosha and microRNAs in mature podocytes results in a collapsing glomerulopathy." Kidney Int.
- Zheng, J., Liu, Y., Lau, Y. L. and Tu, W. (2010). "CD40-activated B cells are more potent than immature dendritic cells to induce and expand CD4(+) regulatory T cells." Cell Mol Immunol **7**(1): 44-50.
- Zhou, X., Bailey-Bucktrout, S. L., Jeker, L. T., Penaranda, C., Martinez-Llordella, M., Ashby, M., Nakayama, M., Rosenthal, W. and Bluestone, J. A. (2009). "Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo." Nat Immunol **10**(9): 1000-7.
- Zoller, K. M., Cho, S. I., Cohen, J. J. and Harrington, J. T. (1980). "Cessation of immunosuppressive therapy after successful transplantation: a national survey." Kidney Int **18**(1): 110-4.

Annexes

Annexe 1

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

Ashton-Chess, J.; Mai, H. L.; Jovanovic, V.; Renaudin, K.; Foucher, Y.; Giral, M.; Moreau, A.; Dugast, E.; Mengel, M.; Racape, M.; **Danger, R.**; Usal, C.; Smit, H.; Guillet, M.; Gwinner, W.; Le Berre, L.; Dantal, J.; Soulillou, J. P.; Brouard, S.

Kidney International (2010)

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, ITERT, 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

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

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.

Annexe 2

Rationale and criteria of eligibility for calcineurin inhibitor interruption following kidney transplantation.

Danger R, Giral M, Souillou JP, Brouard S.

Curr Opin Organ Transplant. 2008 Dec;13(6):609-13.

Rationale and criteria of eligibility for calcineurin inhibitor interruption following kidney transplantation

Richard Danger^{a,b}, Magali Giral^b, Jean-Paul Souillou^b and Sophie Brouard^a

^aINSERM U643 and ^bCHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITRT Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France

Correspondence to Jean-Paul Souillou, INSERM U643, 30 Bd Jean Monnet, F-44093 Nantes Cedex 1, France
Tel: +33 2 40 08 74 10; fax: +33 2 40 08 74 11;
e-mail: Jean-Paul.Souillou@univ-nantes.fr

Current Opinion in Organ Transplantation 2008, 13:609–613

Purpose of review

To summarize predictive low-risk parameters of renal allograft recipients for purposes of improving the initiation of calcineurin inhibitor withdrawal protocols.

Recent findings

Clinical trials have demonstrated the potential global benefit of calcineurin inhibitor interruption protocols on graft survival despite being associated with an increased rate of acute rejection episodes, thus underlying a number of risk factors. Recent identification or confirmation of variables updating the list of parameters and molecular markers that can be used to predict graft outcome are described.

Summary

The effect of calcineurin inhibitor withdrawal on long-term graft and recipient survival patterns is assessed in relation to the large number of calcineurin inhibitor-related side-effects. However, current protocols are based on empirical observations and there is a clear requirement for reliable parameters to define patient eligibility for calcineurin inhibitor weaning procedures. Here, we review biological, clinical and genetic parameters that can be used as predictive markers of long-term graft outcome and could serve as criteria for patient selection in calcineurin inhibitor weaning protocols.

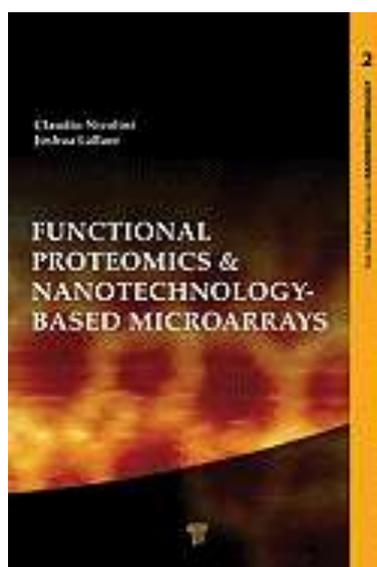
Keywords

calcineurin inhibitor withdrawal, immunosuppression, kidney transplant, predictor, rejection

Curr Opin Organ Transplant 13:609–613
© 2008 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins
1087-2418

Annexe 3

Chapter 10: Organ transplants and gene microarrays,
In: Functional Proteomics and Nanotechnology-based Microarrays, (Eds. Nicolini C.,
LaBaer J.) Pan Stanford Series on Nanobiotechnology Volume 2,
pp. 229-256, 2010, London - New York - Singapore.
Danger R., Soullillou J.P., Brouard S., Nicolini C.



CHAPTER 10

ORGAN TRANSPLANTS AND GENE MICROARRAYS

Richard Danger^{1,2}, Jean-Paul Soulillou^{1,2},
Sophie Brouard^{1,2,§} and Claudio Nicolini^{3,4,§}

¹*Institut National de la Santé Et de la Recherche Médicale (INSERM) –
Université de Nantes, UMR 643, CHU Nantes, 30 bd Jean Monnet,
44093 Nantes, France*

²*Institut de Transplantation Et de Recherche en Transplantation (ITERT),
CHU-Hotel Dieu, Nantes, France*

³*Nanoworld Institute and Eminent Biophysics Chair, University of Genova,
Corso Europa 30, Genova 16132, Italy*

⁴*Fondazione El.B.A., Piazza SS. Apostoli 66, Rome, Italy*

Application of Microarrays Technology to organ transplantation in human with the aid of statistical and non-statistical analysis, including interaction-based methods, is reviewed here.

10.1 Introduction

Organ transplantation is the treatment of choice for end stage diseases, improving both the patient's quality of life and survival, mainly thanks to advances in HLA knowledge and immunosuppressive treatment occurred in 80–90's (Sayegh and Carpenter 2004). In 2006, a total of 27,578 organ transplantations have been done in United States and 4,428 in France (ABM 2009; Wolfe *et al.*, 2009). Among all the transplantation performed (kidney, heart, lung, liver, ...), the incidence of rejection episodes is still a problem. Acute rejection episodes (ARE) can reach a percentage of 55% of lung transplant recipients during the first year post-transplantation (Trulock *et al.*, 2007) and is still the causes of 12% of

[§] Both authors contributed equally to this work

Annexe 4

What can we learn from the transcriptional characterization of spontaneously tolerant transplant recipients?

Danger R, Racapé M, Souillou JP and Brouard S.

Current Opinion in Organ Transplantation (2010)

What can we learn from the transcriptional characterization of spontaneously tolerant transplant recipients?

Richard Danger^{a,b,*}, Maud Racapé^{a,b,*}, Jean-Paul Souillou^{b,c} and Sophie Brouard^a

^aINSERM U643, ^bUniversité de Nantes, Faculté de Médecine and ^cCHU Nantes, Institut de Transplantation et de Recherche en Transplantation, ITERT, Nantes, France

Correspondence to Dr Sophie Brouard, INSERM U643-ITERT, 30, Bd Jean Monnet, 44093 Nantes Cedex 1, France
Tel: +33 2 40 08 78 42; fax: +33 2 40 08 74 11;
e-mail: Sophie.Brouard@univ-nantes.fr

* R.D. and M.R. contributed equally to this work.

Current Opinion in Organ Transplantation 2010, 15:435–440

Purpose of review

Even if improvements of immunosuppressive treatments enabled to prevent acute rejection in solid organ transplantation, current immunosuppressive regimens are implicated in long-term side effects without the resolution of chronic rejection. Thus, during last years, research focused mainly on immunosuppression weaning off studies based on individualized follow-up of patients. Beyond animal models, studies have been emphasized by descriptions of a particular group of transplant patients displaying an operational tolerance in the absence of immunosuppressive treatments. Herein we will review recent advances in transcriptional characterization of spontaneously tolerant transplant recipients.

Recent findings

Transcriptomic profiling in the blood of these so-called 'operationally tolerant' patients succeeded to establish tolerance footprint that could be used to detect a tolerance profile among transplanted patients under immunosuppression, in order to adapt their treatment and eventually wean off them.

Summary

The advent of this field raise questions about how to blend and cross transcriptomic studies in the different areas of transplantation, how to use such set of genes to have a clear view of the graft status at a given time and what will be their contributions.

Keywords

immunosuppression weaning off, solid organ transplantation, tolerance, transcriptomic profiling

Curr Opin Organ Transplant 15:435–440
© 2010 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins
1087-2418

Annexe 5

Comparison of transcriptional and blood cell phenotypic markers between operationally tolerant liver and kidney recipients

Lozano, J. J., Pallier, A., Martínez-Llordella, M., Danger, R., López, M., Giral, M., Londoño, M. C., Rimola, A., Soullillou, J. P., Brouard, S.

American Journal of Transplantation (2011)

American Journal of Transplantation 2011; 11: 1916–1926
Wiley Periodicals Inc.

© 2011 The Authors
Journal compilation © 2011 The American Society of
Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons

doi: 10.1111/j.1600-6143.2011.03638.x

Comparison of Transcriptional and Blood Cell-Phenotypic Markers Between Operationally Tolerant Liver and Kidney Recipients

J. J. Lozano^a, A. Pallier^b, M. Martínez-Llordella^c,
R. Danger^b, M. López^c, M. Giral^{b,d},
M. C. Londoño^e, A. Rimola^e, J. P. Soullillou^{b,d,e},
S. Brouard^{b,†}, and A. Sánchez-Fueyo^{a,*†}

^aPlataforma de Bioinformática, CIBEREHD, Hospital
Clínic, Barcelona, Spain

^bInstitut National de la Santé Et de la Recherche Médicale
INSERM U643, and Institut de Transplantation Urologie,
Néphrologie, Nantes, F-44093 France

^cLiver Transplant Unit, Hospital Clínic, IDIBAPS,
CIBEREHD, Barcelona, Spain

^dCentre Hospitalier Universitaire Hôtel Dieu Nantes,
Nantes, F-44000 France

^eUniversité de NANTES, Faculté de médecine, Nantes,
F-44000 France

*Corresponding author: A. Sánchez-Fueyo,
afueyo@clinic.ub.es

†S.B and A.S-F share senior authorship.

A proportion of transplant recipients can spontaneously accept their grafts in the absence of immunosuppression (operational tolerance). Previous studies identified blood transcriptional and cell-phenotypic markers characteristic of either liver or kidney tolerant recipients. However, the small number of patients analyzed and the use of different transcriptional platforms hampered data interpretation. In this study we directly compared samples from kidney and liver tolerant recipients in order to identify potential similarities in immune-related parameters. Liver and kidney tolerant recipients differed in blood expression and B-cell immunophenotypic patterns and no significant overlaps were detectable between them. Whereas some recipients coincided in specific NK-related transcripts, this observation was not reproducible in all cohorts analyzed. Our results reveal that certain immune features, but not others, are consistently present across all cohorts of operationally tolerant recipients. This provides a set of reproducible biomarkers that should be explored in future large-scale immunomonitoring trials.

Key words: Gene expression, kidney transplantation, liver transplantation, operational tolerance, tolerance

Abbreviations: NK, natural killer; NKT, natural killer T cells; Bm, mature B cell; K-Tol, tolerant kidney recipients; K-Sta, kidney recipients under maintenance

immunosuppression; K-CR, kidney recipients with immunologically-mediated chronic rejection; L-Tol, tolerant liver recipients; L-NonTOL, nontolerant liver recipients under maintenance immunosuppression; HV, nontransplanted healthy individuals; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; GEO, gene expression omnibus; SAM, significant analysis of microarrays; PAM, predictive analysis of microarrays; FDR, false discovery rate; GSEA, gene set enrichment analysis; KEGG, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; PANTHER, protein analysis through evolutionary relationships.

Received 27 December 2010, revised 03 May 2011 and accepted for publication 10 May 2011

Introduction

In contrast to the intentional induction of allograft tolerance, which has been rarely accomplished in clinical transplantation (1,2), "spontaneous" long-term acceptance of transplanted organs following discontinuation of conventional immunosuppression has been much more frequently observed (3,4). This state is commonly referred to as spontaneous operational tolerance and is particularly prevalent in liver transplantation, where a sizable proportion of stable recipients could probably cease all immunosuppression without compromising the graft's viability (3,5,6). In recent years, considerable efforts have been devoted to the identification of noninvasive biomarkers of operational tolerance in kidney and liver transplantation (7–20). Several of these studies have employed blood cell immunophenotyping and gene expression profiling to search for immune parameters associated with tolerance (7–9,18,19). This has resulted in the identification of characteristic expression and cell-phenotypic traits that distinguish tolerant patients from stable recipients under immunosuppression and sometimes from age-matched healthy individuals as well. Thus, blood samples from tolerant liver recipients are enriched in NK and $\gamma\delta$ T cells and in innate immunity-related transcripts (8,21). In contrast, blood samples collected from tolerant kidney recipients exhibit an expansion of peripheral blood B cells and related transcripts (13,18–20). The mechanistic interpretation of these findings is however challenging. First, whether the peripheral blood compartment is representative of intra-graft immune responses is unknown.

Expression des microARN dans le sang de patients transplantés rénaux

Résumé : L'absence de réponse des patients atteints de rejet chronique médié par les anticorps (RCHA) aux traitements classiques démontre le besoin urgent de nouvelles options thérapeutiques. Par ailleurs, l'établissement d'une tolérance aux allogreffes rénales sans recours aux immunosuppresseurs est nécessaire pour éviter leurs effets secondaires. Une meilleure compréhension des mécanismes post-greffe est nécessaire tout comme le besoin de biomarqueurs pour prédire/diagnostiquer le devenir du greffon et distinguer parmi des patients sous traitement ceux pour lesquels il pourrait être arrêté, appelés patients «opérationnellement tolérants». Nous avons comparé les caractéristiques des lymphocytes B périphériques de ces deux groupes de patients à des patients ayant une fonction stable de leur greffon sous immunosuppresseurs et à des individus sains. Les patients tolérants présentent un phénotype B sanguin et l'expression de gènes particuliers qui pourraient contribuer à la maintenance de leur tolérance. Parmi les molécules régulant l'expression de gènes, les microARN ont été impliqués dans des mécanismes biologiques et pathologiques. La mesure d'expression des microARN dans les cellules mononuclées du sang périphérique de patients transplantés rénaux nous a permis d'identifier des microARN associés à la tolérance ou au RCHA. La surexpression de miR-142-3p dans les lymphocytes B de patients tolérants nous a conduit à analyser les voies de signalisation impliquées, notamment celle du TGF β . Nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension des mécanismes post-greffe, particulièrement celle des lymphocytes B, et l'utilisation de nouveaux biomarqueurs.

Mots-clés : transplantation rénale, tolérance, rejet chronique médié par les anticorps, lymphocytes B, microARN.

microRNA profiling in blood from renal transplanted patients

Abstract: The unresponsiveness of patients undergoing chronic antibody mediated rejection (CAMR) to classical treatment highlight the need for new clinical options. Furthermore, major side-effects of immunosuppression (IS) prompt the establishment of a tolerance to the allograft without the need for IS. In this context, a better understand of post-transplantation mechanisms is required as well as the need for biomarkers that could predict and/or diagnose graft outcome and distinguish among immunosuppressed patients, which ones could be weaned off IS, called "operational tolerants". Here, we compared the characteristics of peripheral B cells from both patient groups, to that of others who had stable graft function but under IS, and to healthy volunteers. Thus, tolerant patients, have a particular blood B-cell phenotype and gene expression modifications that may contribute to the maintenance of their long-term drug free graft function. Among gene expression regulating molecules, microRNA, small non-coding RNA, are involved in biological mechanisms and diseases. We performed microRNA expression profiling from peripheral blood mononuclear cells from kidney transplanted recipients with operational tolerance, with CAMR or with stable graft function. Among them, we identified differentially microRNA associated either with tolerance or CAMR. The over-expression of miR-142-3p in B lymphocytes from tolerant patients lead us to analyze implicated pathways, including TGF β signaling. Our investigations open new perspectives for the understood of post-transplantation mechanisms, particularly with the implications of B lymphocytes, and the use of new diagnostic/prognostic biomarkers.

Keywords: renal transplantation, tolerance, chronic antibody mediated rejection, B lymphocytes, microRNA.