

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE



2003

SCD UNIV.LIMOGES



D 035 112128 5

THESE N° 328 / 1

**Polymorphisme génétique et transplantation rénale :
Etude de quelques gènes de cytokines et du gène FCGR3A**

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Obtenu après soutenance du**

**MEMOIRE
DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES DE BIOLOGIE MEDICALE**

Présenté et soutenu publiquement

Le 26 juin 2003 à l'université Victor Segalen Bordeaux II

Par

Vilaylack SINGPRASITH

24/04/73 à Paksé (Laos)

JURY

M. J. CAMBAR, PU
M. P. MERVILLE, PU
M. J.F. MOREAU, PU
Mme J. COOK-MOREAU, MCU
M. J.L. TAUPIN, MCU

Président
Juge
Juge
Juge
Juge, Directeur de thèse

UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE PHARMACIE

DOYEN DE LA FACULTE

Monsieur le Professeur **HABRIOUX** Gérard

ASSESEURS

Madame le Professeur **CHULIA** Dominique

Monsieur **COMBY** Francis, Maître de Conférences

PROFESSEURS

BENEYTOU Jean-Louis

BIOCHIMIE - BIOLOGIE MOLECULAIRE

BOSGIRAUD Claudine

BACTERIOLOGIE - VIROLOGIE - PARASITOLOGIE

BOTINEAU Michel

BOTANIQUE - CRYPTOLOGAMIE

BROSSARD Claude

PHARMACIE GALENIQUE

BUXERAUD Jacques

CHIMIE ORGANIQUE - CHIMIE THERAPEUTIQUE

CARDOT Philippe

CHIMIE ANALYTIQUE

CHULIA Albert

PHARMACOGNOSIE

CHULIA Dominique

PHARMACIE GALENIQUE

DELAGE Christiane

CHIMIE GENERALE - CHIMIE MINERALE

DREYFUSS Gilles

PARASITOLOGIE

DUROUX Jean-Luc

PHYSIQUE - BIOPHYSIQUE

GHESTEM Axel

BOTANIQUE - CRYPTOLOGAMIE

HABRIOUX Gérard

BIOCHIMIE FONDAMENTALE

LACHATRE Gérard

TOXICOLOGIE

MOESCH Christian

HYGIENE - HYDROLOGIE - ENVIRONNEMENT

LOUDART Nicole

PHARMACODYNAMIE

SECRETAIRE GENERAL DE LA FACULTE - CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS

Madame **ROCHE** Doriane

MAITRES DE CONFERENCES

ALLAIS Daovy	PHARMACOGNOSIE
BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE
BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE
CARDI Patrice	PHYSIOLOGIE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE
COMBY Francis	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DELEBASSEE Sylvie	BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
DREYFUSS Marie-Françoise	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
EA KIM Leng	PHARMACODYNAMIE
FAGNERE Catherine	CHIMIE ORGANIQUE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE
JAMBUT Anne Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE
LAGORCE Jean-François	CHIMIE ORGANIQUE
LARTIGUE Martine	PHARMACODYNAMIE
LIAGRE Bertrand	SCIENCES BIOLOGIQUES
LOTFI Hayat	TOXICOLOGIE
MOREAU Jeanne	IMMUNOLOGIE
PARTOUCHE Christian	PHYSIOLOGIE
ROUSSEAU Annick	PHYSIQUE-INFORMATIQUE
SIMON Alain	CHIMIE PHYSIQUE ET CHIMIE MINERALE
TROUILLAS Patrick	BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
VIANA Marylène	PHARMACIE GALENIQUE
VIGNOLES Philippe	INFORMATIQUE

ASSISTANT

FAURE Monique	PHARMACIE GALENIQUE
---------------	---------------------

PROFESSEUR CERTIFIE

MARBOUTY Jean-Michel	ANGLAIS
----------------------	---------

ATER

POUGET Christelle	CHIMIE THERAPEUTIQUE
RIAHI DEHKORDI Homayoun	PHYSIOLOGIE-PARASITOLOGIE
TALLET Dominique	PHARMACOLOGIE

A notre Président,

Monsieur le Doyen Jean Cambar,

Biologie Cellulaire

Professeur Universitaire

Doyen de la Faculté de Pharmacie-Université Victor Segalen Bordeaux II

Nous sommes très sensibles à l'honneur que vous nous faites en acceptant la présidence du jury.

Soyez assuré de notre considération et de notre profond respect.

A nos juges,

Monsieur Pierre Merville,

*Néphrologie-Transplantation rénale
Professeur Universitaire – Praticien Hospitalier
Chef de service*

Nous vous remercions pour l'aide que vous nous avez proposé au cours de l'élaboration de ce travail.

Vous avez toujours répondu avec gentillesse et patience à toutes nos questions.

Soyez assuré de notre profonde reconnaissance.

Monsieur Jean-François Moreau,

*Immunologie
Professeur Universitaire - Praticien Hospitalier
Chef de service*

Nous vous remercions pour l'honneur que vous nous faites de participer à ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance.

Madame Jeanne Cook-Moreau

Maître de conférences Universitaire

Nous vous sommes reconnaissants d'avoir accepté de juger notre travail.

Soyez assurée de nos sincères remerciements.

Monsieur Jean-Luc Taupin,

Maître de conférences Universitaire - Praticien Hospitalier

Vous nous avez fait l'honneur de diriger ce travail. Par la justesse de vos corrections, vous nous avez permis d'accomplir le travail de rédaction avec toute la rigueur et la persévérance nécessaires. Enfin, nous vous adressons nos sincères remerciements pour le temps que vous avez consacré à la relecture de ce mémoire.

A Stéf et Théa,

Stéf, je te remercie particulièrement pour ta patience et tes solutions de dépannage face à mes « bugs » en informatique et en tout genre.

A ma famille,

A ma sœur,

Je te dédie ce travail.

Pour le courage que tu montres chaque jour face à ta maladie.

Pour les moments difficiles pendant lesquels je n'ai pas pu t'accompagner.

Parceque depuis longtemps tu es confrontée aux pièges et aux bénéfices des immunosuppresseurs.

Et enfin, j'espère que les recherches dans le domaine de l'immunosuppression apporteront des solutions qui pourront permettre un meilleur contrôle du lupus érythémateux disséminé.

A ma belle-famille

A ceux qui m'ont accompagnée tout le long de ce travail,

Armelle, merci pour tes encouragements sans relâche.

Patrick Merel, nous vous remercions pour vos précieux conseils et votre aide en biologie moléculaire.

Aux deux personnes qui sont intervenues au moment opportun, je vous adresse mes sincères remerciements pour votre aide et votre disponibilité :

A Céline qui a participé en grande partie à la mise au point de la technique de génotypage du FCGR3A sur le LightCycler.

A Lionel qui a fourni toutes les données sur les patients et qui a participé à la réalisation de l'analyse statistique.

Nous remercions le laboratoire de Virologie du Pr Fleury pour la mise à disposition des locaux et des appareils de biologie moléculaire.

Aux assistantes du laboratoire d'Immunologie, Johanna et Fella pour leur sympathie.

Table des matières

TABLE DES MATIERES	7
INTRODUCTION	16
GENERALITES	18
1. MECANISME DE RECONNAISSANCE DES ALLOANTIGENES	19
1.1. Nature des alloantigènes	19
1.2. Reconnaissance indirecte et directe	20
1.2.1. Les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles	20
1.3. Reconnaissance indirecte et directe	20
1.3.1. Voie indirecte.....	20
1.3.2. Voie directe.....	21
1.4. Rôle indispensable des signaux de costimulation.....	21
1.5. Mécanismes effecteurs de la lyse cellulaire et de la destruction du greffon.....	23
1.5.1. Cytotoxicité des cellules T activées	23
1.5.1.1. Voie perforine/granzyme utilisée par les CD8+ (et les cellules NK) pour la lyse cellulaire.....	23
1.5.1.2. Interaction FAS-FAS ligand, élément de la cytotoxicité des CD4+	23
1.5.2. Production d'alloanticorps par les lymphocytes B activés	24
1.5.3. Mécanismes effecteurs du rejet aigu de type non B, non T, dépendant des cytokines libérées par les cellules alloréactives	24
1.6. Mécanismes induisant la tolérance aux alloantigènes	25
2. IMMUNOSUPPRESSION	26
2.1. Immunosuppression par inhibition de la synthèse de gènes.....	26
2.1.1. Inhibition de la synthèse de bases puriques et pyrimidiques	26
2.1.1.1. Bases puriques.....	26
2.1.1.2. Bases pyrimidiques.....	27
2.1.2. Inhibition de la transcription de gènes.....	27
2.1.2.1. Corticostéroïdes (CS)	27
2.1.2.2. Inhibiteurs de calcineurine (ICN) : Ciclosporine (CsA) et FK506.....	28
2.2. Modulation de la réponse immunitaire.....	29
2.2.1. Inhibition de la prolifération des lymphocytes T, Rapamycine (RPM)-Sirolimus*	29
2.2.2. Anticorps polyclonaux, anticorps monoclonal anti-CD3	30
2.2.3. Anticorps anti-récepteurs de l'IL2 (Daclizumab* et Basiliximab*).....	30
2.2.4. Agents inducteurs de la tolérance.....	31
3. MONITORING PHARMACOLOGIQUE ET PHARMACODYNAMIQUE DE L'IMMUNOSUPPRESSION, ET ADAPTATION THERAPEUTIQUE	32
3.1. Immunosuppression : entre insuffisance et excès	33
3.1.1. Rejet aigu	33
3.1.2. Infection à Cytomégalo virus (CMV)	34
3.1.2.1. Généralités.....	34
3.1.2.2. Prévention.....	34
3.1.2.3. CMV et rejet de greffe.....	34
3.2. Monitoring pharmacologique du traitement par ICN.....	35
3.2.1. Monitoring pharmacologique du traitement par CsA.....	35
3.2.1.1. Propriétés pharmacologiques de la CsA	35
3.2.1.2. Schéma de surveillance des taux thérapeutiques de CsA.....	36
3.2.2. Monitoring pharmacologique du traitement par FK506.....	37
3.3. Monitoring pharmacodynamique de l'immunosuppression par ICN	37
3.4. Monitoring des autres immunosuppresseurs (CS, AZA, MPA, RPM).....	39
3.4.1. Mesure des concentrations sériques	39
3.4.2. Mesure de l'activité fonctionnelle des cibles des immunosuppresseurs	39
3.4.2.1. AZA – activité de la TPMT	39
3.4.2.2. MPA – activité de l'IMPDH.....	39
3.4.2.3. RPM – activité de la kinase P70 S6.....	40
4. POLYMORPHISME GENETIQUE ET ADAPTATION THERAPEUTIQUE EN TRANSPLANTATION.....	40

4.1.	POLYMORPHISMES DES CYTOKINES	41
4.1.1.	Présentation des cytokines	41
4.1.2.	Propriétés des cytokines	42
4.1.2.1.	Mode d'action autocrine, paracrine et endocrine	42
4.1.2.2.	Pléiotropisme, redondance	42
4.1.2.3.	Antagonisme des cytokines, cytokines Th1 ET Th2	42
4.1.3.	Fonction de quelques cytokines	43
4.1.3.1.	Cytokines pro-inflammatoires	43
4.1.3.2.	Cytokines anti-inflammatoires	45
4.1.3.3.	Cytokines régulatrices, TGFβ1	45
4.1.4.	Définition et étude des polymorphismes	46
4.1.4.1.	Nature des polymorphismes des cytokines	46
4.1.4.2.	Corrélation polymorphisme et niveau d'expression des gènes in vitro	47
4.1.5.	Nature des polymorphismes de l'étude	47
4.1.5.1.	Polymorphisme du TNFα	47
4.1.5.2.	Polymorphisme de l'IFNγ	48
4.1.5.3.	Polymorphisme de l'IL6	48
4.1.5.4.	Polymorphisme de l'IL10 [56,60,63,64]	49
4.1.5.5.	Polymorphisme du TGFβ [56,60,64]	49
4.1.6.	Implication des cytokines en transplantation	53
4.1.6.1.	TNFα	53
4.1.6.2.	IL10	53
4.1.6.3.	Association de génotypes du TNFα et de l'IL10	54
4.1.6.4.	IL6	54
4.1.6.5.	IFNγ	55
4.1.6.6.	TGFβ1	55
4.2.	POLYMORPHISME DU FCGR3 ET TRANSPLANTATION	56
MATERIELS ET METHODES		58
1.	POPULATION ETUDIEE	59
2.	EXTRACTION DE L'ADN GENOMIQUE	60
3.	GENOTYPAGE DES CYTOKINES	61
3.1.	<i>Principe de la PCR-SSP (sequence specific primer, ou PCR spécifique d'allèle, ou ARMS-PCR pour allèle refractory mutation system)</i>	61
3.2.	<i>Présentation de la trousse de génotypage et protocole d'utilisation</i>	65
3.3.	<i>PCR</i>	66
3.4.	<i>Détection des produits de PCR</i>	67
4.	EXPLOITATION DES RESULTATS OBTENUS EN CYTOMETRIE EN FLUX AU COURS DU PROJET PHRC.	69
5.	GENOTYPAGE DU FCGR3	71
5.1.	<i>Principe de la PCR en temps réel et présentation du LightCycler* (Roche)</i>	71
5.2.	<i>Principe de l'analyse des courbes de fusion</i>	72
5.3.	<i>Choix des amorces pour la PCR multiplex</i>	73
5.4.	<i>Protocole d'utilisation</i>	78
5.4.1.	<i>Préparation des mix</i>	78
5.4.2.	<i>Protocole d'utilisation</i>	78
5.4.3.	<i>Programme d'amplification</i>	80
6.	OUTILS STATISTIQUES UTILISES	80
RESULTATS		82
1.	DONNEES DEMOGRAPHIQUES	83
2.	RESULTATS DE L'EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE	83
3.	RESULTATS DU GENOTYPAGE DES CYTOKINES DANS LES GROUPES REJET AIGU, CMV ET TEMOINS	85
3.1.	<i>Polymorphisme du TNFα</i>	88
3.1.1.	<i>Distribution des génotypes et des phénotypes de production du TNFα dans notre population de patients</i>	88
3.1.2.	<i>Influence des génotypes du TNFα sur la capacité de production des cytokines in vitro</i>	88

3.1.2.1.	TNF α et cytokines intracellulaires	88
3.1.2.2.	TNF α et MFI (Mean Fluorescence Intensity)	88
3.1.3.	Influence des génotypes du TNF α sur la survenue du CMV et sur la survenue du rejet aigu	89
3.1.3.1.	Comparaison des sous-groupes de patients : CMV/témoins	89
3.1.3.2.	Comparaison des sous-groupes de patients : Rejet aigu/témoins	89
3.2.	<i>Polymorphisme de l'IFNγ</i>	96
3.2.1.	Distribution des génotypes et phénotypes de production de l'IFN γ dans la population étudiée	96
3.2.2.	Influence du polymorphisme génétique de l'IFN γ sur la capacité de production des cytokines in vitro	96
3.2.2.1.	IFN γ et cytokines intracellulaires	97
3.2.2.2.	IFN γ et MFI	97
3.2.3.	Influence du polymorphisme génétique de l'IFN γ sur la survenue du CMV et sur la survenue du rejet aigu	97
3.2.3.1.	Comparaison des sous-groupes de patients : CMV/témoins	97
3.2.3.2.	Comparaison des sous-groupes de patients : Rejet aigu/témoins	97
3.3.	<i>Polymorphisme de l'IL10</i>	105
3.3.1.	Distribution des génotypes et phénotypes de production de l'IL10 dans la population étudiée	105
3.3.2.	Influence du polymorphisme génétique de l'IL10 sur la survenue du CMV et sur la survenue du rejet aigu	105
3.3.2.1.	Comparaison des sous-groupes de patients : CMV/témoins	105
3.3.2.2.	Comparaison des sous-groupes de patients : Rejet aigu/témoins	106
3.4.	<i>Polymorphisme du TGFβ1</i>	111
3.4.1.	Distribution des génotypes et phénotypes de production du TGF β 1 dans la population étudiée	111
3.4.2.	Influence du polymorphisme génétique du TGF β 1 sur la survenue du CMV et sur la survenue du rejet aigu	111
3.4.2.1.	Comparaison des sous-groupes de patients CMV/témoins	111
3.4.2.2.	Comparaison des sous-groupes de patients : Rejet aigu/témoins	111
3.5.	<i>Polymorphisme de l'IL6</i>	115
3.5.1.	Distribution des génotypes et phénotypes de production de l'IL6 dans la population étudiée	115
3.5.2.	Influence du polymorphisme génétique de l'IL6 sur la survenue du CMV ou du rejet aigu	115
3.5.2.1.	Comparaison des sous-groupes de patients : CMV/témoins	115
3.5.2.2.	Comparaison des sous-groupes de patients : Rejet aigu/témoins	115
4.	RESULTATS DU GENOTYPAGE DU GENE FCGR3A	119
4.1.	<i>Profil des génotypes du FCGR3A obtenu par l'étude des courbes de fusion par PCR en temps réel</i>	119
4.2.	<i>Distribution des génotypes du FCGR3A dans la population étudiée</i>	124
DISCUSSION	126	
1.	ASPECTS TECHNIQUES DE L'ETUDE	127
1.1.	<i>Les méthodes de génotypage</i>	127
1.2.	<i>Profil de cytokines établi par la trousse de génotypage One Lambda</i>	128
1.3.	<i>Corrélation entre le génotype des cytokines et la capacité de production des cytokines in vitro</i>	129
2.	ASPECTS CLINIQUES DE L'ETUDE	131
2.1.	<i>Distributions génotypiques dans notre population de patients</i>	132
2.2.	<i>Polymorphisme génétique des cytokines et CMV</i>	133
2.3.	<i>Facteurs pouvant influencer l'impact des polymorphismes génétiques</i>	134
2.4.	<i>Génotypage du FCGR3A</i>	135
CONCLUSION	137	
BIBLIOGRAPHIE	139	

Liste des abbréviations utilisées

ADCC :	cytotoxicité cellulaire dépendant d'anticorps
anti-IL2R :	anti-récepteur de l'interleukine
AUC :	area under curve
AZA :	azathioprine
CD :	cellules dendritiques
CD3 :	classe de différenciation 3
CD4+ :	cellule exprimant la molécule CD4
CEDIA :	cloned enzyme donor immunoassay
cellule NK :	cellule natural killer
CMH :	complexe majeur d'histocompatibilité
CMV :	virus cytomégalique
CPA :	cellule présentatrice d'antigène
CS :	corticostéroïdes
CsA :	ciclosporine
CTLA-4 :	cytotoxic T lymphocyte antigen-4
ECP :	eosinophil cationic protein
ELISA :	enzyme linked immunoassay
EMIT :	enzyme multiplied immunoassay technique
EPO :	eosinophil peroxidase
FCGR :	récepteur du fragment Fc des immunoglobulines
FK506 :	tacrolimus
FPIA :	fluorescence polarization immunoassay
GFP :	green fluorescent protein
HLA :	human leukocyte antigen
HPLC :	chromatographie liquide haute performance
ICAM :	intercellular adhesion molecule
ICN :	inhibiteur de calcineurine
IFN :	interféron
IL :	interleukine
IMPDH :	inosine monophosphate déshydrogénase
LFA :	leukocyte function antigen
MBP :	major basic protein
MFI :	mean fluorescence intensity
MMF :	mycophénolate mofétil
MPA :	acide mycophénolique
PCR :	polymerase chain reaction
PCR-SSP :	PCR single specific primer
RA :	rejet aigu
RIA :	radioimmunoassay
RPM :	rapamycine
SNP :	single nucleotide polymorphism
TCR :	T cell receptor
TGF :	transforming growth factor
Th1 :	lymphocyte T auxiliaire de type 1

Th2 : lymphocyte T auxiliaire de type 2
TNF : tumor necrosis factor
TPMT : thiopurine méthyltransférase
VCAM : vascular cell adhesion molecule
VLA : very late antigen

Liste des figures

Fig. 1.	Représentation du SNP présent sur le promoteur du gène du TNF α	50
Fig. 2.	Représentation des polymorphismes situés sur le premier intron du gène de l'IFN γ	50
Fig. 3.	Représentation du SNP sur le promoteur du gène de l'IL6	51
Fig. 4.	Représentation des 3 SNP présents au niveau de la région promotrice du gène de l'IL10	51
Fig. 5.	Représentation des SNP présents au niveau de la séquence signal du gène du TGF β 1 ...	52
Fig. 6.	Représentation de la PCR en cas d'hybridation de l'amorce spécifique de l'allèle TNF α - 308G sur les allèles TNF1 et TNF2.....	63
Fig. 7.	Représentation de la PCR en cas d'hybridation de l'amorce spécifique de l'allèle TNF α - 308A sur les allèles TNF1 et TNF2	64
Fig. 8.	profil des bandes obtenues à l'électrophorèse.....	68
Fig. 9.	Représentation de la séquence de l'amorce sens par rapport aux gènes FCGR3A et FCGR3B	76
Fig. 10.	Représentation de l'hybridation des 2 amorces antisens sur les gènes FCGR3A et FCGR3B	77
Fig. 11.	Photo d'un gel d'agarose 96 puits après migration électrophorétique des produits d'amplification (140 V, 3 à 4 min)	86
Fig. 12.	Production du TNF α intracellulaire par les lymphocytes CD3+ après stimulation in vitro au temps J0	92
Fig. 13.	Production du TNF α intracellulaire par les lymphocytes CD4+ après stimulation in vitro au temps J0	92
Fig. 14.	Production du TNF α intracellulaire par les lymphocytes CD8+ après stimulation in vitro ...	93
Fig. 15.	Génotypes du TNF α et valeurs de MFI des CD3+/TNF α + totaux au temps J0.....	93
Fig. 16.	Génotypes du TNF α et valeurs de MFI des lymphocytes CD4+/ TNF α + au temps J0.....	94
Fig. 17.	Génotypes du TNF α et valeurs de MFI des lymphocytes CD8+/ TNF α + au temps J0.....	94
Fig. 18.	Production de l'IFN γ intracellulaire par les lymphocytes CD3+ après stimulation in vitro .	100
Fig. 19.	Production de l'IFN γ intracellulaire par les lymphocytes CD4+ après stimulation in vitro .	100
Fig. 20.	Production de l'IFN γ intracellulaire par les lymphocytes CD8+ après stimulation in vitro .	101
Fig. 21.	Génotypes de l'IFN γ et valeurs de MFI des lymphocytes CD3+totaux/ IFN γ + au temps J0	101
Fig. 22.	Génotypes de l'IFN γ et valeurs de MFI des lymphocytes CD4+/ IFN γ + au temps J0.....	102
Fig. 23.	Génotypes de l'IFN γ et valeurs de MFI des lymphocytes CD8+/ IFN γ + au temps J0.....	102
Fig. 24.	Courbe de fusion correspondant au génotype FCGR3A 158 V homozygote (contrôle) - 35 cycles d'amplification/4 mM de MgCl $_2$	121
Fig. 25.	Courbe de fusion correspondant au génotype FCGR3A 158 F homozygote (contrôle) – 40 cycles d'amplification/4 mM de MgCl $_2$	122
Fig. 26.	Courbe de fusion correspondant au génotype FCGR3A 158 V/F hétérozygote (contrôle) – 40 cycles d'amplification/4 mM de MgCl $_2$	123

Liste des tableaux

Tableau. 1.	Tableau des cycles d'amplification recommandés par le kit de génotypage One Lambda	68
Tableau. 2.	Amorces utilisées dans l'étude de Dall'Ozzo et al.....	75
Tableau. 3.	Compositions des mix utilisés lors de la mise au point du génotypage du gène FCGR3A (l'amorce antisens courte sert à la réaction d'amplification de l'allèle FCGR3A -158V, l'amorce antisens longue sert à la réaction d'amplification de l'allèle FCGR3A -158F).....	79
Tableau. 4.	Données démographiques des patients de notre étude.....	84
Tableau. 5.	Tableau d'interprétation d'un gel obtenu à l'électrophorèse selon le kit de génotypage des cytokines One Lambda	87
Tableau. 6.	Distribution des génotypes du TNF α et fréquences correspondantes dans la population étudiée	90
Tableau. 7.	Distribution des phénotypes de production du TNF α dans la population étudiée	90
Tableau. 8.	Distribution en fréquence des génotypes du TNF α dans la population contrôle de l'étude de Perrey et al. [59].....	91
Tableau. 9.	Comparaison des sous-groupes de patients CMV+/CMV- en fonction du génotype du TNF α (fort sécréteur/faible sécréteur)	95
Tableau. 10.	Comparaison des sous-groupes de patients RA+/RA- en fonction du génotype du TNF α (fort sécréteur/faible sécréteur)	95
Tableau. 11.	Distribution des génotypes de l'IFN γ et fréquences correspondantes dans la population étudiée	98
Tableau. 12.	Distribution des phénotypes de production de l'IFN γ dans la population étudiée	98
Tableau. 13.	Distribution en fréquence des génotypes de l'IFN γ dans une autre population de patients greffés rénaux [94]	99
Tableau. 14.	Comparaison des sous-groupes de patients CMV+/CMV- en fonction de la distribution du génotype de l'IFN γ (comparaison IFN γ +874 AA versus TT + TA)	103
Tableau. 15.	Comparaison des sous-groupes de patients CMV+/CMV- en fonction du génotype de l'IFN γ (comparaison IFN γ +874 TT versus AA + TA)	103
Tableau. 16.	Comparaison des sous-groupes de patients RA+/RA- en fonction de la distribution du génotype de l'IFN γ (comparaison IFN γ +874 AA versus TT+TA)	104
Tableau. 17.	Comparaison des sous-groupes de patients RA+/RA- en fonction de la distribution du génotype de l'IFN γ (comparaison IFN γ +874 TT versus AA+TA)	104
Tableau. 18.	Distribution des génotypes de l'IL10 et fréquences correspondantes dans la population étudiée	107
Tableau. 19.	Distribution des phénotypes de production de l'IL10 dans la population étudiée	107
Tableau. 20.	Distribution en fréquence des génotypes de l'IL10 dans la population contrôle de l'étude de Perrey et al. [59].....	108
Tableau. 21.	Comparaison des sous-groupes de patients CMV+/CMV- en fonction de la distribution du génotype de l'IL10 déterminé par le SNP en position -1082 du gène (comparaison IL10 -1082 AA versus GG+GA)	109
Tableau. 22.	Comparaison des sous-groupes de patients CMV+/CMV- en fonction de la distribution du génotype de l'IL10 déterminé par le SNP en position -1082 du gène (comparaison IL10 -1082 GG versus AA+GA)	109

Tableau. 23.	Comparaison des sous-groupes de patients RA+/RA- en fonction de la distribution du génotype de l'IL10 déterminé par le SNP en position -1082 du gène (comparaison IL10 -1082 AA versus GG+GA)	110
Tableau. 24.	Comparaison des sous-groupes de patients RA+/RA- en fonction de la distribution du génotype de l'IL10 déterminé par le SNP en position -1082 du gène (comparaison IL10 -1082 GG versus AA+GA)	110
Tableau. 25.	Distribution des génotypes du TGFβ1 et fréquences correspondantes dans la population étudiée	112
Tableau. 26.	Distribution des phénotypes de production du TGFβ1 dans la population étudiée...	112
Tableau. 27.	Distribution en fréquence des génotypes du TGFβ1 dans la population contrôle de l'étude de Perrey et al. [59].....	113
Tableau. 28.	Comparaison des sous-groupes de patients CMV+/CMV- en fonction de la distribution du phénotype de production du TGFβ1 (comparaison TGFβ1 +874 fort versus intermédiaire)	114
Tableau. 29.	Comparaison des sous-groupes de patients RA+/RA- en fonction de la distribution du phénotype de production du TGFβ1 (comparaison TGFβ1 +874 fort versus intermédiaire)	114
Tableau. 30.	Distribution des génotypes de l'IL6 et fréquences correspondantes dans la population étudiée	116
Tableau. 31.	Distribution des phénotypes de production de l'IL6 dans la population étudiée	116
Tableau. 32.	Distribution en fréquence des génotypes de l'IL6 dans une autre population de patients transplantés rénaux [68].....	117
Tableau. 33.	Comparaison des sous-groupes de patients CMV+/CMV- en fonction de la distribution du génotype de l'IL6 (comparaison IL6 -174 CC versus GG+GC)	118
Tableau. 34.	Comparaison des sous-groupes de patients RA+/RA- en fonction de la distribution du génotype de l'IL6 (comparaison IL6 -174 CC versus GG+GC)	118
Tableau. 35.	Tableau des résultats de la PCR en temps réel sur LightCycler pour le gène FCGR3A en fonction du nombre de cycles et de la concentration en MgCl ₂	120
Tableau. 36.	Distribution des génotypes du FCGR3A dans la population étudiée et dans une population contrôle d'origine caucasienne [97]	125
Tableau. 37.	Distribution des génotypes du FCGR3A en fonction du rejet aigu et du CMV.....	125

Introduction

En 2002, plus de 2200 transplantations de rein ont été réalisées sur les 3600 transplantations d'organe toutes confondues [113].

Le nombre de transplantations rénale est en augmentation depuis 1997 (environ 1680 transplantations de rein), et il faut associer cette augmentation à l'utilisation des immunosuppresseurs pour contrôler la réponse immunitaire vis-à-vis du greffon. Le contrôle de l'immunosuppression est toutefois délicat et les effets indésirables des traitements immunosuppresseurs surviennent de manière variable et imprévisible.

C'est pourquoi, de nombreuses études ont cherché à définir un terrain génétique qui prédispose à une réponse particulière au traitement par immunosuppresseurs en raison de l'implication des gènes étudiés dans les différents mécanismes de régulation de la réponse immunitaire. Nous avons pris pour exemples les polymorphismes génétiques de 2 familles de gènes intervenant dans la série des événements immunologiques qui conduisent à la reconnaissance des alloantigènes. L'une des familles de gènes dont les polymorphismes génétiques ont été mis en évidence est celle des cytokines qui sont les molécules participant à la communication intercellulaire. Le deuxième exemple de polymorphisme génétique que nous avons étudié concerne le gène FCGR3A ou FCGR3A impliqué dans les mécanismes effecteurs de la lyse cellulaire. Il s'agit du gène A codant pour le récepteur au fragment Fc des immunoglobulines de type III, présent sur les cellules NK (ou CD16), dont le polymorphisme entraîne l'existence de 2 allèles possédant des affinités différentes vis-à-vis du fragment Fc des immunoglobulines.

Sur une population de patients transplantés rénaux, nous avons identifié les différents génotypes relatifs aux 2 familles de gènes citées ci-dessus, grâce à l'emploi, pour les cytokines, d'une trousse de génotypage fondée sur le principe de la PCR-SSP (ou PCR spécifique d'allèle) et, d'autre part, grâce à la mise au point pour le FCGR3A d'une méthode de génotypage par PCR en temps réel sur LightCycler (Roche). Après avoir décrit les deux méthodes de génotypage précédentes, nous discuterons de l'implication de ces polymorphismes génétiques dans la survenue du rejet aigu ou de l'infection à CMV.

Généralités

1. MECANISME DE RECONNAISSANCE DES ALLOANTIGENES

1.1. Nature des alloantigènes

Les alloantigènes sont qualifiés de majeurs ou de mineurs selon la rapidité de la reconnaissance par le système immunitaire.

Les alloantigènes majeurs sont représentés par les constituants du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou II, dont le haut degré de polymorphisme est à l'origine de la grande disparité entre les individus. L'expression des molécules du CMH à la surface des cellules peut être augmentée sous l'influence de certaines cytokines ; $IFN\alpha$, β , γ pour les molécules du CMH de classe I et $IFN\gamma$, IL4, IL13, $TNF\alpha$ et β pour le CMH de classe II. La fonction des molécules du CMH entre dans le cadre de la reconnaissance du Soi et du non Soi par les lymphocytes T grâce à la présentation des peptides issus de la protéolyse de protéines d'origine endogènes (CMH I) ou exogènes (CMH II), ce qui se traduit au niveau moléculaire par une interaction spécifique entre le complexe peptide-CMH et le récepteur à l'antigène des lymphocytes T ou TCR. Dans le cas particulier de la réponse allogénique en situation d'allogreffe, s'il existe une incompatibilité HLA, les molécules du CMH du donneur différentes de celle du receveur sont les principales protéines reconnues comme étrangères par les lymphocytes T et nous verrons plus loin que cette reconnaissance peut s'effectuer de deux façons.

Il existe aussi des alloantigènes mineurs d'histocompatibilité qui ont suscité de nombreuses études dans le domaine du rejet aigu. Ils ont été aussi décrits dans l'installation de lésions d'artériosclérose qui vont initier la survenue du rejet chronique [1,2]. Il s'agirait de complexes formés par des molécules de CMH portant des peptides dérivés de protéines cellulaires polymorphiques. Ce type de complexe est alors reconnu par les lymphocytes T, mais à la

différence de l'incompatibilité HLA classique qui peut être mise en évidence en culture lymphocytaire mixte sans contact préalable, la réponse allogénique aux antigènes mineurs nécessite une immunisation in vivo au préalable. Cette réponse est en effet conditionnée par le nombre de complexes CMH-peptide formant l'antigène mineur, et présents à la surface des cellules, qui doit atteindre un certain seuil afin que l'interaction avec les TCR puisse déclencher une réponse immune [3].

1.2. Reconnaissance indirecte et directe

1.2.1. Les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles

Les cellules dendritiques tissulaires participent à la présentation de l'antigène [4]. En transplantation d'organes, il est important de souligner leur double origine, car provenant soit du donneur soit du receveur, elles vont initier respectivement soit la reconnaissance directe soit la reconnaissance indirecte du greffon.

D'autres cellules participent à la présentation de l'antigène, les lymphocytes B, ainsi que les cellules endothéliales et épithéliales dont l'expression des molécules de classe II du CMH est augmentée après stimulation par l'IFN γ .

1.3. Reconnaissance indirecte et directe

1.3.1. Voie indirecte

Les CPA du receveur (CD circulantes, lymphocytes B) migrent du sang vers le greffon, d'une part en suivant un gradient de concentration de chimiokines libérées par le greffon et d'autre part, influencées par l'augmentation des molécules d'adhésion sur les cellules endothéliales du greffon (ICAM-1 et VCAM-1) sous l'action de certaines cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IFN γ). Après avoir dégradé et incorporé les alloantigènes sous forme de peptides

présentés par leurs molécules du CMH de classe II, elles retournent vers les zones T ganglionnaires ou spléniques pour assurer leur rôle de CPA auprès des lymphocytes T [5].

1.3.2. Voie directe

Les CD du donneur sont activées par le phénomène d'ischémie/reperfusion engendré par l'acte de transplantation. L'apoptose induit par ce phénomène serait un des mécanismes déclenchant une réaction inflammatoire intense [6] qui s'accompagne de la libération des molécules inflammatoires activant les CD telles que l'IFN γ [7]. Les CD activées du donneur migrent alors du greffon vers les zones T des ganglions ou de la rate pour présenter les antigènes étrangers aux cellules T.

Ces 2 voies de reconnaissance ne sont pas exclusives : la reconnaissance directe serait opérationnelle dès les premières heures de la transplantation puis la reconnaissance indirecte prendrait le relais et aboutirait à la sensibilisation des lymphocytes T CD4+.[8].

1.4. Rôle indispensable des signaux de costimulation

La reconnaissance spécifique par le TCR est insuffisante pour activer tout le processus immunitaire. Il a été démontré le rôle essentiel d'autres interactions moléculaires localisées au niveau des surfaces cellulaires, pour enclencher les processus d'activation cellulaire. En l'absence de ces interactions moléculaires, l'activation des lymphocytes T est incomplète, ils sont dits anergiques ou réfractaires car incapables de répondre normalement aux signaux d'activation [4].

Les CPA et notamment les cellules dendritiques, outre la fonction de présentation de l'antigène, possèdent à la surface de leurs membranes, des molécules dites de costimulation, dont certaines sont plus ou moins exprimées en fonction de l'état de

maturation de la CPA. Certaines interactions de costimulation, entre les CPA et les lymphocytes, sont essentielles pour donner suite à l'activation du système immunitaire.

i. L'interaction entre le CD40 présent sur les CPA activées avec le CD40L présent sur les lymphocytes T augmente l'expression de nombreuses molécules du processus immunitaire :

➤ Cytokines inflammatoires

➤ Molécules d'adhésion

➤ Molécules B7 sur les CPA

➤ Molécule du CMH de classe II sur les CPA

➤ Marqueurs d'activation sur le lymphocyte T : CMH de classe II HLA-DR, CD69, chaîne α du récepteur à l'IL2

ii. Les molécules B7 sur les CPA interagissent avec le CD28 des lymphocytes T. L'expression de ces molécules peut être spontanée sur les CD ou bien induite par l'interaction CD40-CD40L. L'interaction B7-CD28 induit :

➤ l'activation de facteurs de transcription cellulaire entraînant la production d'IL2 par les CD4+ naïfs, et de nombreux autres gènes (chimiokines, cytokines, molécules de costimulation...)

➤ la protection des lymphocytes T contre l'apoptose

Remarque : La molécule CTLA-4 est une molécule d'expression tardive sur les lymphocytes T activés. Cette molécule reconnaît les mêmes ligands que le CD28 avec qui elle entre en compétition. Elle entraîne par contre une diminution de la synthèse d'IL2, qui conduit à un état de tolérance.

Nous venons de rappeler les nombreuses interactions à l'origine de l'activation du système immunitaire, et intervenant notamment dans la reconnaissance allogénique après allogreffe. Nous verrons que ces différentes interactions cellulaires sont au cœur de la stratégie de développement des immunosuppresseurs récents.

1.5. Mécanismes effecteurs de la lyse cellulaire et de la destruction du greffon

1.5.1. Cytotoxicité des cellules T activées

1.5.1.1. Voie perforine/granzyme utilisée par les CD8+ (et les cellules NK) pour la lyse cellulaire

Les cellules CD8+ activées par les cytokines de type Th1, essentiellement l'IL-2 et l'IFN γ synthétisent les molécules de perforine et de granzymes, qui seront ensuite stockées au sein de granules cytotoxiques. Suite à l'activation des lymphocytes CD8+ par un alloantigène, il se crée une liaison étroite entre le lymphocyte et la cellule portant l'alloantigène, permettant la fusion des granules cytotoxiques avec la membrane de la cellule cible. Les molécules de perforine libérées vont alors former des pores dans cette membrane afin de permettre le passage de granzymes. Ces enzymes entraînent l'activation de la cascade des caspases, protéases primordiales dans le déroulement des mécanismes d'apoptose.

1.5.1.2. Interaction FAS-FAS ligand, élément de la cytotoxicité des CD4+

La molécule FAS est une molécule présente sur la plupart des surfaces cellulaires. L'expression de son ligand, la molécule FAS ligand ou FASL est inductible au niveau des lymphocytes CD4+ Th1. L'interaction entre ces deux molécules se traduit par l'activation de la voie des caspases, comme le fait la voie perforine/granzyme. Les ARNm et les protéines des molécules caractérisant ces deux précédents mécanismes ont d'ailleurs été proposés comme marqueurs de l'activation du système immunitaire au cours du rejet de

transplantation rénale à partir de divers échantillons, notamment urine et produits de biopsie du greffon [9,10,11].

1.5.2. Production d'alloanticorps par les lymphocytes B activés

Le mécanisme effecteur des lymphocytes B activés dans la situation du rejet hyperaigu est dû à des alloanticorps anti-HLA de classe I (et plus rarement anti-HLA de classe II) qui apparaissent suite à des évènements antérieurs tels que greffe, grossesse ou transfusion sanguine, et qui sont présents au moment de la transplantation. Le rejet humoral survient alors très rapidement, quelques minutes à quelques heures après la revascularisation de l'organe transplanté, en raison de la fixation des anticorps sur les cellules endothéliales. Les mécanismes effecteurs liés à la fixation des alloanticorps sur leur cible comprennent la voie classique du Complément avec le complexe d'attaque membranaire, la voie perforine/granzyme des cellules NK activées par leur récepteur à la fraction Fc des IgG1 et IgG3 (cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps ou ADCC) et par leur récepteur à la fraction C3b du complément en cas d'activation parallèle de la cascade du Complément.

1.5.3. Mécanismes effecteurs du rejet aigu de type non B, non T, dépendant des cytokines libérées par les cellules alloréactives

D'autres mécanismes ont été impliqués dans le déroulement de la phase effectrice du rejet aigu :

- L'IFN γ , essentiellement produit par les lymphocytes T Th1, stimule l'hypersensibilité retardée dépendante des macrophages, dont la cytotoxicité est due aux molécules qu'ils produisent après activation (NO, TNF α et β ...).
- Les cytokines IL-5, IL-4 et IL-13 stimulent les éosinophiles, qui supportent les mécanismes effecteurs de la réponse Th2 ; leur toxicité s'exerce après dégranulation et libération de molécules toxiques (major basic protein ou MBP, eosinophil cationic protein ou ECP, eosinophil peroxidase ou EPO...) [5].

1.6. Mécanismes induisant la tolérance aux alloantigènes

Au vu des mécanismes précédemment évoqués participant à la reconnaissance des alloantigènes, certains d'entre eux vont être essentiels à l'activation des cellules alloréactives et d'autres vont inhiber ou limiter l'activation du système immunitaire ; si bien qu'il peut se produire un phénomène de tolérance périphérique lorsque les systèmes activateurs seront bloqués, ou lorsque les systèmes inhibiteurs seront stimulés.

L'anergie des lymphocytes T, c'est-à-dire un état réfractaire à toute stimulation, est un phénomène consécutif au blocage des signaux activateurs, tels que les signaux de transduction transmis par le CD3, les signaux de costimulation, les molécules d'adhésion. A l'inverse, en favorisant ou en créant une interaction de type CTLA4-B7, ce sont les signaux inhibiteurs qui sont stimulés, conduisant aussi à l'anergie des lymphocytes T.

La délétion clonale participe à l'élimination des cellules alloréactives, elle est induite par suppression des cellules du système immunitaire, par la suppression du signal activateur induit par l'IL2, par l'induction de l'apoptose au niveau des lymphocytes T.

Enfin, la déviation de la réponse immunitaire vers un profil de cytokines anti-inflammatoires, produites par les lymphocytes Th2, va permettre d'inhiber l'expansion des lymphocytes Th1 et la synthèse d'IFN γ .

2. IMMUNOSUPPRESSION

Nous venons d'aborder les mécanismes de reconnaissance cellulaire entrant en jeu dans l'activation du système immunitaire lors du contact entre deux cellules alloréactives. C'est grâce à une meilleure connaissance de ces mécanismes que de nouveaux médicaments immunosuppresseurs ont émergé, offrant de multiples possibilités d'associations médicamenteuses, plus ou moins synergiques, bénéfiques d'une part en terme de limitation des effets indésirables d'un immunosuppresseur donné, dans la mesure où ces associations vont autoriser la diminution des doses prescrites sans pour autant augmenter les risques de rejet ,et d'autre part par la synergie d'action grâce au blocage de voies distinctes impliquées dans l'activation du système immunitaire. Nous allons aborder les principaux immunosuppresseurs utilisés en transplantation d'organe [12,13].

2.1. Immunosuppression par inhibition de la synthèse de gènes

2.1.1. Inhibition de la synthèse de bases puriques et pyrimidiques

2.1.1.1. Bases puriques

2.1.1.1.1. Azathioprine (AZA)

Lancé en 1968, l'AZA a été largement utilisé avant l'arrivée de la ciclosporine, en combinaison avec les corticostéroïdes dans la prévention du rejet aigu en transplantation d'organes. C'est une prodrogue, transformée in vivo par une réaction non enzymatique en 6-mercaptopurine (6-MP), un analogue des purines qui interfère avec la synthèse de novo des bases puriques. L'hypoxanthine phosphoribosyl transférase (HPRT) la transforme en acide thioinosique et celui-ci est transformé en nucléotides de la 6-thioguanine (6-TGN) considérés comme les éléments actifs. La xanthine oxydase transforme les 6-TGN en acide thiourique

(inactif) et la thiopurine méthyltransférase (TPMT) en nucléotides de la 6-méthylmercaptapurine aussi inactifs mais suspectés d'une partie du moins des effets toxiques [14].

L'AZA est un immunosuppresseur non spécifique atteignant principalement les cellules à renouvellement rapide. Son utilisation tend aujourd'hui à diminuer en faveur d'un immunosuppresseur plus spécifique, le mycophénolate mofétil.

2.1.1.1.2. Mycophénolate mofétil (MMF) ou ester mofétil de l'acide mycophénolique

Le mycophénolate mofétil est la prodrogue de l'acide mycophénolique (MPA), qui inhibe l'inosine monophosphate déshydrogénase (IMPDH) impliquée dans la synthèse de novo des nucléotides à guanine, avec en conséquence l'arrêt de la prolifération des lymphocytes T et B. De plus l'acide mycophénolique inhibe la glycosylation des molécules d'adhésion et la prolifération des cellules musculaires lisses vasculaires [15].

Il est employé dans des associations d'immunosuppresseurs contenant des inhibiteurs de calcineurine ou ICN et des corticostéroïdes.

2.1.1.2. Bases pyrimidiques

Léflunomide et Bréquinar inhibent la synthèse des bases pyrimidiques par le blocage de la dihydro-orotate déshydrogénase, mais aujourd'hui, ce sont leurs dérivés qui sont plutôt évalués en transplantation rénale, tels que les dérivés malonitrilamides qui constituent les dérivés actifs de leur prodrogue, le Léflunomide ; par ailleurs, les dérivés du Bréquinar seraient moins thrombocytopéniants du fait d'une demi vie plus courte [13].

2.1.2. Inhibition de la transcription de gènes

2.1.2.1. Corticostéroïdes (CS)

Les CS ont été incontournables au cours des années 60 et 70, époque où l'AZA était le seul autre médicament disponible.

En interagissant avec le facteur de transcription nucléaire NF κ B, ils inhibent la prolifération

lymphocytaire et la réponse inflammatoire en diminuant la transcription des gènes des cytokines (TNF, IL1, IL2 et IL6 entre autres) et des molécules d'adhésion (ICAM1, LFA1). Ils diminuent aussi les réponses inflammatoires en modulant la production des eicosanoïdes du fait de leur capacité à inhiber l'enzyme phospholipase A2.

Source d'effets indésirables multiples, des équipes ont tenté des protocoles d'immunosuppression limitant l'usage des CS. Il ressort d'une étude en transplantation rein-pancréas qu'il n'y a pas plus de rejet aigu en cas de retrait précoce des CS associé à des protocoles d'immunosuppression comprenant une bonne induction (globulines antilymphocytes), puis des inhibiteurs de calcineurine combinés au MMF ou au Sirolimus* [16].

2.1.2.2. Inhibiteurs de calcineurine (ICN) : Ciclosporine (CsA) et FK506

Les inhibiteurs de calcineurine (ICN) constituent un élément indispensable à tout protocole immunosuppresseur actuel. Ils agissent en se liant à des molécules cytosoliques, les immunophilines, de type cyclophiline pour la ciclosporine, et FKBP12 pour le FK506, formant des complexes qui vont se fixer à la calcineurine, une sérine phosphatase calcium-dépendante, dont l'activité phosphatasique est ainsi inhibée. Cette activité phosphatasique intervient dans la déphosphorylation du facteur de transcription NFAT (Nuclear Factor of Activated T cells), qui sous forme déphosphorylée est alors transloqué dans le noyau et peut initier entre autres la transcription de gènes de cytokines tels que IL2, IFN γ , TNF α [17]. La conséquence est une inhibition de la prolifération lymphocytaire dès le stade précoce de l'activation par l'antigène. L'expression restreinte du facteur NFAT explique aussi la relative sélectivité d'action de ces médicaments.

La comparaison entre la CsA et le FK506 en transplantation de rein a pu mettre en évidence une diminution de l'incidence du rejet aigu des patients sous FK506 [18,19,20], mais pas de différence quant à la survie du greffon à long terme en raison de leur néphrotoxicité. C'est pourquoi, depuis l'émergence des nouveaux agents immunosuppresseurs, l'hypothèse de

l'emploi de thérapeutiques alternatives a été soulevée pour pallier au problème de leurs effets délétères sur le rein à long terme [21].

2.2. Modulation de la réponse immunitaire

Les récents progrès en matière de drogues immunosuppressives font appel aux différents mécanismes évoqués dans la reconnaissance de l'alloantigène et à l'origine de l'expansion de la réponse immune. La recherche de la tolérance du receveur vis-à-vis du greffon représente aussi un enjeu sérieux en transplantation d'organes et a à sa disposition de nombreuses molécules en cours d'évaluation qui touchent des cibles de plus en plus spécifiques et précises, situées en première ligne dans la prolifération des cellules alloréactives, et dont l'inhibition entraînerait la mise au repos de l'arsenal immunitaire. Il est intéressant de noter le développement considérable des anticorps monoclonaux dans le domaine de l'immunosuppression, à rattacher à leur grande spécificité envers une cible donnée.

2.2.1. Inhibition de la prolifération des lymphocytes T, Rapamycine (RPM)-Sirolimus*

Il s'agit d'un macrolide qui se lie à la même immunophiline que le FK 506 (FKBP12), mais sans entraîner les mêmes effets. Son mécanisme d'action consiste en l'inhibition du signal de transduction issu de la fixation de l'IL2 sur son récepteur, empêchant l'expansion clonale des lymphocytes T stimulés par l'antigène. L'effet immunosuppresseur du Sirolimus* par inhibition de la prolifération lymphocytaire est synergique avec celui des ICN, et offre ainsi l'avantage de diminuer les doses d'ICN pour limiter les risques de néphrotoxicité [22].

2.2.2. Anticorps polyclonaux, anticorps monoclonal anti-CD3

L'emploi des préparations d'immunoglobulines date de la fin des années 60 avec les préparations polyclonales d'immunoglobulines antilymphocytaires, qui induisent la déplétion en lymphocytes T circulants par l'action d'anticorps dirigés contre de nombreux antigènes membranaires (CD3, CD4, CD8) et contre des molécules d'adhésion.

Depuis les années 1980, la modulation de la réponse induite par la reconnaissance du TCR avec un antigène spécifique est possible grâce à l'utilisation d'un anticorps monoclonal dirigés contre le CD3 (Muromonab*) qui est actuellement utilisé en phase d'induction durant les deux premières semaines après la-transplantation. Cet anti-CD3 possède l'inconvénient d'induire le relargage de cytokines (IFN γ , TNF α) occasionnant des troubles plus ou moins sévères (frissons, fièvre, diarrhée, troubles respiratoires...), d'où la prévention de cet effet par l'injection de fortes doses de méthylprednisolone. Un anticorps monoclonal anti-CD3 humanisé, le HuM291 ou visilizumab, est en cours d'essai clinique notamment chez des patients transplantés rénaux, il entraînerait un relargage modéré de cytokines [23,24,25].

2.2.3. Anticorps anti-récepteurs de l'IL2 (Daclizumab* et Basiliximab*)

Les anticorps anti-récepteurs de l'IL2, anti-IL2R ou anti-CD25, sont mieux tolérés car ils n'induisent pas de relargage des cytokines.

Basiliximab (Simulect*-Novartis) est un anticorps monoclonal chimérique (40% d'origine murine/60% d'origine humaine), c'est-à-dire que les chaînes lourdes et légères des régions constantes d'origine murine sont remplacées par des régions constantes d'origine humaine de type IgG1 κ .

Daclizumab (Zenapax*-Roche) est un anticorps monoclonal humanisé (10% d'origine murine/90% d'origine humaine), c'est-à-dire qu'il ne reste des anticorps murins parentaux que les régions variables (ou CDR pour région déterminant la complémentarité) responsables de la liaison au récepteur de l'IL2, le reste de la structure de ces anticorps correspond à la structure d'une immunoglobuline humaine de classe IgG1.

La cible de ces anticorps monoclonaux est la chaîne α du récepteur de l'IL2 (CD25). Le récepteur membranaire de l'IL2 est composé de 3 chaînes (α , β , γ). Seules les chaînes β et γ sont présentes sur le lymphocytes T au repos et possèdent une faible affinité pour l'IL2.

L'activation des lymphocytes T induit une forte expression des chaînes α dont une partie s'associe aux 2 autres chaînes pour former un récepteur de haute affinité pour l'IL2, et une partie est libérée sous forme soluble.

Ainsi Daclizumab et Basiliximab bloquent l'interaction IL2/récepteur au niveau des lymphocytes T activés. Ils induisent une déplétion lymphocytaire par opsonisation. En effet l'isotype IgG1 de la chaîne lourde induit des mécanismes effecteurs de lyse cellulaire de type ADCC via le récepteur au fragment Fc des immunoglobulines.

Ces anticorps sont indiqués dans la prophylaxie du rejet aigu en transplantation rénale, en association avec la CsA (ou FK506), aux CS, ainsi qu'au MMF pour le Zenapax*.

Les recommandations pour l'utilisation du Basiliximab sont de 2 doses de 20 mg en IV, la première dose est administrée dans les 2 heures avant la transplantation et la deuxième dose doit être donnée 4 jours après l'intervention. Quant au Daclizumab, 5 doses sont recommandées au total, avec une dose de 1 mg/kg/jour toutes les 2 semaines, la première dose devant être administrée dans les 24 heures précédant la transplantation.

Leur utilisation s'est révélée efficace en transplantation rénale, dans des essais excluant les corticostéroïdes dans le traitement immunosuppresseur [26]. Ils ont permis aussi d'assurer un relais immunosuppresseur efficace en transplantation d'organe, lors du retrait temporaire des ICN en cas de dysfonction aigu de la fonction rénale [27].

2.2.4. Agents inducteurs de la tolérance

Dans l'article de Dong et al [28], il a été mis en évidence l'intérêt du blocage des signaux de costimulation issus de la liaison des molécules B7/CD28, par l'emploi d'un anticorps monoclonal anti-CD28. Par ailleurs, ce blocage spécifique favoriserait l'interaction des molécules B7/CTLA-4, connue pour promouvoir la tolérance du greffon.

Selon le même principe, d'autres signaux de costimulation ont été visés pour moduler la réponse immunitaire (anti-CD40L, CTLA4-Ig qui est une molécule de fusion associant la région extracellulaire de la molécule CTLA-4 et le fragment Fc de l'IgG1 humaine et qui agit comme antagoniste compétitif par rapport à l'interaction CD28-B7), ainsi que certaines molécules d'adhésion (anti-VLA-4, anti-LFA-1, anti-ICAM-1) [13].

Des protéines de fusion à visée cytotoxiques ont aussi été obtenues par l'association du gène d'une cytokine et celui d'une toxine (l'anti-CD3 immunotoxine est une molécule chimérique, composée d'un anticorps monoclonal anti-CD3 humanisé combiné à la toxine diphtérique). La tolérance du greffon est induite par l'internalisation de la toxine et la destruction de la cellule possédant le récepteur de la cytokine.

3. MONITORING PHARMACOLOGIQUE ET PHARMACODYNAMIQUE DE L'IMMUNOSUPPRESSION, ET ADAPTATION THERAPEUTIQUE

Nous évoquerons d'abord les problèmes liés à la nécessité de maintenir l'équilibre en matière d'immunosuppression ; d'une part une immunosuppression insuffisante peut entraîner le rejet aigu du greffon, et d'autre part, une surimmunosuppression comporte le risque d'induire des tumeurs et/ou des infections opportunistes, en particulier à virus cytomégalique CMV.

La surveillance thérapeutique du receveur s'opère par le dosage sanguin de certaines des molécules immunosuppressives associées dans un traitement. Le problème se trouve au niveau de la spécificité des tests utilisées puisque les anticorps employés dans les trousses de dosage ne reconnaissent pas toujours uniquement la molécule-mère d'un immunosuppresseur, ils peuvent aussi reconnaître plus ou moins les molécules dérivées de son métabolisme, possédant différents degrés d'activités immunosuppressive et toxique par

rapport à la molécule-mère. Ces incertitudes sur les molécules réellement dosées amènent alors à se poser des questions sur le niveau d'immunosuppression réel du patient, ce qui a conduit à envisager de nouveaux schémas de suivi des taux thérapeutiques afin d'obtenir le meilleur reflet de l'imprégnation par les immunosuppresseurs, notamment en ce qui concerne le suivi du traitement par la ciclosporine. Par ailleurs, certaines équipes ont mis au point des tests biologiques destinés à mesurer l'activité immunosuppressive au sein même des lymphocytes sanguins et des tissus, mais ce type de méthode est souvent plus complexe à réaliser et à interpréter qu'un simple dosage pondéral, et donc moins adapté à la routine.

3.1. Immunosuppression : entre insuffisance et excès

3.1.1. Rejet aigu

Actuellement, le rejet aigu est relativement bien contrôlé par la thérapeutique immunosuppressive et le taux de survie après un an représente un peu plus de 90% [113]. Le mécanisme essentiel est une infiltration du greffon par les lymphocytes T du receveur avec réaction d'hypersensibilité à médiation cellulaire. S'il est diagnostiqué suffisamment tôt, il est possible de traiter le rejet aigu et d'obtenir la réversibilité des effets aigus grâce à un protocole d'immunosuppression intensive par augmentation des doses de corticostéroïdes, et en cas de corticorésistance, par utilisation de globulines anti lymphocytaires ou d'anticorps anti-CD3.

La cytologie par ponction-aspiration du transplant est encore la méthode de référence pour le diagnostic du rejet aigu malgré les risques pour le greffon. L'alternative serait le recours à des outils diagnostiques non invasifs permettant une évaluation précoce de l'état du transplant, mais ceci reste un enjeu, même si de nombreux paramètres biologiques ont été évalués sans avoir été retenus en pratique courante du fait de leur coût et de leur manque de spécificité.

3.1.2. Infection à Cytomégalo­virus (CMV)

3.1.2.1. Généralités

Appartenant à la famille des Herpesviridae, le CMV reste latent dans différents types de cellules après la primo-infection, notamment au niveau de certains lymphocytes T, des macrophages ou des cellules endothéliales. Lors de sa réactivation qui survient en général au moment où l'immunosuppression est la plus forte, c'est à dire entre le premier et le quatrième mois, il peut être détecté au niveau de l'organe cible ou bien au niveau sanguin. Lorsque seuls les tests biologiques de détection sont positifs, il s'agit d'une infection à CMV asymptomatique ; lorsqu'elle s'accompagne de manifestations cliniques (neurologiques, digestifs, pulmonaires, rétinite), il s'agit d'une maladie à CMV. La prévalence de l'atteinte par le CMV chez les greffés rénaux est estimée à 40% pour l'infection et à 13% pour la maladie [29].

3.1.2.2. Prévention

Le statut immunitaire vis-à-vis du CMV est systématiquement recherché par des dosages sérologiques chez les couples donneur/receveur d'une transplantation d'organe. La situation idéale serait alors de réserver la transplantation des organes de donneur CMV négatifs (D-) à des receveurs CMV négatifs (R-). Pour éviter les complications liées à la maladie à CMV, différentes stratégies de prophylaxie primaire sont envisagées, soit systématique, soit ciblée aux patients les plus à risque (D+/R-). Le traitement prophylactique anti-CMV peut faire appel à l'aciclovir, au valaciclovir, au ganciclovir oral et au valganciclovir. En transplantation de rein, il est administré globalement pendant 3 mois post-greffe mais peut être prolongé si l'immunosuppression induite par les médicaments reste importante.

3.1.2.3. CMV et rejet de greffe

La gravité de la maladie à CMV est liée non seulement aux effets délétères sur les organes cibles, mais aussi à son impact sur l'organe transplanté. Ainsi, Boudjora et al. [30] ont retenu que chez les transplantés rénaux, la maladie à CMV augmentait le risque de rejet aigu du

greffon d'un facteur 6, lorsqu'elle s'accompagne d'une forte réaction inflammatoire. Il en est de même en ce qui concerne le rejet chronique. Dans des modèles de transplantation rénale réalisée sur des rats [31,32], infectés ensuite par le virus CMV, des lésions propres au rejet chronique ont été observées (fibrose, rétrécissement de l'intima vasculaire...). Ces lésions font suite à une importante réaction inflammatoire qui s'accompagne de l'augmentation des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1) sur le greffon, de la production de facteurs de croissance (TGF β , platelet-derived growth factor...) induisant la prolifération des cellules musculaires lisses et la synthèse de collagène par les fibroblastes.

3.2. Monitoring pharmacologique du traitement par ICN

3.2.1. Monitoring pharmacologique du traitement par CsA

3.2.1.1. Propriétés pharmacologiques de la CsA

La CsA est une molécule hautement lipophile. Son absorption rencontre des variations très larges tant au niveau d'un même patient que d'un patient à l'autre, en fonction entre autres de l'alimentation et de son métabolisme intestinal lié à l'activité du cytochrome P450 3A4 dans les entérocytes, et de l'activité de la glycoprotéine-P ou (PgP) assurant le contre-transport de la CsA vers la lumière intestinale [33]. Une fois absorbée, la molécule-mère génère plusieurs métabolites en quantité variable, qui dépend essentiellement de l'activité catalytique du cytochrome P450 3A au niveau hépatique. Il existe une trentaine de métabolites potentiellement immunosuppresseurs et/ou toxiques [34] et certains d'entre eux peuvent donner lieu à des réactions croisées avec la CsA dans de nombreuses trousse de dosage (AM1 et AM9 surtout, AM19, AM4n et AM1c9) [35,36]. La chromatographie liquide haute performance (HPLC) est la méthode de référence pour le dosage de la CsA. Elle représente la méthode la plus spécifique de la molécule-mère, mais son inconvénient majeur vient de sa mise en pratique qui est longue et fastidieuse. D'autres méthodes basées sur

l'emploi d'anticorps plus ou moins spécifiques ont été mises au point pour rendre le dosage de la CsA plus pratique. Dans l'article de Steimer [37], la spécificité des trousses de dosage commercialisées est évaluée par rapport à l'HPLC. Il s'agit des trousses EMIT (Behring Diagnostics Inc.), CEDIA (Boehringer Mannheim), FPIA (fluorescence polarization immunoassay) sur automate AxSYM (Abott), TDX polyclonal et monoclonal (Abott), et CYCLOTRAC* RIA (méthode radioisotopique, Incstar Corporation). Les résultats des dosages comparatifs montrent que pour les méthodes RIA et EMIT, il y a moins de réactions croisées avec les métabolites de la CsA.

3.2.1.2. Schéma de surveillance des taux thérapeutiques de CsA

La mesure de la concentration résiduelle de la CsA, nommée C0, effectuée avant une nouvelle administration de CsA, est le plus souvent prise en compte en pratique clinique courante. Elle a été choisie du temps où il existait une grande inconstance au niveau de la biodisponibilité du produit dans l'organisme en raison de la lipophilie de la molécule. Depuis l'introduction de la CsA sous forme de microémulsion (Néoral*-Novartis) qui améliore considérablement la biodisponibilité de l'immunosuppresseur, la phase d'absorption qui recouvre les quatre premières heures après l'administration orale, est devenue un bon reflet de l'exposition réelle et efficace à la CsA. Depuis, la mesure du C0 a été remise en question et il a été proposé l'aire sous la courbe de dosage de la CsA (AUC ou area under the curve) comme critère d'efficacité de l'immunosuppression, mais sa détermination qui exige des prélèvements sanguins réguliers sur une période donnée, est une contrainte pour les patients suivis en ambulatoire¹. Le recours à des solutions mathématiques pour prédire l'AUC à partir de deux ou trois points seulement pourrait pallier ce problème [38].

Il y a aujourd'hui de nombreux arguments en faveur du choix du C2 (mesure de la concentration de la CsA deux heures après absorption du médicament) pour la surveillance du traitement par la CsA en transplantation rénale et hépatique, jugée comme le meilleur

¹ Le Meur Yannick dans son mémoire en vue de l'habilitation à diriger les recherches.- Limoges : Université de Limoges, 2001.

marqueur en corrélation avec l'AUC, permettant un ajustement thérapeutique adéquat et opportun pour limiter les effets néfastes de la surexposition à la CsA . Parmi ces arguments, il y a entre autres la possibilité de surexposition à la CsA non estimée par le C0. La mesure du C0 s'effectue en effet avant l'administration d'une nouvelle dose de CsA et ne permet pas de rendre compte des variations lors de la phase d'absorption de la molécule, qui est l'étape critique pour prédire son activité immunosuppressive. Il existe aussi une meilleure corrélation du C2 avec l'aire sous la courbe des 4 premières heures par rapport au C0 [39,40,41].

3.2.2. Monitoring pharmacologique du traitement par FK506

Comme pour la CsA, le dosage du FK506 est nécessaire pour ajuster les taux thérapeutiques en raison d'une grande variabilité intra et inter-individuelle au niveau de son absorption digestive et de sa pharmacocinétique [42]. Le dosage est aussi gêné par la présence de nombreux métabolites plus ou moins actifs [43]. Les concentrations sanguines sont obtenues par méthode ELISA employant des anticorps monoclonaux (trousse Protac II*-Incstar), mais une autre technique de fluorescence à particules offre l'avantage d'être plus rapide et moins coûteuse (Tacrolimus II*-Abott). Il existe une méthode radioactive impliquant la liaison à la protéine FKBP12 (Scintillation Proximity Assay-Amersham Biosciences).

3.3. Monitoring pharmacodynamique de l'immunosuppression par ICN

Nous avons évoqué le manque de spécificité de certaines méthodes de dosage de la CsA par anticorps. Quelques tests fonctionnels sont en cours d'évaluation pour révéler le degré d'inhibition de la réponse immune au sein des lymphocytes du sang périphérique, autrement dit pour juger de l'efficacité de l'exposition aux ICN.

- L'activité phosphatasique de la calcineurine peut être mesurée sur des lysats de cellules ayant été sensibilisées aux ICN, en employant un substrat phosphorylé et radiomarqué au phosphore ^{32}P ; la mesure du phosphore ^{32}P libéré est alors le reflet

de cette activité phosphatasique résiduelle [44]. En fait, les substrats phosphorylés synthétiques formulés pour ces tests peuvent être déphosphorylés par d'autres types de phosphatases, des groupes pp1, pp2a et pp2c. D'une part, l'emploi dans le test d'acide okadaïque va permettre d'inhiber l'activité phosphatasique liée aux pp1 et pp2a. D'autre part, l'activité de la phosphatase pp2c, non inhibée par l'acide okadaïque et résistante à la CsA, peut être évaluée en présence d'un excès de CsA qui inhibe complètement la calcineurine. En soustrayant la part d'activité liée à la pp2c à l'activité phosphatasique résiduelle sous acide okadaïque, on obtient le reflet de l'activité phosphatasique liée uniquement à la calcineurine.

- Taupin et al.[45] ont également développé une méthode sensible et spécifique de détermination de l'immunosuppression réelle, sur la base d'une étude menée antérieurement par Wenner et al.[46].

Partant du principe que les ICN inhibent la transcription du gène de l'IL2, un gène « rapporteur » a été construit, constitué du fragment activateur du promoteur du gène de l'IL2 et de la séquence ADN codant pour la protéine à détecter au final, la GFP (green fluorescent protein). Cette protéine présente la particularité d'être spontanément fluorescente, et donc facile à quantifier sans étape de révélation de sa production par la cellule en cytométrie de flux. Ce nouveau gène a été transfecté dans une lignée lymphoblastoïde T humaine appelée Jurkat ; un clone a été isolé, qui produisait la GFP en réponse à une stimulation de la cellule par un mélange d'activateurs non spécifiques (ester de phorbol et ionophore calcique qui court-circuitent les étapes membranaires de l'activation du lymphocytes T et activent le promoteur du gène de l'IL2). Quand les cellules sont incubées en présence du sang total lysé du patient immunosupprimé, la production de GFP est d'autant plus atténuée que l'activité ICN est plus importante.

3.4. Monitoring des autres immunosuppresseurs (CS, AZA, MPA, RPM)

3.4.1. Mesure des concentrations sériques

Les méthodes proposées pour la mesure des concentrations sériques du CS, AZA, MPA et RPM sont des méthodes immunologiques telles que la méthode EMIT, et physico-chimiques par HPLC. L'intérêt de leurs dosages sériques n'est pas clairement établi, d'autant plus que la corrélation entre les concentrations sériques des molécules dosées et leur efficacité immunosuppressive n'est pas très bonne. Les taux sanguins des immunosuppresseurs dépendent en effet largement de leurs paramètres pharmacocinétiques qui varient en fonction de divers facteurs (liaison aux protéines plasmatiques, interactions médicamenteuses au niveau des cytochromes P450...) [47].

3.4.2. Mesure de l'activité fonctionnelle des cibles des immunosuppresseurs

L'article de Yatscoff et al.[48] présente les méthodes d'évaluation de l'activité fonctionnelle de ces immunosuppresseurs.

3.4.2.1. AZA – activité de la TPMT

Des tests fonctionnels ont été développés en vue d'évaluer l'activité immunosuppressive liée à l'AZA par la mesure de l'activité de la TPMT au niveau érythrocytaire [49]. Une activité faible de la TPMT, responsable de l'accumulation de métabolites myélotoxiques, peut aussi amener à exclure l'AZA des protocoles thérapeutiques.

3.4.2.2. MPA – activité de l'IMPDH

La mesure de l'activité de l'IMPDH au niveau du sang total, utilise un substrat de l'enzyme couplé à une molécule radioactive (^3H), cette molécule est libérée sous l'action de l'IMPDH et la radioactivité est alors mesurée dans le surnageant du milieu de réaction après centrifugation.

L'inhibition de l'activité de l'IMPDH est fonction de la concentration du MPA, mais ces 2 paramètres sont marqués par d'importantes variations intra et inter-individuelles, et il n'a pas été établi de corrélation correcte entre le dosage pondéral et l'activité fonctionnelle du MPA.

3.4.2.3. RPM – activité de la kinase P70 S6

La cible de l'activité immunosuppressive de la RPM est la kinase P70 S6 qui intervient dans la transduction des signaux activateurs de la synthèse de l'IL2.

L'activité de la kinase P70 S6 peut être mesurée sur sang total par des techniques radioactives employant des molécules comme l'ATP possédant un ^{32}P qui est incorporé au niveau des substrats de l'enzyme au cours de réactions de phosphorylation. La corrélation de l'activité de la kinase P70 S6 avec les concentrations sériques de la RPM et la survie du greffon est en cours d'évaluation.

Comme nous le voyons, le suivi de l'efficacité d'un traitement par des méthodes de laboratoire pondérales ou fonctionnelles présente quelques inconvénients liés à la variabilité inter et intra-individuelle des résultats. De plus, les tests fonctionnels restent de réalisation assez délicate et peu adaptée à un fonctionnement de routine.

Une autre approche dans le domaine de l'immunosuppression serait de prédire la réponse au traitement en tenant compte des prédispositions génétiques individuelles pour les médiateurs moléculaires impliqués dans les mécanismes d'action de ces médicaments.

4. POLYMORPHISME GENETIQUE ET ADAPTATION THERAPEUTIQUE EN TRANSPLANTATION

Actuellement, la conception moderne du maniement des immunosuppresseurs est d'ajuster l'immunosuppression à ce qui est souhaitable pour chaque patient pris individuellement en

évitant tout excès ou toute insuffisance susceptibles d'induire des complications inacceptables. Dans cette optique, le concept de la variabilité inter-individuelle dans la réponse au traitement par immunosuppresseurs a été largement exploité ces dernières années, notamment dans le domaine de la biologie moléculaire, qui a pu mettre à jour de nombreux polymorphismes génétiques contrôlant l'expression ou l'activité de gènes qui peuvent participer à la modulation de la réponse au traitement. Ce concept soulève l'espoir d'une possible adaptation thérapeutique de l'immunosuppression en fonction d'un profil génotypique donné, définissant les caractères bon ou mauvais répondeur à un traitement donné, que ce soit sur le plan de l'efficacité du traitement ou bien sur celui de la survenue d'effets indésirables.

Nous avons abordé l'apport de la biologie moléculaire grâce à 2 exemples de familles de gènes polymorphiques :

- Gènes des cytokines
- Gène du récepteur de la fraction Fc des IgG, du type FcγRIIIA

4.1. POLYMORPHISMES DES CYTOKINES

4.1.1. Présentation des cytokines

Dans l'immense réseau que constituent les éléments du système immunitaire, les cytokines assurent la communication intercellulaire. Ce sont des polypeptides solubles de faible poids moléculaire (15 à 25 kilo daltons), plus ou moins glycosylés, dont la production et la sécrétion dans le milieu extracellulaire s'opèrent de manière inductible en réponse à une activation spécifique par un antigène donné, ou bien non spécifique (endotoxines, lipopolysaccharides, autres cytokines...), selon les cytokines. Elles sont représentées par un grand nombre de molécules dont le champ d'action est très vaste puisqu'elles peuvent intervenir au niveau de l'hématopoïèse, la réponse immunitaire et inflammatoire, la survie et

la prolifération cellulaire entre autres. Elles peuvent se fixer sur différents ligands, tels que les récepteurs cellulaires spécifiques, les formes solubles de ces récepteurs qui peuvent pour certains diminuer la quantité des cytokines libres actives qu'ils fixent, ou bien pour d'autres protéger les cytokines fixées de leur catabolisme et de leur élimination rénale [4,50].

4.1.2. Propriétés des cytokines

4.1.2.1. Mode d'action autocrine, paracrine et endocrine

La cytokine peut être utilisée par la cellule qui l'a produite (mode autocrine), par une cellule voisine (mode paracrine) ou bien elle peut agir à distance de sa source (mode endocrine).

4.1.2.2. Pléiotropisme, redondance

Ces deux caractéristiques des cytokines expliquent la difficulté à les étudier in vitro et in vivo.

Le pléiotropisme définit leur propriété à exercer des effets biologiques sur divers types de cellules cibles, et des effets souvent différents selon le type cellulaire sur lequel elle va agir.

La redondance caractérise le fait que différentes cytokines peuvent avoir des effets biologiques identiques sur une même population cellulaire, ce qui peut donner lieu à des effets synergiques. C'est le cas de l'IL2, l'IL4, l'IL6 et l'IL10 permettant la prolifération des lymphocytes B.

4.1.2.3. Antagonisme des cytokines, cytokines Th1 ET Th2

L'antagonisme des effets de certaines cytokines, ainsi que le fait qu'elles soient produites par des cellules différentes permettent de définir deux sous-populations de lymphocytes T auxiliaires, les T auxiliaires de type 1 (Th1) et les T auxiliaires de type 2 (Th2), qui diffèrent par le profil des cytokines sécrétées, celui-ci conférant des fonctions différentes à ces deux sous-populations [51]. Les produits des Th1 sont l'IL2, l'IFN γ et le TNF β et ceux des Th2 sont l'IL4, l'IL5, l'IL6, l'IL10 et l'IL13.

Tout d'abord, l'IFN γ inhibe la prolifération des cellules Th2 alors que l'IL10 inhibe la production des cytokines par les cellules Th1. Au niveau fonctionnel, l'antagonisme se traduit par le fait que l'IFN γ inhibe l'activation des cellules B induite par l'IL4 ; et l'IL4 inhibe la

prolifération lymphocytaire T et B induite par l'IL2.

Par ailleurs, ces deux sous-populations diffèrent entre elles par le type de réaction immunitaire qu'elles induisent. Les cellules Th2 facilitent les réponses humorales principalement à IgE alors que les cellules Th1 interviennent dans les réponses de type hypersensibilité retardée et les réactions inflammatoires. La nature des agents responsables de la stimulation du système immunitaire va influencer la balance Th1/Th2, c'est-à-dire vers une réaction de type cellulaire ou bien vers la production d'anticorps. Il a été montré que l'activation du système immunitaire liée à la reconnaissance des antigènes étrangers portés par un greffon faisait plutôt appel à une réponse Th1, avec la production de cytokines pro-inflammatoires [52,53].

4.1.3. Fonction de quelques cytokines

Nous allons maintenant décrire les cinq cytokines pour lesquelles nous avons essayé de montrer l'implication de leur polymorphisme génétique en transplantation rénale. Nous verrons pour chacune d'elles l'origine et les principales fonctions [50].

4.1.3.1. Cytokines pro-inflammatoires

4.1.3.1.1. *TNF α*

Ce sont les monocytes/macrophages qui sont la principale source de cette cytokine ; les lymphocytes T et les cellules NK en produisent également. Sa principale fonction est d'être pro-inflammatoire, en stimulant de nombreux effecteurs de l'inflammation :

- Croissance des monocytes, cellules dendritiques, lymphocytes T et B activées
- Stimulation des fonctions de reconnaissance ou des mécanismes effecteurs de la cytotoxicité (augmentation de la capacité à présenter l'antigène des cellules dendritiques et des monocytes, de l'expression des molécules d'adhérence type ICAM-1 et des molécules du CMH II sur les cellules endothéliales)

- Stimulation de la production de nombreuses cytokines (dont IL1 et IL6) et de chimiokines
- Induction de la fièvre et de la cachexie
- Action cytotoxique directe

4.1.3.1.2. *IFN γ*

Il est produit par les lymphocytes Th1. Comme cité précédemment, il est un antagoniste des réponses de type Th2. Il va inhiber divers effets de l'IL4 en particulier la synthèse d'IgE. Il agit également par la stimulation de diverses voies d'activation du système immunitaire (activation de la cytotoxicité des cellules T et NK, de la production de cytokines, de la capacité à présenter l'antigène par les monocytes/macrophages et les CD, augmentation de l'expression des molécules du CMH sur les cellules épithéliales et sur les cellules endothéliales, de l'expression des récepteurs de l'IL2 sur les lymphocytes T).

4.1.3.1.3. *IL6*

De nombreuses cellules peuvent produire l'IL6 ; les lymphocytes T et B, les monocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales. Cette cytokine entre en jeu de manière assez précoce, et largement dans l'activation du système immunitaire. Dans le domaine de l'inflammation, elle entraîne :

- La prolifération des lymphocytes T et B activés
- La différenciation des cellules B en cellules sécrétrices d'immunoglobulines
- La différenciation des cellules T cytotoxiques
- L'induction de la synthèse des protéines de la réponse inflammatoire par les hépatocytes

4.1.3.2. Cytokines anti-inflammatoires

4.1.3.2.1. IL10

Cette cytokine est synthétisée par les lymphocytes T et les monocytes/macrophages. Par opposition à l'IFN γ , l'IL10 est un antagoniste des réponses de type Th1.

- Elle inhibe la synthèse des cytokines produites par les Th1.
- Elle inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires issues des monocytes/macrophages activés (IL1, TNF α , IL6, IL8 et IL12).
- Elle inhibe également la capacité de présentation de l'antigène des monocytes macrophages, en diminuant notamment l'expression des molécules du CMH II sur ces cellules ; sur les CPA, elle diminue aussi l'expression des molécules B7.

Enfin, l'IL10 induit la différenciation des cellules B en plasmocytes, et en conséquence la réponse humorale par la production d'immunoglobulines.

4.1.3.3. Cytokines régulatrices, TGF β 1

La famille des TGF β , ou transforming growth factor β , compte trois isoformes, TGF β 1, TGF β 2 et TGF β 3. Elles exercent un effet stimulateur sur l'expression des protéines de la matrice extracellulaire intervenant dans les processus de réparations tissulaires. Le polymorphisme génétique du TGF β 1 a été étudié en transplantation d'organes.

Le TGF β 1 est produit par les lymphocytes T et B, et les monocytes. Cette cytokine intervient principalement dans les processus de réparations tissulaires ; elle stimule la prolifération des fibroblastes, la synthèse de collagène, et en conséquence la synthèse de la matrice extracellulaire, ainsi que le remodelage osseux. Ainsi, elle peut conduire à la mise en place du processus de fibrose qui fait suite à la réaction inflammatoire pour arriver à la cicatrisation des tissus lésés, mais pouvant également entraîner une détérioration des fonctions tissulaires normales [54]. Enfin, le TGF β 1 inhibe la prolifération des lymphocytes T et B.

4.1.4. Définition et étude des polymorphismes

4.1.4.1. Nature des polymorphismes des cytokines

Dans le domaine des cytokines, des polymorphismes continuent d'être mis en évidence, dont la liste est régulièrement mise à jour et publiée sur le site internet

<http://bris.ac.uk/pathandmicro/services/GAI/cytokine4.htm> [55].

Les méthodes d'étude des polymorphismes génétiques des cytokines en transplantation s'apparentent à ceux qui ont été décrits pour l'étude des polymorphismes génétiques associés à de nombreuses manifestations pathologiques. Les modifications observées au niveau des gènes sont de même nature.

Lorsque ces modifications affectent les séquences codantes, il peut résulter des changements fonctionnels nets de la protéine exprimée. Cependant, les variations génétiques n'affectent pas, en général, la séquence codante des cytokines. Elles touchent souvent le niveau d'expression des cytokines selon divers mécanismes, notamment au niveau de la transcription des gènes. Ce sont fréquemment les sites de transrégulation de la transcription, en particulier les régions promotrices, qui font l'objet des variations génétiques. Les plus fréquentes sont tout d'abord les polymorphismes bi-alléliques ou « single nucleotide polymorphism » (SNP), issus de la substitution d'un seul nucléotide, de fréquence supérieure à 1% dans une population. Parmi les caractéristiques du polymorphisme bi-allélique, on peut citer sa transmission héréditaire stable et sa densité moyenne de 1 polymorphisme tous les 1 kb (on considère de manière générale qu'un polymorphisme ne peut pas induire de pathologie, sauf s'il affecte la modulation de l'expression d'un gène).

Ensuite, les polymorphismes peuvent concerner le nombre de séquences répétées dites microsatellites ou « variable number tandem repeats » (VNTR) [56]. Les microsatellites sont présents tout le long du génome. Chaque unité répétée contient entre une et cinq paires de bases. Le nombre de séquences répétées est lié à une instabilité génétique issue le plus souvent des mutations somatiques dans des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, qui se traduit par des erreurs de recopiage des séquences répétées. Il est parfois difficile

d'identifier exactement le ou les mutations d'un gène, c'est pourquoi, la recherche d'une instabilité de microsatellite permet indirectement de mettre en évidence la mutation [114].

4.1.4.2. Corrélation polymorphisme et niveau d'expression des gènes in vitro

La mesure in vitro de l'expression des cytokines repose sur l'utilisation de cultures cellulaires après activation par un mitogène ; les marqueurs mesurés peuvent être l'ARNm (détecté par hybridation in situ) ou bien la protéine elle-même (détectée par méthode ELISA). Plus spécifique est l'évaluation de l'intensité de la transcription, grâce à des méthodes de clonage. Elle consiste en l'isolement des différents allèles d'une région promotrice, qui sont ensuite associés à un gène « rapporteur » puis insérés dans un vecteur d'expression; ces étapes sont suivies par la transfection du gène modifié dans une lignée cellulaire qui exprimera une protéine facilement détectable après activation de la transcription.

4.1.5. Nature des polymorphismes de l'étude

Les positions des polymorphismes génétiques désignés ci-dessous sont données par rapport à la position +1 qui, par convention, désigne le premier nucléotide à partir duquel la transcription commence. Le chiffre -1 désigne le nucléotide qui le précède.

4.1.5.1. Polymorphisme du TNF α

4.1.5.1.1. Localisation et conséquence du SNP

C'est dans la région promotrice du TNF α qu'un important polymorphisme génétique a été trouvé pour cette cytokine, à la base de niveau de production variable. Il s'agit d'un SNP localisé en position -308 du gène (figure 1), où la substitution d'une guanosine en adénosine se traduit par l'existence de deux allèles nommés communément TNF1 -308 G et TNF2 -308 A ou simplement TNF1 et TNF2. Une équipe a utilisé un gène « rapporteur » pour montrer que l'allèle TNF2 -308 A est doté d'une région promotrice plus active pour la transcription du gène du TNF α [57], ce qui a amené à corrélérer cet allèle à une production plus importante de la protéine. L'augmentation de la transcription avec l'allèle mutant serait due à une

conformation particulière de la chromatine, qui favoriserait l'interaction de la région promotrice avec des facteurs activateurs de la transcription.

Un autre SNP est connu sur le promoteur du gène du TNF α , en -238, où l'allèle TNFA possède une adénosine et l'allèle TNFG une guanine.

4.1.5.1.2. Implication dans d'autres pathologies

Du fait d'un déséquilibre de liaison entre le TNF2 -308A et les allèles du système HLA constituant l'haplotype HLA A1 B8 DR3 associé à de nombreuses maladies auto-immunes, le TNF2 a pu être associé à ces mêmes maladies qui sont par exemple le diabète insulino-dépendant, le lupus érythémateux disséminé, la maladie coeliaque [58].

Son rôle dans la gravité de certaines maladies infectieuses a été rapporté, dans le neuropaludisme et la leishmaniose, en rapport à son impact sur le développement et le maintien de la réponse inflammatoire [59].

4.1.5.2. Polymorphisme de l'IFN γ

Les polymorphismes les plus décrits pour l'IFN γ sont situés sur le premier intron. Ils sont fondés sur le nombre de séquences CA répétées, à l'origine de cinq allèles [60]. L'allèle 2 correspondant à un nombre de 12 séquences CA répétées a été associé au phénotype « fort producteur d'IFN γ » [61].

Un autre polymorphisme existe également sur le premier intron en position +874 (figure 2) et consiste en la substitution d'une thymidine en adénosine, il y aurait un déséquilibre de liaison entre ce SNP et le polymorphisme du nombre de séquences CA répétées.

L'allèle IFN γ +874 T détermine une production plus importante de cette cytokine.

4.1.5.3. Polymorphisme de l'IL6

Il a été décrit pour l'IL6, un polymorphisme dans la région promotrice du gène en position -174 (figure 3), permettant de dénombrer deux allèles IL6 -174 C et -174 G, ce dernier résultant en un phénotype fort producteur. En effet, la présence d'une cytosine en -174 crée

un site de fixation pour le facteur de transcription NF-1 dont la fonction est de réprimer l'expression du gène [62].

4.1.5.4. Polymorphisme de l'IL10 [56,60,63,64]

Trois substitutions de nucléotides ont été largement décrites pour l'IL10 positionnées en amont du site de transcription (figure 4). Il s'agit des génotypes -1082 G/A, -819 T/C, -592 A/C. Le phénotype de production pour chacun des trois polymorphismes bi-alléliques reste à éclaircir. Il est associé à l'allèle -1082 A un phénotype faible producteur d'IL10.

Par ailleurs, il a été observé un déséquilibre de liaison entre les allèles issus des polymorphismes observés, dont le résultat est l'existence de trois haplotypes majoritaires GCC, ACC et ATA, dont l'impact au niveau phénotypique a également été exploré.

L'haplotype GCC est associé à une augmentation de la synthèse de l'IL10.

4.1.5.5. Polymorphisme du TGFβ [56,60,64]

Le niveau d'expression du gène du TGFβ1 peut être influencé par deux mutations localisées au niveau de la séquence signal du gène. Les éléments modifiés sont les codons 10 et 25 (figure 5). Les mutations sur ces codons modifient également les acides aminés correspondants.

Au codon 10 peut se produire la substitution C/T en position +869 du gène, se traduisant par les acides aminés proline ou leucine.

Au codon 25 peut se produire la substitution G/C en position +915 du gène, se traduisant par les acides aminés arginine ou proline.

Le phénotype fort sécréteur de TGFβ1 est associé au profil comportant au codon 25 le génotype +915 GG et au codon 10 les génotypes +869 CT ou +869 TT.

Les figures 1 à 5 suivantes décrivent les positions des SNP sur les gènes des 5 cytokines étudiées. Les rectangles grisés représentent les séquences codantes des gènes.

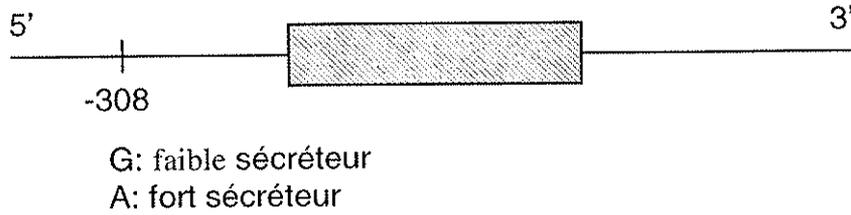


Fig. 1. Représentation du SNP présent sur le promoteur du gène du TNF α

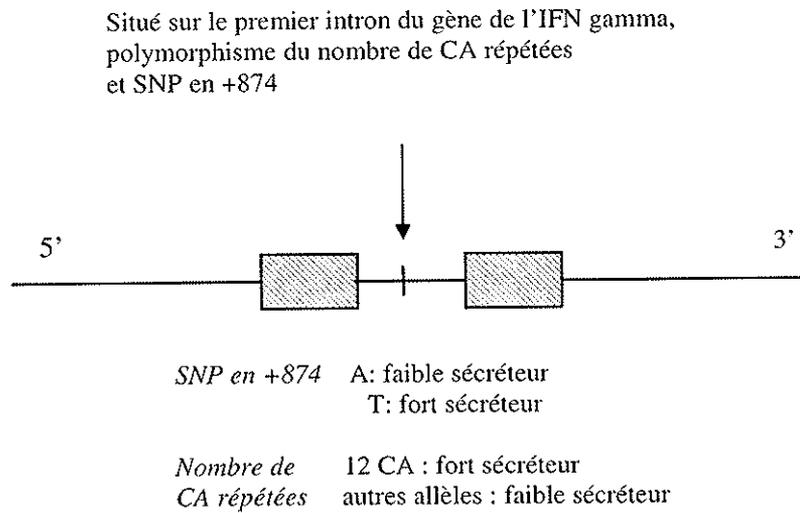


Fig. 2. Représentation des polymorphismes situés sur le premier intron du gène de l'IFN γ

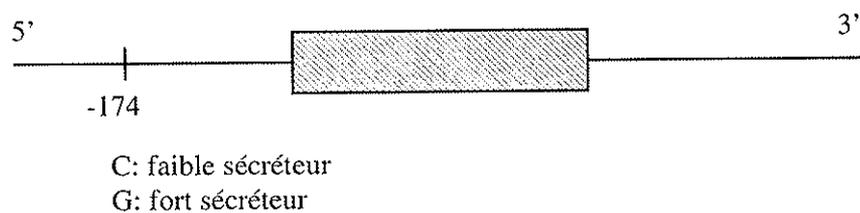


Fig. 3. Représentation du SNP sur le promoteur du gène de l'IL6

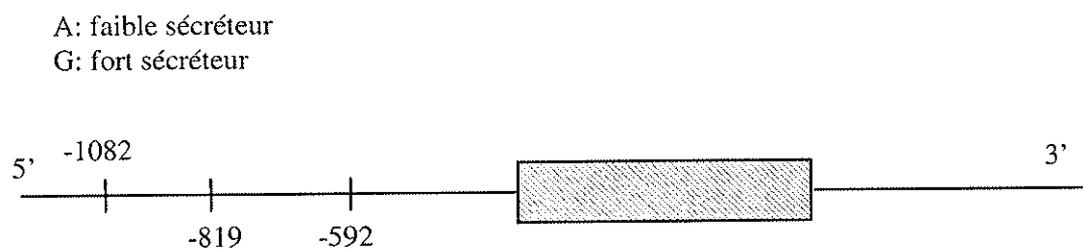


Fig. 4. Représentation des 3 SNP présents au niveau de la région promotrice du gène de l'IL10

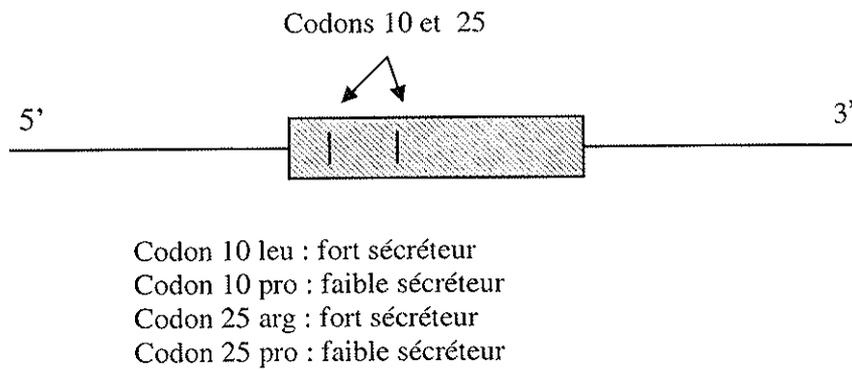


Fig. 5. Représentation des SNP présents au niveau de la séquence signal du gène du TGF β 1

4.1.6. Implication des cytokines en transplantation

Malgré l'enthousiasme soulevé par la recherche de l'implication du polymorphisme des cytokines sur l'issue de la greffe, les résultats obtenus peuvent être très variables pour un même organe et d'un organe à l'autre.

4.1.6.1. TNF α

4.1.6.1.1. *Transplantation hépatique*

L'allèle TNF2 -308 A est associé à la survenue des rejets aigus et parfois à leurs récives [65], bien que certaines équipes concluent le contraire [66,67].

4.1.6.1.2. *Transplantation rénale*

Différents résultats ont également été rendus en transplantation rénale. Certaines études ne montrent pas d'association avec le rejet aigu [68,69], d'autres trouvent une association de l'allèle TNF α -308 A avec les rejets aigus récidivants [70], notamment en cas de transplantation rénale sur receveur HLA incompatible [71] avec 70-80% de rejet aigu survenant chez les porteurs des génotypes fort producteur de TNF α .

4.1.6.1.3. *Transplantation cardiaque*

Le génotype faible producteur TNF α -308 GG a été associé à un effet protecteur sur le greffon [72], parfois aucune association n'est observée [73].

4.1.6.2. IL10

4.1.6.2.1. *Transplantation hépatique*

Il a été montré pour l'IL10, soit aucune influence sur le rejet [65], soit des résultats contradictoires ainsi d'un côté, le génotype haut producteur -1082 GG a été associé au rejet aigu [66], de l'autre, c'est le génotype faible producteur qui y est associé [67,74].

4.1.6.2.2. Transplantation rénale

Les études concluent le plus souvent en l'absence d'association des génotypes de l'IL10 considérés isolément avec la survenue du greffon en transplantation rénale [68,69,75].

4.1.6.2.3. Transplantation cardiaque

Association du génotype IL10 -1082 GG, fort producteur, et effet protecteur [72].

4.1.6.3. Association de génotypes du TNF α et de l'IL10

L'association des génotypes du TNF α et de l'IL10 est souvent considérée dans les travaux sur l'implication du polymorphisme génétique des cytokines en transplantation d'organes.

Dans une étude de transplantation hépatique pédiatrique [76], les enfants qui ont bien toléré le retrait protocolaire de tout immunosuppresseur sur une période de deux ans étaient souvent de génotype d'IL10 -1082 GG (fort producteur) /TNF α -308 GG (faible producteur).

Dans l'article de Marshall et al., la combinaison de l'allèle TNF α -308 A (fort producteur) et du génotype IL10 -1082 GG (fort producteur) n'entraîne pas plus de rejet aigu puisque 15% des patients transplantés rénaux n'ayant pas présenté de rejet aigu possède cette association de génotypes, contre 14% des patients ayant fait un rejet aigu [69]. En revanche, il a été observé, avec cette association de l'allèle TNF -308A et du génotype IL10 -1082 GG, plus d'épisodes de rejets aigus multiples en cas de transplantation rénale HLA-DR incompatible [71].

Par rapport à la combinaison des génotypes du TNF α et de l'IL10 significative en transplantation rénale, il existe une petite différence en transplantation cardiaque avec la combinaison de l'allèle TNF α -308 A (fort producteur) et du génotype IL10 -1082 AA (faible producteur) qui est associée à un risque plus élevé de rejet aigu [72].

4.1.6.4. IL6

Le génotype fort producteur de l'IL6 (-174 G) du receveur a pu être associé au rejet aigu après transplantation rénale [70].

Parallèlement, d'autres résultats plaident nettement en faveur de l'association du génotype IL6 -174 CC (faible producteur) chez le donneur, et la survenue du rejet aigu en transplantation rénale.

4.1.6.5. IFN γ

Le génotype fort producteur de l'IFN γ , cytokine pro-inflammatoire, a été mis en cause dans le rejet aigu de greffe rénale, notamment chez les patients recevant la ciclosporine en monothérapie, et ceux présentant des incompatibilités HLA avec le greffon [77].

Son rôle dans la détérioration tardive du greffon est également évoqué ; notamment en transplantation pulmonaire où l'allèle 2 (fort producteur) issu du polymorphisme du gène de l'IFN γ sur le nombre de séquences CA répétées, conditionne l'installation d'une fibrose [78].

4.1.6.6. TGF β 1

Le polymorphisme de cette cytokine a été principalement développé dans le cadre du rejet chronique, étant donné ses propriétés pro-fibrotiques ; les associations positives sont surtout observées en transplantation pulmonaire [79,80] avec le génotype TGF β 1 codon 25 Arg/Arg ou 25 GG (fort producteur), et en transplantation cardiaque en revanche avec le génotype TGF β 1 codon 10 Pro/Pro ou 10 CC (faible producteur) [80].

D'autres études contredisent le fait qu'il existe une association entre le polymorphisme génétique du TGF β 1 et la survenue du rejet chronique en transplantation hépatique [65,68] et en transplantation rénale [68].

La prise de CsA a été associée à une élévation des taux de TGF β [81,82] (ARNm et protéine) chez les receveurs, d'où l'évocation d'une association avec la néphrotoxicité de ce médicament qui permet de se demander s'il faut réduire de manière préventive les doses de CsA sur la base du génotype des receveurs identifiés haut producteur de TGF β 1. Certaines observations émettent pourtant le fait que l'élévation du TGF β est une conséquence des lésions tissulaires naissant des dysfonctions d'organes et non une conséquence des propriétés pharmacologiques de l'immunosuppresseur lui-même [17,83].

4.2. POLYMORPHISME DU FCGR11A ET TRANSPLANTATION

Les récepteurs au fragment Fc des immunoglobulines (FCR) sont des récepteurs cellulaires qui se fixent de façon spécifique à certains sites des régions Fc de différentes classes et sous-classes d'immunoglobulines. Les FCR de type γ (FCGR) se fixent à la région Fc des IgG.

Il en existe 3 types :

- Le FCGR de type I (CD64) présent sur les monocytes/macrophages et inductible sur les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, possède une forte affinité pour les IgG
- Le FCGR de type II (CD32) est présent sur les monocytes/macrophages, cellules NK et polynucléaires. Il est caractérisé par une faible affinité pour les complexes immuns multivalents.
- Le FCGR de type III (CD16) est un récepteur de faible affinité pour les IgG. 2 gènes codent pour le FCGR3 ; le gène A code pour le FCGR3 présent sur les monocytes, macrophages et surtout sur les cellules NK (récepteur FCGR11A), le gène B code pour le FCGR3 présent sur les polynucléaires neutrophiles (récepteur FCGR11B). Les gènes FCGR11A ET FCGR11B sont très proches dans leur séquence nucléotidique au niveau de la région extracellulaire qui lie les IgG.

Depuis quelques années, les domaines d'étude des polymorphismes du gène FCGR11A affectant l'affinité du récepteur du fragment Fc présent sur les NK, sont variés ; en pathologie infectieuse [84] ou bien en auto-immunité [85,86,87,88].

Dans le traitement des lymphomes malins non hodgkiniens, Cartron et al [89] ont relevé des réponses différentes au traitement par rituximab (Mabthera*, Rituxan*), un anticorps monoclonal (de type IgG1) dirigée contre le CD20, qui est un marqueur de surface présent

sur les lymphocytes B. Ce traitement fonctionne par le biais de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps comme un des mécanismes effecteurs impliqués dans la déplétion des cellules tumorales. L'anticorps se lie à sa cible cellulaire et mobilise les cellules portant le FCGR3A (NK, macrophages, cellules à potentialités cytolytiques).

Deux allèles ont été décrits pour le gène FCGR3A, liés à la substitution d'un seul nucléotide (G→T) en position +559 du gène, et à l'origine des deux allotypes du récepteur, qui diffèrent par l'acide aminé en position 158, phénylalanine (FCGR3A 158 F) ou valine (FCGR3A 158 V). Il a été démontré que les homozygotes FCGR3A 158 V fixaient plus fortement les IgG1 humaines par rapport aux homozygotes FCGR3A 158 F et aux hétérozygotes FCGR3A 158 V/F. Considérant ce critère, l'étude a permis de montrer que les porteurs homozygotes de l'allèle FCGR3A 158 V témoignent d'une meilleure réponse au traitement. En effet, les critères d'appréciation de la réponse au traitement dans l'étude étaient d'une part d'ordre clinique avec les taux de rémission complète (CR), de rémission complète non confirmée (CRu), de réponse partielle (PR), et d'absence de réponse ; et d'autre part, d'ordre moléculaire avec l'analyse du réarrangement du gène BCL2-JH par PCR. 3 temps ont été pris en compte pour évaluer la progression de la maladie sous traitement, le moment du diagnostic, 2 mois après le diagnostic (M2) et un an après (M12). Sur le plan clinique, au temps M2 et M12, les taux de réponse des homozygotes FCGR3A 158 V (100%) diffèrent significativement des taux de réponse des porteurs de l'allèle FCGR3A 158 F (67%) ($p=0.03$). Au niveau moléculaire, la différence de réponse entre les 2 groupes est significative au temps M12. A ce temps, le réarrangement du gène BCL2-JH n'était plus détectable chez 5 patients sur les 6 homozygotes FCGR3A 158 V contre 5 sur les 17 patients porteurs de l'allèle FCGR3A 158 F.

Cette étude laisse entendre que d'autres traitements par anticorps monoclonaux humanisés (IgG1) pourraient aussi être concernés par le polymorphisme du FCGR3A.

Nous formulerons une telle hypothèse dans le cadre du traitement par anticorps anti-CD25 en transplantation rénale.

Matériels et méthodes

1. Population étudiée

La population des patients de notre étude fait partie d'une cohorte de 47 patients transplantés rénaux, suivis après la transplantation dans le cadre d'un projet PHRC (Programme Hospitalier de Recherche Clinique) conduit par le Pr P. Merville et dont les buts étaient d'étudier l'intérêt de tests mesurant l'activité du traitement immunosuppresseur au lieu d'un simple dosage pondéral des molécules immunosuppressives. L'inclusion des patients s'est déroulée de mai 1999 à juillet 2000. Ces patients recevaient comme immunosuppresseurs une association de ciclosporine ou de FK506, avec en plus des corticostéroïdes, et soit de l'azathioprine ou soit du mycophénolate mofétil. Certains d'entre eux ont reçu en traitement d'induction de l'immunosuppression un anticorps monoclonal anti-CD25.

Au cours des 12 mois suivant leur transplantation de rein, un échantillon de sang a été recueilli une fois par semaine le premier mois, puis une fois par mois jusqu'au douzième mois. Une étude de l'activité immunosuppressive du sang total a été réalisée avec le test GFP parallèlement au dosage pondéral de la ciclosporine ou du FK506. Sur chaque échantillon, la production de cytokines IL2, TNF α et IFN γ a été réalisée par cytométrie en flux, en analysant les cytokines dans le cytoplasme cellulaire dans les sous-populations CD4 $^{+}$ et CD8 $^{+}$ de lymphocytes T. Les données du suivi clinique ont aussi été colligées, les deux types principaux d'évènements survenant après la greffe étant le rejet aigu, témoin probable d'une sous-immunosuppression et l'infection à CMV, témoins d'une sur-immunosuppression.

Pour l'étude du polymorphisme des cytokines, nous avons pu obtenir et conserver un échantillon de sang pour 38 de ces patients, vus en consultation au cours de l'année 2002, dans le but de la présente étude du polymorphisme de gènes impliqués dans la réponse immune.

Parmi les 38 patients de notre population, nous avons retenu pour l'étude sur le génotypage du FCGR3A, les patients traités par ciclosporine. Parmi ces patients, ceux qui avaient reçu en traitement immunosuppresseur d'induction un anticorps anti-CD25 font partie du groupe d'étude, les autres qui n'ont pas reçu ce traitement font partie du groupe témoin.

2. Extraction de l'ADN génomique

Nous avons procédé à l'extraction de l'ADN génomique à partir de 200 µl de sang total, issu des aliquotes de sang total conservé au congélateur à -80°C, puis décongelés à température ambiante.

Nous avons bénéficié de la mise à disposition d'un appareil permettant l'automatisation de l'étape d'extraction d'ADN, dans le cadre de son évaluation technique par le laboratoire de virologie dirigé par le Pr H. Fleury (Hôpital Pellegrin-Bordeaux). L'appareil testé est le GenoM^{*}-48 de la société Genovision. Nous avons utilisé avec cet appareil la trousse d'extraction GenoPrep^{*}DNA from Blood-Standard kit. L'extraction débute par une étape de lyse des cellules sous l'action de la protéinase K et d'un tampon de lyse. Des billes magnétiques sont ensuite ajoutées au lysat et l'ADN extrait va s'accrocher à la surface de ces billes. Plusieurs étapes de lavage, nécessaires pour éliminer les débris cellulaires, s'enchaînent dans des puits de lavage successifs. En fin de traitement au niveau d'un puits, la suspension contenant les billes est prélevée et, tandis qu'un aimant retient les billes au sein du dispositif de prélèvement, les liquides ne sont pas retenus et s'écoulent dans ce puits. Ainsi, seules les billes sont transférées dans le puits de traitement suivant.

Cet appareil offre l'avantage de fournir grâce à la technique des billes magnétiques, des acides nucléiques purs prêts pour la PCR à partir de divers échantillons, et il requiert un minimum de manipulation pour réaliser l'extraction d'un grand nombre d'échantillons (48 échantillons sont extraits en un peu moins de 3 heures). Les solutions utilisées au cours de l'extraction ont des forces ioniques différentes, qui font que dans un premier temps l'ADN va

se fixer sur les billes magnétiques et ensuite, il sera entraîné dans le tampon d'élution, que nous avons fixé à 100 µl afin d'obtenir une concentration en ADN théorique conforme aux fourchettes de concentrations recommandées par les techniques PCR utilisées par la suite. Après extraction, nous avons déterminé les concentrations et les puretés de l'ADN extrait au moyen de l'appareil GeneQuant RNA/DNA calculator (Pharmacia Biotech). L'estimation des quantités d'ADN s'effectue par spectrophotométrie dans l'ultraviolet à 260 nm. Il est indispensable de mesurer également l'absorption à 280 nm qui permet d'estimer la contamination éventuelle de l'extrait par les protéines. La pureté de l'extrait est rendue par le ratio de l'absorbance mesurée à 260 nm sur l'absorbance mesurée à 280 nm. Enfin, nous avons conservé les extraits d'ADN au congélateur à -80°C.

3. Génotypage des cytokines

3.1. Principe de la PCR-SSP (sequence specific primer, ou PCR spécifique d'allèle, ou ARMS-PCR pour allele refractory mutation system)

Le principe de la PCR-SSP (pour PCR-sequence specific primer, ou PCR spécifique d'allèle) est basé sur 2 propriétés importantes de la réaction d'hybridation amorces/ADN cible [114].

- En cas de mésappariement en 3' de l'amorce, l'extension est considérablement ralentie par rapport à une hybridation spécifique sans mésappariement. Il faut pour cela utiliser une ADN polymérase dépourvue d'activité 3'→5' exonucléasique qui lui confère la capacité d'exciser un nucléotide incorrectement apparié en 3' d'une amorce. La Taq polymérase extraite de *Thermus aquaticus* que nous utilisons pour nos réactions d'amplification est dénuée d'activité 3'→5' exonucléasique .
- De plus, en cas de mésappariement en 3' de l'amorce, l'hybridation amorce/ADN cible est considérablement déstabilisée.

La technique consiste en l'utilisation de 2 amorces, allant dans le même sens, complémentaires chacune d'un des 2 allèles issus d'un polymorphisme génétique donné (l'allèle normal et l'allèle muté). 2 mélanges réactionnels ou « mix » sont préparés séparément, contenant chacun l'une des 2 amorces. Il existe aussi une troisième amorce allant dans le sens opposé par rapport aux 2 autres amorces, et s'hybridant avec le gène d'intérêt en aval et sur le brin d'ADN complémentaire, à distance des 2 autres amorces, de façon à obtenir en fin d'amplification un fragment d'ADN de taille définie et mesurable. Cette amorce est commune à l'amplification des 2 allèles et elle est présente dans les 2 mix.

Dans l'article de Perrey et al.[90], la PCR spécifique d'allèle est désignée sous la dénomination ARMS-PCR (pour allele refractory mutation system). Les polymorphismes des gènes IL10, TNF α , TNF β , TGF β 1 ont été explorés selon cette technique, et la séquence des amorces utilisées pour l'amplification de chaque gène a été décrite. Les amorces spécifiques, l'une de l'allèle sauvage et l'autre de l'allèle muté ont été construites de telle sorte qu'elles se distinguent uniquement au niveau du dernier nucléotide de leurs extrémités 3', l'amorce spécifique de l'allèle sauvage porte à son extrémité 3' un nucléotide complémentaire du nucléotide définissant l'allèle sauvage, et l'amorce spécifique de l'allèle muté porte en 3' un nucléotide complémentaire du nucléotide définissant l'allèle muté. Cette différence conditionne la capacité à s'hybrider avec le gène normal ou le gène muté, respectivement. Les figures 6 et 7 fournissent l'exemple de l'amplification des gènes TNF1 et TNF2 à partir des amorces décrites dans l'article de Perrey et al.

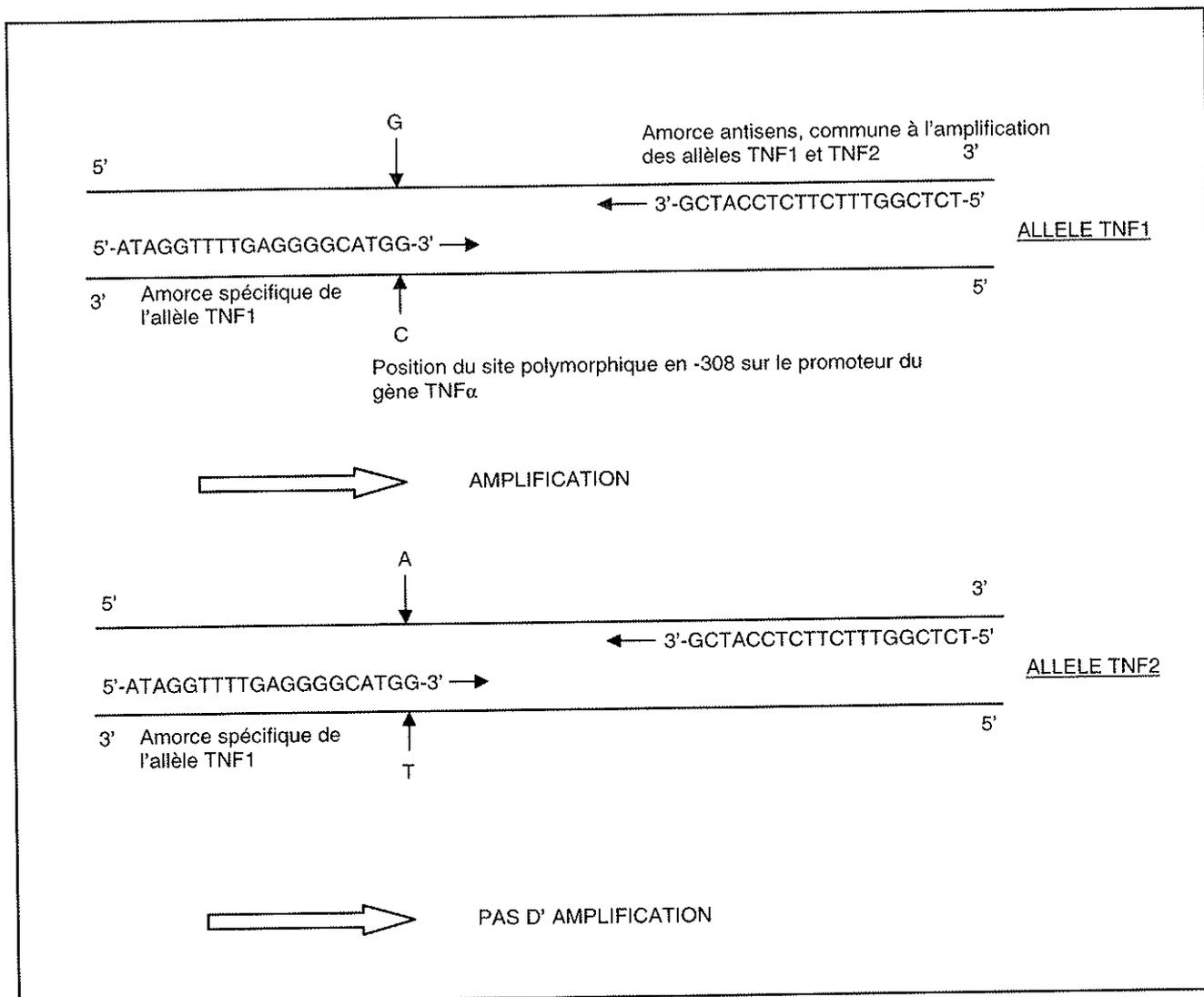


Fig. 6. Représentation de la PCR en cas d'hybridation de l'amorce spécifique de l'allèle TNF α -308G sur les allèles TNF1 et TNF2

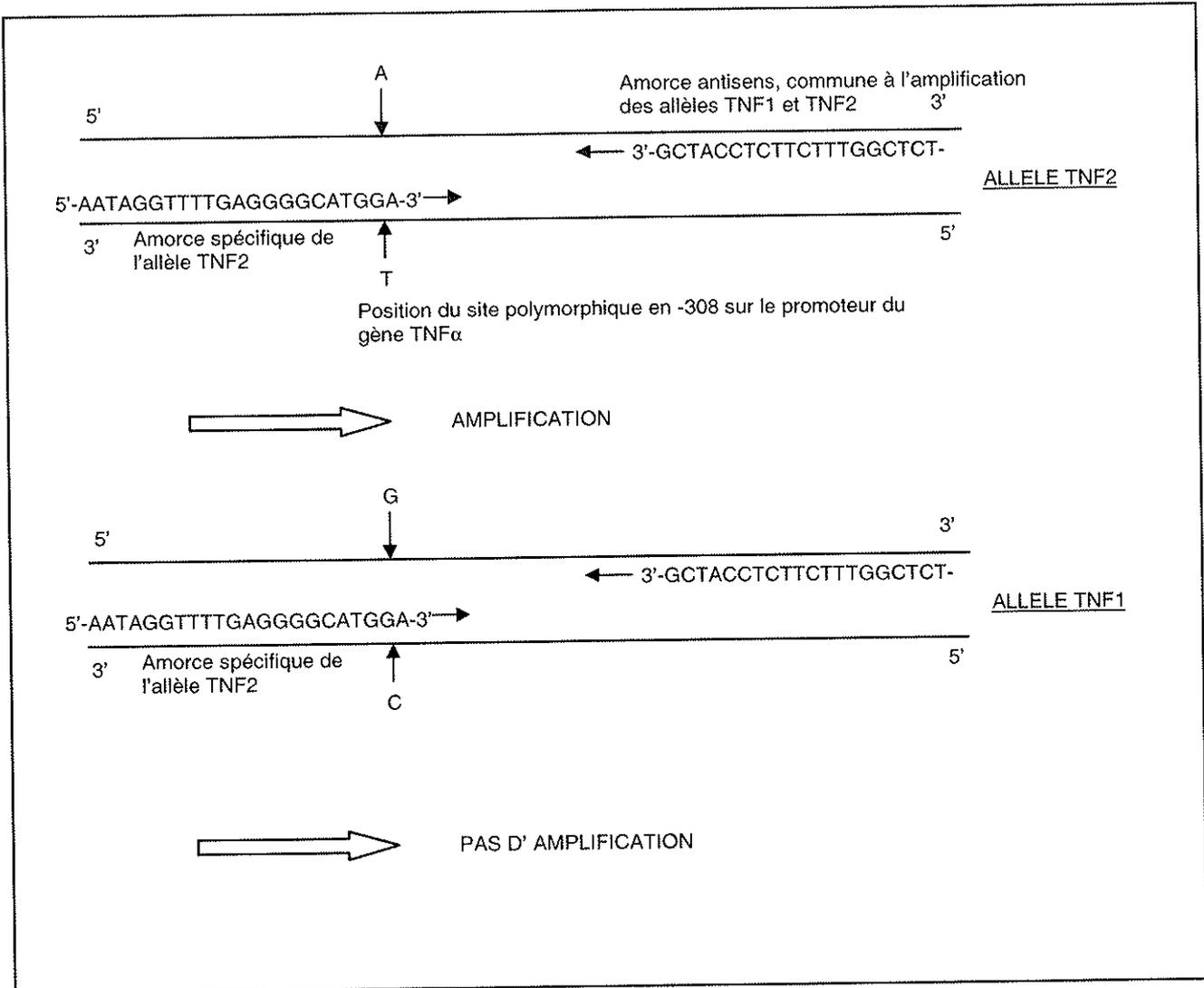


Fig. 7. Représentation de la PCR en cas d'hybridation de l'amorce spécifique de l'allèle TNF α -308A sur les allèles TNF1 et TNF2

3.2. Présentation de la trousse de génotypage et protocole d'utilisation

Nous avons utilisé une trousse pour le génotypage des cytokines fondé sur le principe de la PCR-SSP : Cytokine Genotyping Tray (One Lambda Inc, Canoga Park, CA). Elle permet de déterminer le génotype de 5 cytokines :

- TGFβ1 : polymorphisme du codon 10 (T/C) et du codon 25 (C/G)
- TNFα : polymorphisme de la région promotrice du gène en -308 (A/G)
- IL6 : polymorphisme de la région promotrice du gène en -174 (C/G)
- IL10 : polymorphisme sur la région promotrice du gène en -1082 (A/G), -819 (T/C), -592 (T/A)
- IFNγ : polymorphisme sur le premier intron en +874 (T/A)

La trousse comporte 4 plateaux contenant chacun 96 micropuits (12 rangées de 8). Elle permet de tester au total 24 échantillons. 16 puits de réaction sont nécessaires pour tester tous les polymorphismes pour un patient donné.

La trousse ne fournit pas l'enzyme nécessaire à l'amplification de l'ADN, celle qui est recommandée est une ADN polymérase recombinante, à la concentration de 5 unités/μl.

Nous avons alors utilisé en premier lieu l'AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems) puis une enzyme Taq DNA polymerase classique (Promega Corp.).

Un seul tube réactionnel est préparé par échantillon pour effectuer les 16 réactions d'amplification. En effet, au fond de chaque puits se trouvent sous forme lyophilisées les amorces sens et antisens spécifiques d'un allèle donné. De plus, pour s'assurer de la réunion des conditions optimales d'amplification (présence d'ADN, milieu réactionnel permettant une bonne amplification), un contrôle interne est également amplifié

parallèlement à l'allèle recherché, grâce à la présence dans tous les tubes d'un couple d'amorces nécessaire à l'amplification d'une région conservée du gène de la β globine humaine présent chez tous les individus.

Les extraits d'ADN sont décongelés et réhomogénéisés.

Pour chaque échantillon, un tube réactionnel (mix) est décongelé, dans lequel il suffit de rajouter 1 μ l d'ADN polymérase. Tout d'abord 9 μ l de cette solution sont transférés au premier puits pour servir de contrôle négatif afin de vérifier l'absence de contamination des mix, en réalisant la PCR avec 1 μ l d'eau stérile que nous ajoutons au milieu réactionnel. 19 μ l d'extrait d'ADN pur sont ensuite ajoutés au reste du mix. Ceci correspond à une quantité de 1 μ l d'ADN extrait par puits de PCR (équivalent à 100 ng d'ADN selon les conditions optimales données par la trousse). Le mélange est rapidement vortexé puis 10 μ l de cette solution finale sont alors transférés dans chaque puits de réaction (15 au total) prévus pour la détermination du génotype d'un échantillon.

3.3. PCR

En fin de distribution du milieu réactionnel dans les puits, nous posons un film autocollant sur le plateau pour éviter les contaminations inter-puits, et surtout l'évaporation des milieux réactionnels au cours de la réaction de PCR. Une dernière précaution est prise pour éviter cette évaporation, au moyen d'un tapis de pression à poser sur le dessus du film autocollant avant d'installer le couvercle du thermocycleur, assurant alors une parfaite étanchéité au plateau de micropuits.

L'appareil utilisé pour l'amplification est le thermocycleur 9700-96 puits (Applied Biosystem). Il permet de tester de 1 à 6 échantillons par série de PCR. Il suffit en effet de couper un nombre suffisant de barrette de puits adapté au nombre d'échantillons à tester. Le tableau 1 décrit le programme d'amplification recommandé sur le thermocycleur 9700. Au total, une réaction d'amplification complète dure environ 80 minutes.

3.4. Détection des produits de PCR

Elle se fait par électrophorèse en gel d'agarose à 2,5%. L'étape de dépôt est simplifiée par la présence directe dans le milieu réactionnel d'un tampon de charge (red dye).

Nous préparons un gel d'agarose à 2,5% selon les proportions suivantes :

2,5 g d'agarose (Promega, Agarose LE Analytical Grade)/100 ml de tampon Tris Borate EDTA 1X (TBE 1X).

Le mélange est chauffé jusqu'à dissolution complète de l'agarose, puis nous ajoutons du bromure d'éthidium à une concentration finale de 0,5 µg/ml lorsque la température du gel est de 60°C environ.

Pour couler le gel, nous avons utilisé une cuve à électrophorèse permettant d'adapter 12 peignes de puits pour former 12 rangées de 8 puits, adaptés à l'électrophorèse des 96 produits de PCR d'un plateau de la trousse de génotypage (MicroSSP[™] Gel System MGS108-One Lambda). Le dépôt des produits de PCR est facilité par l'emploi d'une pipette multicanaux. L'électrophorèse est réalisée sous un courant de 140 V, pendant 3 à 5 minutes, et en utilisant comme tampon de migration du TBE 1X. Enfin, la lecture du gel après migration électrophorétique s'effectue au moyen d'un transilluminateur UV (Fisher Bioblock Scientific), et l'interprétation des génotypes se fait selon les profils électrophorétiques schématisés sur la figure 8.

Cycles	Etapes	Température (°C)	Temps (sec.)
1	1	96	130
	2	63	60
9	1	96	10
	2	63	60
20	1	96	10
	2	59	50
	3	72	30
Fin	1	4	infini

Tableau. 1. Tableau des cycles d'amplification recommandés par le kit de génotypage One Lambda

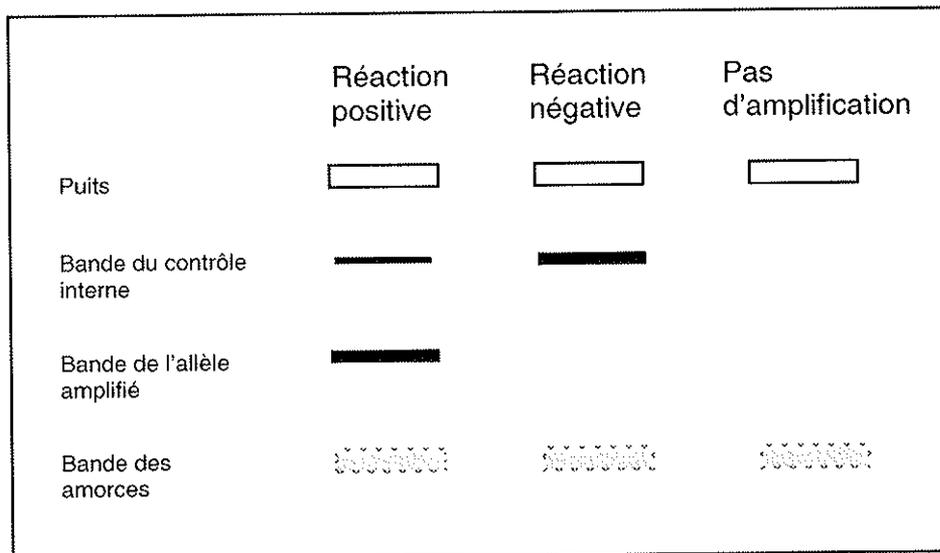


Fig. 8. profil des bandes obtenues à l'électrophorèse

4. Exploitation des résultats obtenus en cytométrie en flux au cours du projet PHRC

Les sous-populations lymphocytaires des patients inclus dans le projet PHRC ont été déterminées en cytométrie en flux à J0, c'est-à-dire juste avant la transplantation, puis une fois par semaine jusqu'au début du premier mois après la transplantation (J7, J14, J21) et enfin une fois par mois à partir du premier mois (M1 à M12). 5000 lymphocytes T sont passés en cytométrie en flux. En plus du marquage CD3+, CD4+ et CD8+, un marquage supplémentaire a été réalisé simultanément pour mettre en évidence la production de cytokines intracellulaires (IL2, IFN γ , TNF α) après stimulation des cellules par un agent activateur polyclonal (association ester de phorbol PMA et ionophore calcique) et inhibition de la sécrétion des cytokines par la monensine. Pour chaque sous-population lymphocytaire, nous disposons donc des pourcentages de cellules capables de produire de l'IL2, de l'IFN γ ou du TNF α dans les sous-populations CD3+ CD4+ et CD3+ CD8+. Seules les données concernant le TNF α et l'IFN γ nous ont été utiles, compte-tenu de l'absence d'étude des polymorphismes génétiques de l'IL2 dans notre travail.

D'autre part, nous avons aussi considéré la moyenne de l'intensité de fluorescence (MFI- Mean Fluorescence Intensity) des cellules capables de produire ces cytokines. Cette valeur représente l'intensité moyenne par cellule de la production de la cytokine. Ce paramètre est complémentaire du pourcentage. En effet, une faible production de cytokines peut être le résultat d'un faible pourcentage de cellules produisant une grande quantité de la cytokine par cellule, ou d'un fort pourcentage de cellules produisant une faible quantité de cytokines par cellule.

Pour notre étude sur le polymorphisme de quelques cytokines, nous disposons donc de données relatives à la production du TNF α et de l'IFN γ (l'IL2 n'a pas été génotypé) au niveau

intracellulaire. En choisissant de quantifier le niveau de production des cytokines chez les patients, d'une part par le pourcentage des lymphocytes CD3+ totaux, CD3+CD4+ et CD3+CD8+ positifs aussi pour les cytokines intracytoplasmiques recherchées, et d'autre part par la MFI, nous allons voir s'il existe une relation entre les génotypes du TNF α et de l'IFN γ et la capacité de production de ces cytokines. Nous nous sommes intéressés au temps J0 pour nous situer avant la transplantation et en dehors du contexte d'une immunosuppression intensive qui pourrait modifier la capacité de production des cytokines par les cellules et donc compliquer l'interprétation du génotypage.

5. Génotypage du FCGR11A

5.1. Principe de la PCR en temps réel et présentation du LightCycler* (Roche)

Cette technique associe 2 avantages [91]:

- Des changements de température très rapides pour la PCR, rendus possibles par la technique du thermocycleur à air pulsé (LightCycler, Roche) qui permet des variations de température de l'ordre de 20°C/sec. La faible inertie thermique du tube réactionnel et le format capillaire, offrant une grande superficie d'échange thermique avec l'échantillon lors des phases de chauffage et de refroidissement, permettent des cycles courts.
- La détection des produits de PCR au cours de la réaction d'amplification, dans la mesure où le thermocycleur est couplé à un microspectrofluorimètre composé de 4 diodes laser (une pour l'émission et 3 pour la réception de fluorescence). A chaque cycle d'amplification, la fluorescence émise au niveau de chaque capillaire est lue par le spectrofluorimètre placé sous le carrousel.

L'appareil dispose d'un carrousel qui permet d'amplifier simultanément 32 échantillons.

Dans le cadre de la détection de mutations, nous avons exploité les propriétés du marqueur SYBR Green I pour l'obtention des courbes de fusion. Comme le bromure d'éthidium, le SYBR Green I se lie préférentiellement à l'ADN double brin et sa fixation à l'ADN double brin augmente considérablement sa fluorescence. En fin de chaque cycle d'amplification, le SYBR Green I peut se lier à l'ADN double brin nouvellement formé et émet alors un signal proportionnel à la concentration en ADN. Cette fluorescence augmente donc

exponentiellement avec le nombre de cycles, permettant le suivi de l'amplification des acides nucléiques en temps réel.

5.2. Principe de l'analyse des courbes de fusion

La technique que nous utilisons dans cette étude est fondée sur les principes de la PCR spécifique d'allèles telle que nous l'avons décrite pour le génotypage des cytokines, et adaptée à la réalisation d'une PCR multiplex grâce à la distinction des allèles par leur courbe de fusion. Dans la PCR multiplex, les amorces spécifiques des 2 allèles (sauvage et mutant) sont présentes dans le même mix et tous les allèles recherchés sont donc amplifiés dans la même réaction de PCR.

Le principe de l'analyse des courbes de fusion repose sur la notion de température de fusion (T_m) qui définit la température pour laquelle la moitié de l'ADN double brin est dénaturé. Le T_m dépend de la composition nucléotidique et de la longueur des fragments d'ADN ; les molécules de DNA riches en G et C ont une T_m plus élevée que celles qui possèdent surtout des bases A et T. En définissant des amorces qui permettent la formation d'hybrides dont les T_m sont suffisamment distinctes sur les graphes de lecture, il est possible de réaliser une réaction de PCR multiplex.

A la fin de la phase d'amplification, il est possible de réaliser la dénaturation progressive de l'ADN en augmentant très lentement la température au-delà du T_m des produits de PCR, tout en mesurant la décroissance de la fluorescence liée à la décroissance du signal émis par le SYBR Green I lorsqu'il se sépare de l'ADN dénaturé. Pour une lecture plus aisée, l'appareil réalise la dérivée première négative de la courbe de décroissance de la fluorescence en fonction de la température ($-dF/dT$).

5.3. Choix des amorces pour la PCR multiplex

Les amorces correspondant à l'allèle sauvage et l'allèle muté seront choisies, pour la réalisation d'une PCR multiplex, de façon à pouvoir observer une différence de température significative lors de l'analyse des courbes de fusion. Pour appuyer ce principe, nous prenons comme exemple les amorces de notre étude déjà décrites par Dall'Ozzo et al.²

Le problème pour le choix du couple d'amorces vient de la grande homologie des gènes du FCGR3A et FCGR3B dans la séquence entourant le polymorphisme du gène FCGR3A.

Pour leur étude, 3 couples d'amorces ont été testés. Ils ont finalement choisi le couple défini par les séquences décrites dans le tableau 2.

- i. Distinction entre le gène FCGR3A et le gène FCGR3B par l'amorce sens commune à l'amplification des allèles FCGR3A 158 V et F

Le gène FCGR3A diffère du gène FCGR3B au niveau du dernier nucléotide sur lequel s'hybride l'amorce sens par son extrémité 3'. En plus de ce premier niveau d'instabilité, pour limiter la fixation de l'amorce sens sur le gène FCGR3B, est introduit un site de mésappariement sur l'amorce sens situé 2 nucléotides avant son extrémité 3'. Au total par rapport au gène FCGR3A, l'amorce sens possède un seul site de mésappariement qui n'est pas situé à l'extrémité 3' mais un peu avant, alors que l'hybridation entre l'amorce sens et le gène FCGR3B est limitée par la présence d'une suite de 2 mésappariements très déstabilisants car situés à l'extrémité 3'.

La séquence de l'amorce sens commune aux deux allèles FCGR3A 158 V et F est représentée sur la figure 9 en comparaison avec la séquence du brin sens des gènes FCGR3A et FCGR3B. Le brin antisens du gène FCGR3B est également représenté pour montrer le site de mésappariement de l'amorce sens à son extrémité 3'.

² Dall'Ozzo S, Andres C, Bardos P et al.- Rapid single-step FCGR3A genotyping based on SYBR Green I fluorescence in real-time multiplex allele-specific PCR.

- ii. Distinction entre l'allèle FCGR3A 158 V et l'allèle FCGR3A 158 F par des amorces antisens différentes

La distinction entre les allèles FCGR3A 158V et 158F dépend des 2 amorces antisens dont les extrémités 3' s'hybrident au niveau du site polymorphique du gène FCGR3A. L'amorce antisens spécifique du FCGR3A 158F est plus longue et possède en plus en 5' une séquence terminale de 26 nucléotides riche en G et C qui augmente le Tm de la molécule [92]. De plus, sur cette amorce antisens longue, se trouvent 2 nucléotides modifiés dont les positions correspondent à celles des 2 derniers nucléotides de l'extrémité 5' de l'amorce antisens courte (spécifique de l'allèle FCGR3A 158 V). Avec ces deux nucléotides modifiés, l'amorce longue antisens possède 4 sites de mésappariements avec l'allèle FCGR3A 158 V, alors que l'amorce courte antisens spécifique de l'allèle FCGR3A 158 V n'en possède qu'un. Sur la figure 10, ce sont les hybridations des amorces antisens sur les brins sens des allèles FCGR3A 158 V et F et sur le gène B, qui sont représentées, avec les sites de mésappariements mis en évidence.

- iii. Hybridation non spécifique

Au niveau du site polymorphique du gène FCGR3A, le gène FCGR3B possède le même nucléotide (G) que l'allèle FCGR3A 158 V, l'amorce antisens spécifique de l'allèle FCGR3A 158 V peut donc s'hybrider au gène FCGR3B et engendrer des fragments parasites.

Nous avons réalisé notre travail de génotypage grâce au couple d'amorces décrit ci-dessous (Qbiogene Inc.). Les solution-mères d'amorce sont préparées de telle sorte que leur concentration finale est de 100 pmoles/L. Ensuite, nous diluons ces solution-mères au dixième pour obtenir des solution-filles prêtes à l'emploi, à une concentration de 10 pmol/l.

Amorces utilisées	Séquence des amorces
Amorce antisens spécifique de l'allèle V	5'-AGA CAC ATT TTT ACT CCC ATC-3'
Amorce antisens spécifique de l'allèle F	5'-GCG GGC AGG GCG GCG GGG GCG GGG COG GTG ATG TTC ACA GTC TCT GAT CAC ACA TTT TTA CTC CCA TA-3'
Amorce sens commune aux 2 allèles	5'-TCC AAA AGC CAC ACT CAA AGT C-3'

Tableau. 2. Amorces utilisées dans l'étude de Dall'Ozzo et al.

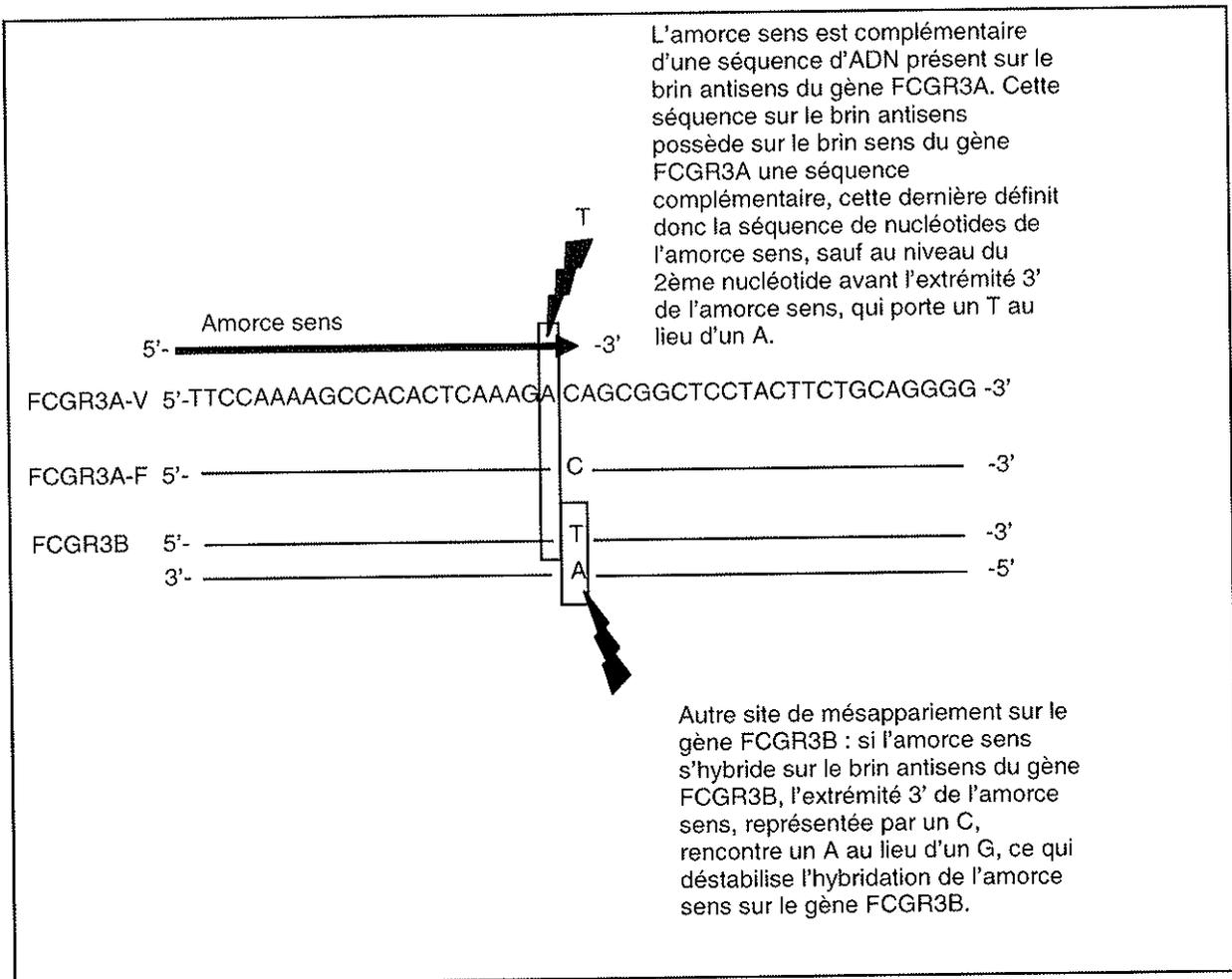


Fig. 9. Représentation de la séquence de l'amorce sens par rapport aux gènes FCGR3A et FCGR3B

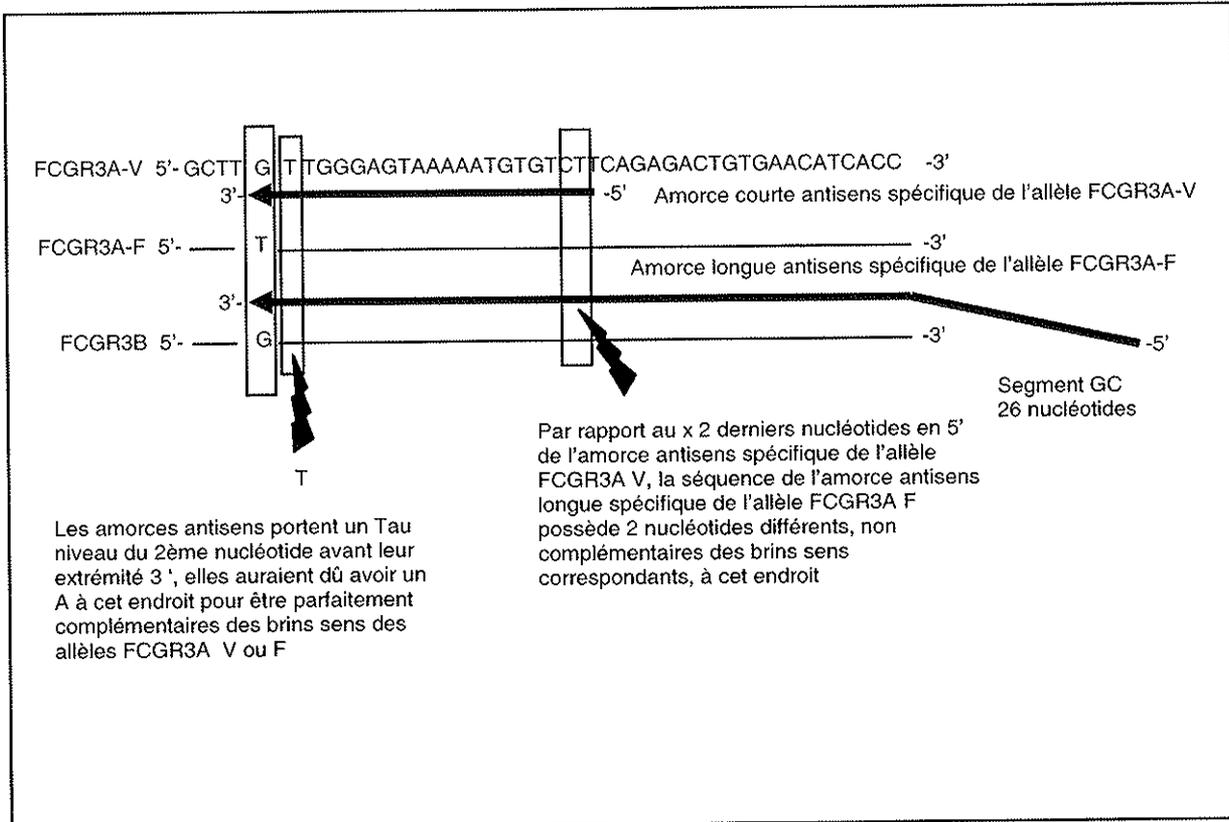


Fig. 10. Représentation de l'hybridation des 2 amorces antisens sur les gènes FCGR3A et FCGR3B

5.4. Protocole d'utilisation

5.4.1. Préparation des mix

Nous sommes partis de l'article de Dall'Ozzo et al. pour le choix des conditions expérimentales de notre étude. Disposant d'un thermocycleur en temps réel (LightCycler) différent par rapport à celui de l'article, nous avons tenu compte des recommandations du fabricant des fiches du LightCycler pour la mise au point de notre protocole d'amplification. Nous avons travaillé avec le kit LightCycler-FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche) pour la préparation de nos mix. La mise au point de la technique a nécessité la préparation de différents mix et la détermination des paramètres optimaux pour la PCR (la concentration en ions Mg^{2+} , le nombre de cycle d'amplification, la quantité d'ADN au départ). Les étapes de cette mise au point sont précisées dans le tableau 3.

Pour chaque manipulation, un témoin négatif sans ADN génomique (composé de 18 μ l de mix PCR et de 2 μ l d' H_2O) est prévu dans la série d'échantillons.

5.4.2. Protocole d'utilisation

Pour chaque échantillon, 18 μ l de mix et 2 μ l de solution d'ADN pure sont transférés dans un capillaire réactionnel. Après avoir bouché les capillaires, une très rapide centrifugation permet de faire tomber le mélange mix et ADN dans la partie inférieure du tube réactionnel, celle-ci doit rester extrêmement propre car la lecture de la fluorescence se fait à ce niveau. Enfin, les capillaires sont déposés délicatement dans le carrousel des échantillons dans le LightCycler.

N° mix	Nombre de cycles	Concentration MgCl ₂ (mmol/l)	Mix/échantillon (µl) (volume mix : 18 µl volume final de réaction : 20 µl)	Concentration finale des réactifs
1	45	2	Tampon Fast Start 2 Amorce sens 1 Amorce antisens courte 1 Amorce antisens longue 1,5 MgCl ₂ 0,8 Eau 11,7 ADN 2	1X 0,5 µmol/l 0,5 µmol/l 0,75 µmol/l 2 mmol/l
2	38	2	Idem Mix 1	
3	38		Tampon Fast Start 2 Amorce sens 1 Amorce antisens courte 1 Amorce antisens longue 1,5 MgCl ₂ 2,4 Eau 10,1 4ADN 2	1X 0,5 µmol/l 0,5 µmol/l 0,75 µmol/l 4 mmol/l
4	35	4	Idem Mix 3	
5	40	4	Idem Mix 3	

Tableau. 3. Compositions des mix utilisés lors de la mise au point du génotypage du gène FCGR3A (l'amorce antisens courte sert à la réaction d'amplification de l'allèle FCGR3A -158V, l'amorce antisens longue sert à la réaction d'amplification de l'allèle FCGR3A -158F)

5.4.3. Programme d'amplification

Le programme d'amplification sur le LightCycler comporte une première étape à 95°C pendant 10 minutes, elle permet d'activer l'enzyme (Hot Start Taq DNA polymerase). Cette première étape est suivie de X cycles (valeur déterminée au cours de la mise au point de la technique sur LightCycler) comprenant chacun une étape de dénaturation à 95°C pendant 20 sec, une étape d'hybridation à 56°C pendant 20 sec et une étape d'extension à 72°C pendant 30 sec. La fluorescence du SYBR Green I est lue à 530 nm à la fin de chaque cycle d'amplification, ce qui permet le suivi de la PCR en temps réel. Ensuite, une fois l'amplification terminée, l'augmentation progressive de la température à partir de 72°C permet d'obtenir les courbes de fusion. L'augmentation de la température est progressive, c'est-à-dire 0,5°C toutes les 10 sec ; jusqu'à la température de 95°C. Enfin, les courbes de fluorescence sont interprétées à partir de la dérivée première négative de la courbe de décroissance de la fluorescence en fonction de la température ($-dF/dT$) en fonction de la T°.

6. Outils statistiques utilisés

Nous avons utilisé le logiciel StatView pour réaliser nos analyses statistiques.

En ce qui concerne le polymorphisme des cytokines, nous nous sommes servis du test de Mann-Whitney sur les rangs pour comparer 2 échantillons indépendants lors de la recherche d'une corrélation entre le génotype des cytokines et entre les paramètres choisis pour quantifier le niveau de production des cytokines (c'est-à-dire les cytokines intracellulaires étudiées en cytométrie de flux, et les MFI correspondantes).

Ensuite, nous avons utilisé le test du χ^2 d'indépendance pour comparer la distribution de 2 populations (étude et témoin) par rapport aux génotypes ou aux phénotypes de production de leurs cytokines.

Les résultats donnés par les tests de Mann-Whitney sur les rangs et du χ^2 d'indépendance sont considérés comme étant significatifs pour un $p < 0,05$.

Résultats

1. Données démographiques

Les données démographiques des 38 patients de l'étude génotypage sont résumées dans le tableau 4. 3 groupes ont été définis : les patients ayant subi un épisode de rejet aigu (RA), les patients ayant subi une infection virale à CMV (CMV) et les patients n'ayant eu aucun de ces deux évènements. Il est à noter que seul le premier évènement est pris en compte ; par exemple, un patient ayant eu un rejet aigu puis une infection à CMV ne sera pas considéré pour celle-ci. Ceci permet de s'affranchir des éventuelles conséquences du premier évènement sur le devenir du greffon.

2. Résultats de l'extraction d'ADN génomique

L'extraction automatique par l'appareil Geno-M48 a permis d'obtenir des extraits d'ADN à des concentrations allant de 20 à 80 ng/ μ l à partir de 200 μ l de sang total, soit 2 à 8 μ g au total. Les ratios DO260nm/DO280nm donnant les puretés des extraits d'ADN entrent dans une gamme allant de 1,20 à 1,70. Il est recommandé par la trousse de génotypage de travailler avec des extraits d'ADN à des concentrations situées entre 25 et 200 ng/ μ l (100 ng/ μ l est la concentration optimale) et des puretés d'ADN entre 1,65 et 1,80. Malgré des résultats dans l'ensemble légèrement inférieurs aux recommandations de la trousse de génotypage en ce qui concerne les concentrations et les puretés des solutions d'ADN extrait, nous arrivons à interpréter les gels d'électrophorèse, ce qui traduit une amplification suffisante des acides nucléiques à partir de nos échantillons d'ADN extrait.

	Rejet aigu (RA)	CMV	RA-/CMV-
Effectif	5	15	18
Sexe patient (F/H)	3/2	4/11	6/12
Age du receveur (moyenne)	44	47	47
Age du donneur (moyenne)	48	43	39
Anticalcineurine (CsA/FK506)	3/2	7/8	7/11
Induction par anti-IL2R	3/2	5/10	2/16
Incompatibilité HLA (moyenne sur 6)	3,2	2,6	2,9
Anti –HLA avant transplantation	0	0	0
CMV D-/R-	0	0	4
CMV D+/R-	1	8	1
CMV D-/R+	1	1	6
CMV D+/R+	3	6	7
Durée de dialyse avant Tx en mois	18	37	75
Durée ischémie froide en heures	14	20	22
Transfusions avant Tx (non/oui)	4/1	9/6	12/6

Tableau. 4. Données démographiques des patients de notre étude

Abbréviations utilisées : les sous-groupes CMV D/R désigne les statuts immunologiques du donneur et du receveur vis-à-vis du CMV, par exemple D- désigne un donneur CMV séronégatif et R- désigne un receveur CMV séronégatif.

3. Résultats du génotypage des cytokines dans les groupes rejet aigu, CMV et témoins

Nous avons respecté les recommandations de la trousse de génotypage One Lambda, à un détail près. Nous avons choisi au départ l'enzyme recombinante AmpliTaq Gold* DNA polymerase (Applied Biosystems) car cette enzyme permet de limiter les hybridations non spécifiques. C'est une enzyme modifiée chimiquement par rapport à l'AmpliTaq* DNA polymerase classique, qui est l'enzyme recommandée par le kit. L'enzyme modifiée est couplée à une structure chimique qui la rend inactive, si bien que pendant la période précédant le début des cycles d'amplification proprement dit, les hybridations non spécifiques ne pourront donner lieu à une extension des amorces puisque la polymérase est inactive. Son activation est conditionnée par une étape préliminaire de chauffage à 95°C pendant au moins 10 min, que nous avons ajoutée au début du programme d'amplification donné par le fabricant. Cependant, cette enzyme n'a pas donné les résultats escomptés car au lieu d'obtenir des images nettes des produits d'amplification après électrophorèse, seules quelques bandes apparaissaient sur les gels d'électrophorèse. C'est en optant pour une enzyme recombinante DNA polymérase classique (Promega Corp.) que nous avons obtenu des profils d'électrophorèse interprétables (figure 11). Il est probable que pour l'emploi de l'AmpliTaq Gold* DNA polymerase (Applied Biosystems) avec la trousse de génotypage des cytokines, d'autres adaptations du programme d'amplification sont nécessaires.

Le tableau 5 récapitule les différents profils électrophorétiques possibles pour l'interprétation des génotypes des 5 cytokines étudiées.

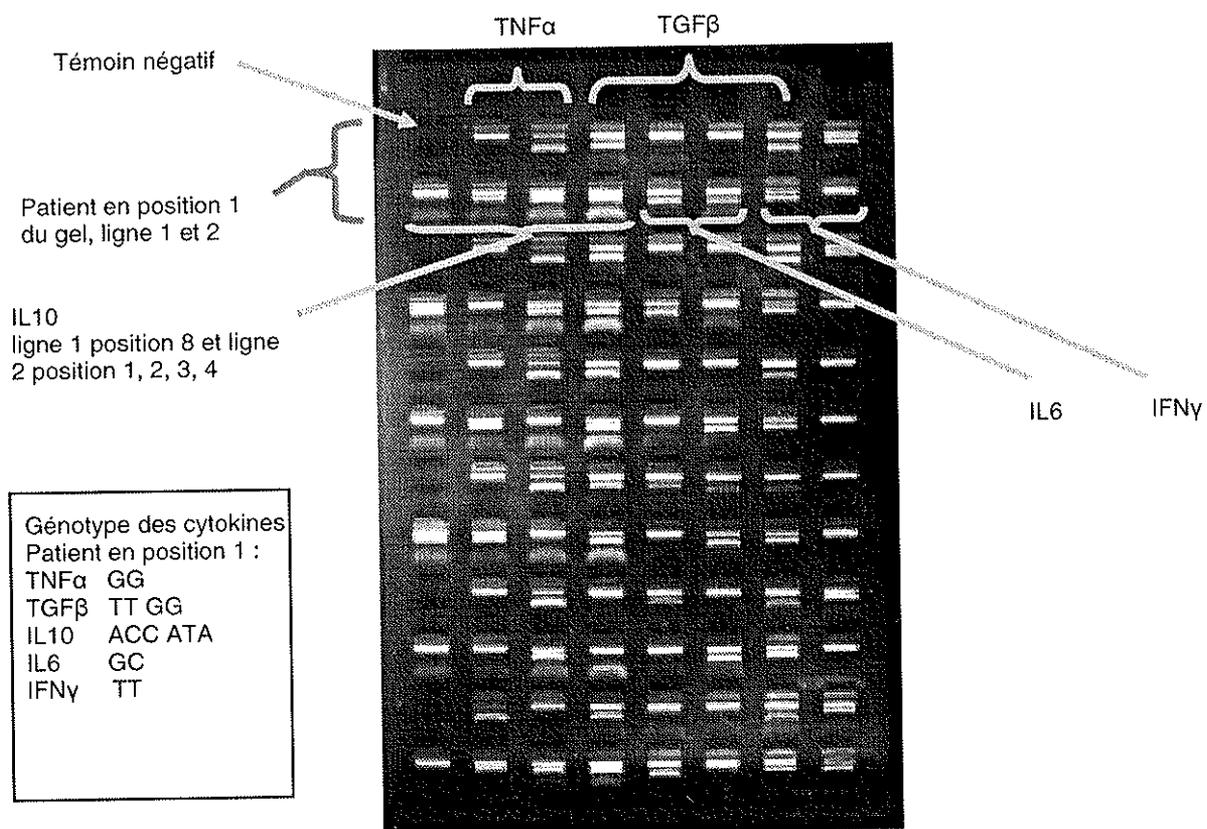


Fig. 11. Photo d'un gel d'agarose 96 puits après migration électrophorétique des produits d'amplification (140 V, 3 à 4 min)



WORKSHEET
Cytokine Genotyping Tray, Lot 4



Cat. # CYTGEN

Name _____
 Patient Male
 Donor Female

Relationship to Patient _____

Age _____ Race _____ Birthdate _____ ASCORH _____

Sample I.D. _____

TNF- α Results _____
 TGF- β Results _____
 IL-10 Results _____
 IL-6 Results _____
 IFN- γ Results _____

Tray Exp. Date _____
 Tray Lot # _____
 D-mix Lot #/Batch # _____

POSITIONS	1H/2H/ 5H/7H/ 9H/11H		1G/3G/ 5G/7G/ 9G/11G		1F/3F/ 5F/7F/ 9F/11F		1E/3E/ 5E/7E/ 9E/11E		1D/3D/ 5D/7D/ 9D/11D		1C/3C/ 5C/7C/ 9C/11C		1B/3B/ 5B/7B/ 9B/11B		1A/3A/ 5A/7A/ 9A/11A		2H/4H/ 6H/8H/ 10H/12H		2G/4G/ 6G/8G/ 10G/12G		2F/4F/ 6F/8F/ 10F/12F		2E/4E/ 6E/8E/ 10E/12E		2D/4D/ 6D/8D/ 10D/12D		2C/4C/ 6C/8C/ 10C/12C		2B/4B/ 6B/8B/ 10B/12B		2A/4A/ 6A/8A/ 10A/12A	
	750	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	125	300	300	300	300	300	300	250	250	250	250	175	175	175	175	250	250	
RESULTS <i>(mark positive locations)</i>																																
PRODUCT SIZE (bp)																																
SPECIFICITY																																
TNF- α																																
TGF- β																																
IL-10																																
IL-6																																
IFN- γ																																

Test Performed by _____ Date _____

Read by _____ Date _____

Reviewed by _____ Date _____

One Lambda, Inc. 21001 Kirtbridge St., Canoga Park, CA 91303-2601 Tel: (818) 702-0042 Fax: (818) 702-0044 Res: (818) 702-0004 Cat. # CYTGEN_004_IPS.XLS Page 1 of 1

Tableau 5. Tableau d'interprétation d'un gel obtenu à l'électrophorèse selon le kit de génotypage des cytokines One Lambda

3.1. Polymorphisme du TNF α

Le polymorphisme situé sur le promoteur du gène du TNF α en position – 308 a été étudié dans notre population de patients.

3.1.1. Distribution des génotypes et des phénotypes de production du TNF α dans notre population de patients

Globalement, la distribution génotypique du TNF α obtenue avec notre population de patients (tableaux 6, 7, 8) est également retrouvée dans d'autres études [60,93].

3.1.2. Influence des génotypes du TNF α sur la capacité de production des cytokines in vitro

Pour notre étude, nous avons choisi de quantifier la capacité de production des cytokines in vitro d'une part par les pourcentages des lymphocytes produisant des cytokines intracellulaires après stimulation, et d'autre part par les valeurs de MFI, de telle sorte que nous disposions de paramètres pour analyser la capacité de production des cytokines in vitro en fonction des génotypes du TNF α de notre population. Nous avons alors utilisé le test de Mann-Whitney sur les rangs pour comparer les génotypes TNF α -308 GG et GA, forts producteurs de TNF α , selon la capacité de production des cytokines in vitro (nous ne l'avons pas fait par rapport au génotype TNF α -308 AA qui n'est représenté que par un patient).

3.1.2.1. TNF α et cytokines intracellulaires

Il n'y a pas de différence significative entre les génotypes TNF α -308 GG et GA, lorsqu'ils sont comparés en fonction des pourcentages des lymphocytes produisant des cytokines intracellulaires (figures 12, 13, 14).

3.1.2.2. TNF α et MFI (Mean Fluorescence Intensity)

Il n'y a pas de différence significative entre les génotypes TNF α -308 GG et GA, lorsqu'ils sont comparés en fonction des valeurs de MFI (figures 15, 16, 17).

3.1.3. Influence des génotypes du TNF α sur la survenue du CMV et sur la survenue du rejet aigu

3.1.3.1. Comparaison des sous-groupes de patients : CMV/témoins

Le génotype TNF α -308 AA étant rare dans notre population, nous avons comparé les groupes CMV+ et CMV- par rapport au phénotype fort et faible producteur de TNF α (correspondant aux génotype TNF α -308 GA+AA et GG respectivement) (tableau 9).
Il n'y a pas de différence significative entre les 2 groupes ($p=0,41$).

3.1.3.2. Comparaison des sous-groupes de patients : Rejet aigu/témoins

Le génotype TNF α -308 AA étant rare dans notre population, nous avons comparé les groupes RA+ et RA- par rapport au phénotype fort et faible producteur de TNF α (correspondant aux génotype TNF α -308 GA+AA et GG respectivement) (tableau 10).
Il n'y a pas de différence significative entre les 2 groupes ($p=0,72$).

Génotypes	Total		RA		CMV		RA-/CMV-	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
GG	29	76	3	60	13	87	13	72
GA	8	21	2	40	2	13	4	22
AA	1	3	0	0	0	0	1	6
Total	38	100	5	100	15	100	18	100

Tableau. 6. Distribution des génotypes du TNF α et fréquences correspondantes dans la population étudiée

Phénotypes de production	Total		RA		CMV		RA-/CMV-	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Fort	9	24	2	60	2	13	5	28
Faible	29	76	3	40	13	87	13	72
Total	38	100	5	100	15	100	18	100

Tableau. 7. Distribution des phénotypes de production du TNF α dans la population étudiée

Génotype du TNF α	Pourcentage
G G	61
G A	23
A A	16
Total	100

Tableau. 8. Distribution en fréquence des génotypes du TNF α dans la population contrôle de l'étude de Perrey et al. [60]

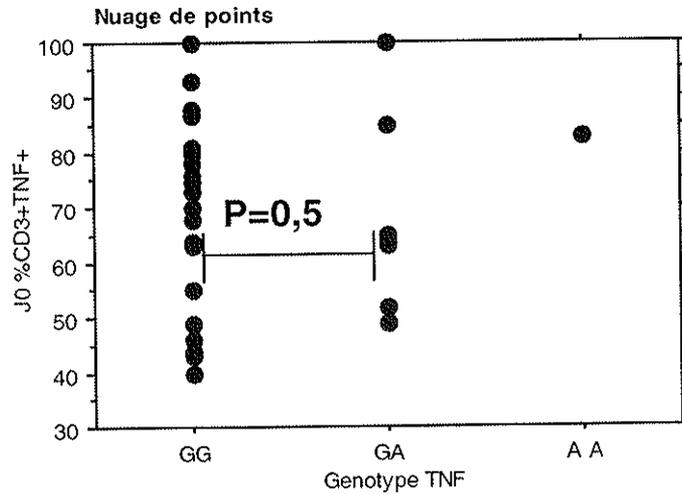


Fig. 12. Production du TNF α intracellulaire par les lymphocytes CD3+ après stimulation in vitro au temps J0

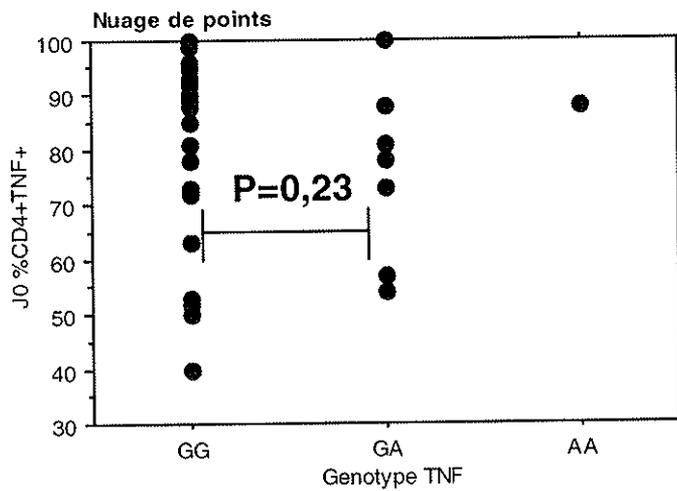


Fig. 13. Production du TNF α intracellulaire par les lymphocytes CD4+ après stimulation in vitro au temps J0

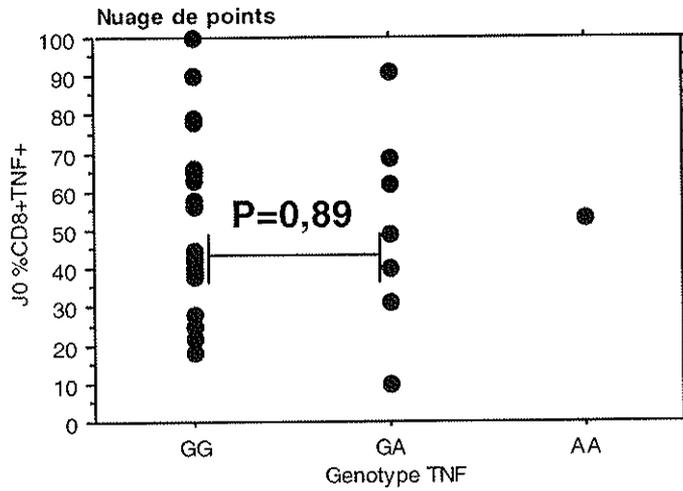


Fig. 14. Production du TNF α intracellulaire par les lymphocytes CD8+ après stimulation in vitro

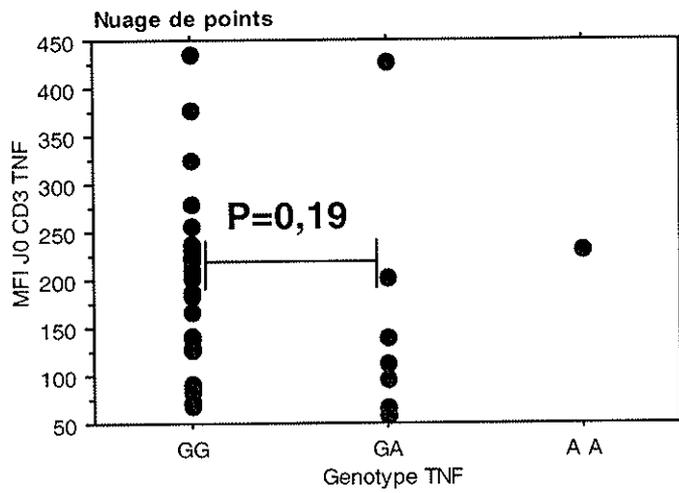


Fig. 15. Génotypes du TNF α et valeurs de MFI des CD3+/TNF α + totaux au temps J0

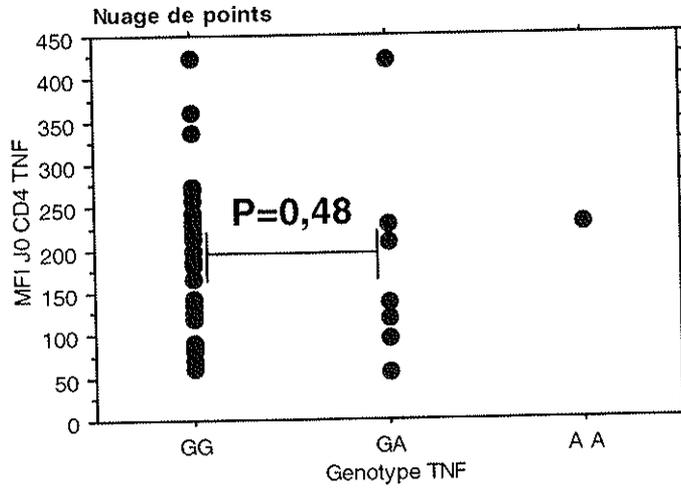


Fig. 16. Génotypes du TNF α et valeurs de MFI des lymphocytes CD4+/ TNF α + au temps J0

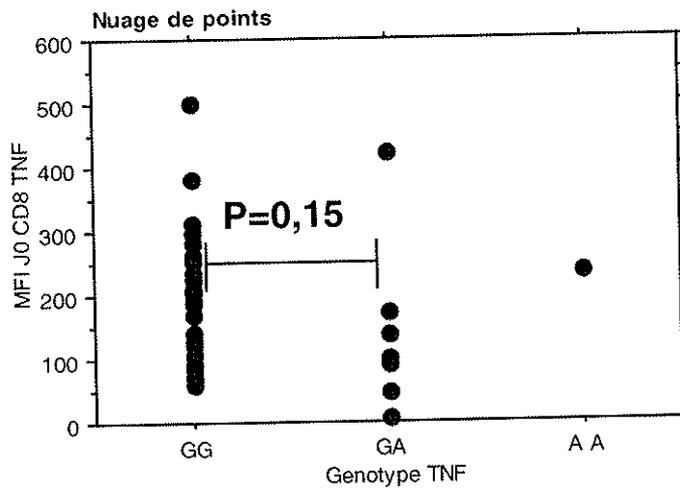


Fig. 17. Génotypes du TNF α et valeurs de MFI des lymphocytes CD8+/ TNF α + au temps J0

Génotype	CMV +	CMV -
GA+AA	2	7
GG	13	16
total	15	23

Tableau. 9. Comparaison des sous-groupes de patients CMV+/CMV- en fonction du génotype du TNF α (fort sécréteur/faible sécréteur)

Génotype	RA +	RA -
GA	2	7
GG	3	26
total	5	33

Tableau. 10. Comparaison des sous-groupes de patients RA+/RA- en fonction du génotype du TNF α (fort sécréteur/faible sécréteur)

3.2. Polymorphisme de l'IFN γ

Le polymorphisme situé sur le premier intron du gène de l'IFN γ en position +874 a été étudié dans notre population de patients. Dans le cas du gène de l'IFN γ , le polymorphisme génétique le plus étudié en transplantation rénale se rapporte au nombre de séquences CA répétées au niveau du premier intron. L'allèle 2 de ce polymorphisme correspond à un nombre de 12 séquences CA répétées et est associé au phénotype fort producteur d'IFN γ . Il existe une association très forte entre cet allèle 2 et la présence de l'allèle IFN γ +874 T [94], que nous étudions ici.

3.2.1. Distribution des génotypes et phénotypes de production de l'IFN γ dans la population étudiée

La distribution génotypique de l'IFN γ obtenue avec notre population de patients est également retrouvée dans l'étude de Masri et al. [95] (tableaux 11, 12, 13).

3.2.2. Influence du polymorphisme génétique de l'IFN γ sur la capacité de production des cytokines in vitro

Pour notre étude, nous avons choisi de quantifier la capacité de production des cytokines in vitro d'une part par les pourcentages des lymphocytes produisant des cytokines intracellulaires après stimulation, et d'autre part par les valeurs de MFI, de telle sorte que nous disposions de paramètres pour analyser la capacité de production des cytokines in vitro en fonction des génotypes de l'IFN γ de notre population. Nous avons alors utilisé le test de Mann-Whitney sur les rangs pour comparer les génotypes de l'IFN γ selon la capacité de production des cytokines in vitro.

3.2.2.1. IFN γ et cytokines intracellulaires

Il n'y a pas de différence significative entre les génotypes de l'IFN γ , lorsqu'ils sont comparés en fonction des pourcentages des lymphocytes produisant des cytokines intracellulaires (figures 18, 19, 20).

3.2.2.2. IFN γ et MFI

Il n'y a pas de différence significative entre les génotypes de l'IFN γ , lorsqu'ils sont comparés en fonction des valeurs de MFI (figures 21, 22, 23).

3.2.3. Influence du polymorphisme génétique de l'IFN γ sur la survenue du CMV et sur la survenue du rejet aigu

3.2.3.1. Comparaison des sous-groupes de patients : CMV/témoins

Les groupes CMV+ et CMV- ne diffèrent pas significativement par rapport au génotype de l'IFN γ ($p=0,14$) lorsque les porteurs du génotype IFN γ +874 AA sont comparés versus les porteurs des génotypes IFN γ +874 TT et TA (tableau 14).

Par ailleurs, les groupes CMV+ et CMV- ne diffèrent pas significativement par rapport au génotype de l'IFN γ ($p=0,097$) lorsque les porteurs du génotype IFN γ +874 TT sont comparés versus les porteurs des génotypes IFN γ +874 AA et TA (tableau 15).

3.2.3.2. Comparaison des sous-groupes de patients : Rejet aigu/témoins

Les groupes RA+ et RA- ne diffèrent pas significativement par rapport au génotype de l'IFN γ ($p>0,99$) lorsque les porteurs du génotype IFN γ +874 AA sont comparés versus les porteurs des génotypes IFN γ +874 TT et TA (tableau 16).

Par ailleurs, les groupes RA+ et RA- ne diffèrent pas significativement par rapport au génotype de l'IFN γ ($p=0,22$) lorsque les porteurs du génotype IFN γ +874 TT sont comparés versus les porteurs des génotypes IFN γ +874 AA et TA (tableau 17).

Génotypes	Total		RA		CMV		RA-/CMV-	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
TT	13	34	0	0	8	53	5	28
TA	20	53	4	80	7	47	9	50
AA	5	13	1	20	0	0	4	22
Total	38	100	5	100	15	100	18	100

Tableau. 11. Distribution des génotypes de l'IFN γ et fréquences correspondantes dans la population étudiée

Phénotypes de production	Total		RA		CMV		RA-/CMV-	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Fort	13	34	0	0	8	53	5	28
Intermédiaire	20	53	4	80	7	47	9	50
Faible	5	13	1	20	0	0	4	22
Total	38	100	5	100	15	100	18	100

Tableau. 12. Distribution des phénotypes de production de l'IFN γ dans la population étudiée

Génotype du TNF α	Pourcentage
TT	34
TA	46
AA	20
Total	100

Tableau. 13. Distribution en fréquence des génotypes de l'IFN γ dans une autre population de patients greffés rénaux [95]

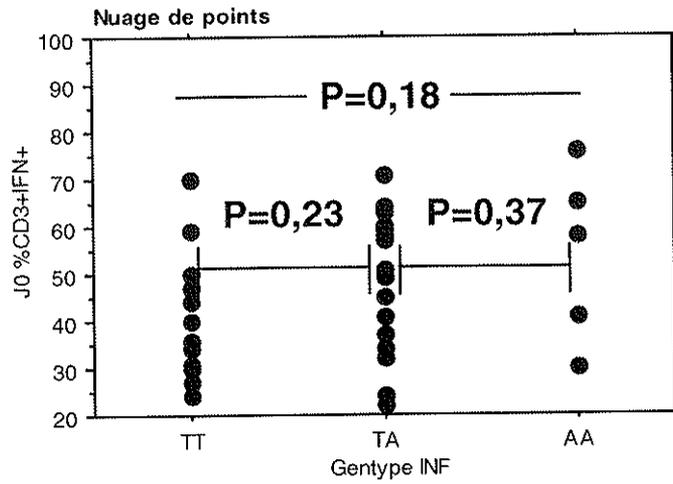


Fig. 18. Production de l'IFN γ intracellulaire par les lymphocytes CD3+ après stimulation in vitro

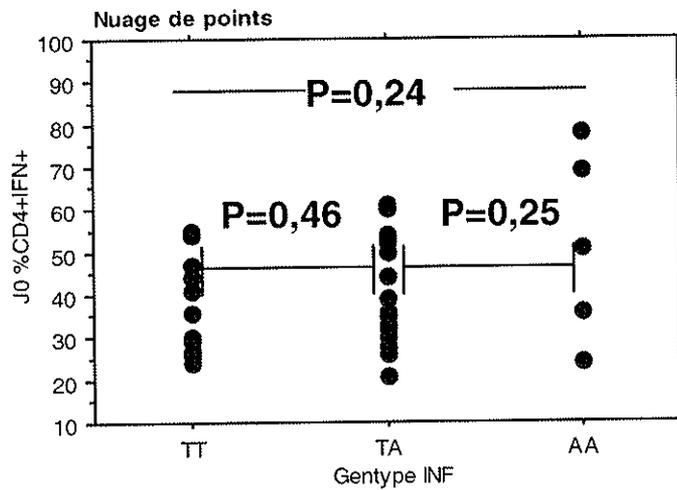


Fig. 19. Production de l'IFN γ intracellulaire par les lymphocytes CD4+ après stimulation in vitro

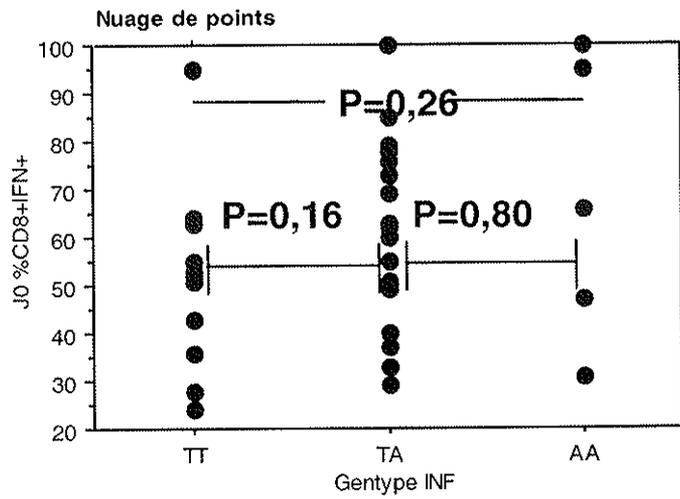


Fig. 20. Production de l'IFN γ intracellulaire par les lymphocytes CD8+ après stimulation in vitro

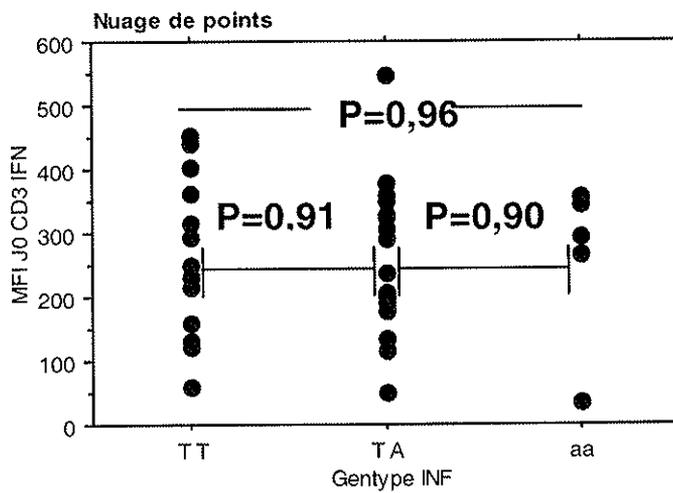


Fig. 21. Génotypes de l'IFN γ et valeurs de MFI des lymphocytes CD3+totaux/ IFN γ + au temps J0

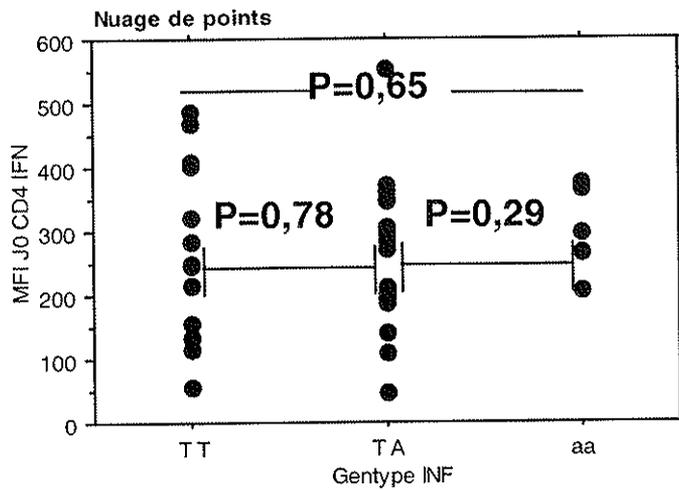


Fig. 22. Génotypes de l'IFN γ et valeurs de MFI des lymphocytes CD4+/ IFN γ + au temps J0

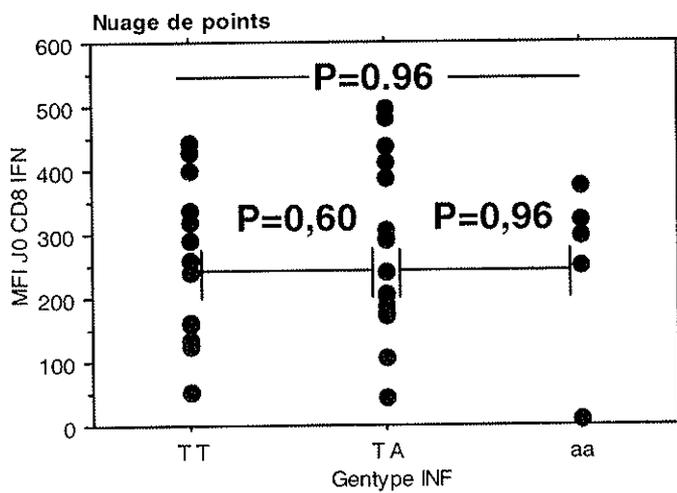


Fig. 23. Génotypes de l'IFN γ et valeurs de MFI des lymphocytes CD8+/ IFN γ + au temps J0

génotype	CMV +	CMV -
TT+TA	15	18
AA	0	5
total	15	23

Tableau. 14. Comparaison des sous-groupes de patients CMV+/CMV- en fonction de la distribution du génotype de l'IFN γ (comparaison IFN γ +874 AA versus TT + TA)

génotype	CMV +	CMV -
TT	8	5
AA+TA	7	18
total	15	23

Tableau. 15. Comparaison des sous-groupes de patients CMV+/CMV- en fonction du génotype de l'IFN γ (comparaison IFN γ +874 TT versus AA + TA)

Génotype	RA +	RA -
TT+TA	4	29
AA	1	4
total	5	33

Tableau. 16. Comparaison des sous-groupes de patients RA+/RA- en fonction de la distribution du génotype de l'IFN γ (comparaison IFN γ +874 AA versus TT+TA)

Génotype	RA +	RA -
TT	0	13
AA+TA	5	20
total	5	33

Tableau. 17. Comparaison des sous-groupes de patients RA+/RA- en fonction de la distribution du génotype de l'IFN γ (comparaison IFN γ +874 TT versus AA+TA)

3.3. Polymorphisme de l'IL10

Les polymorphismes génétiques retrouvés au niveau de 3 loci, en -1082, -819 et -592, sur le promoteur du gène de l'IL10 ont été étudiés dans notre population de patients. La combinaison des allèles sur un gène de l'IL10 a été représentée par la succession des 3 nucléotides issus du polymorphisme de l'IL10.

3.3.1. Distribution des génotypes et phénotypes de production de l'IL10 dans la population étudiée

Les fréquences des génotypes et des phénotypes de production de l'IL10 de notre population sont données dans les tableaux 18 et 19. Les fréquences génotypiques de l'IL10 retrouvées dans une autre étude [60] sont données dans le tableau 20.

3.3.2. Influence du polymorphisme génétique de l'IL10 sur la survenue du CMV et sur la survenue du rejet aigu

Etant donné les multiples génotypes de l'IL10 issus de la combinaison de ses haplotypes, nous avons restreint l'étude des génotypes de l'IL10 aux génotypes définis par le SNP en position -1082 du gène de l'IL10. Ce qui revient à comparer les groupes IL -1082 GG, GA et AA déterminant les phénotypes de production fort, intermédiaire et faible, respectivement, conformément à la classification donnée par Turner et al. [96]. Nous avons ensuite comparé d'une part le génotype IL10 -1082 AA versus GG+GA, et d'autre part, le génotype IL -1082 GG versus GA+AA.

3.3.2.1. Comparaison des sous-groupes de patients : CMV/témoins

Les groupes CMV+ et CMV- ne diffèrent pas significativement par rapport au génotype de l'IL10 ($p=0,98$) lorsque les porteurs du génotype IL10 -1082 AA sont comparés versus les porteurs des génotypes IL10 -1082 GG et GA (tableau 21).

Par ailleurs, les groupes CMV+ et CMV- ne diffèrent pas significativement par rapport au génotype de l'IL10 ($p=0,09$) lorsque les porteurs du génotype IL10 -1082 GG sont comparés versus les porteurs des génotypes IL10 -1082 AA et GA (tableau 22), il faut toutefois noter une tendance.

3.3.2.2. Comparaison des sous-groupes de patients : Rejet aigu/témoins

Les groupes RA+ et RA- ne diffèrent pas significativement par rapport au génotype de l'IL10 ($p=0,73$) lorsque les porteurs du génotype IL10 -1082 AA sont comparés versus les porteurs des génotypes IL10 -1082 GG et GA (tableau 23).

Par ailleurs, les groupes RA+ et RA- ne diffèrent pas significativement par rapport au génotype de l'IL10 ($p=0,35$) lorsque les porteurs du génotype IL10 -1082 GG sont comparés versus les porteurs des génotypes IL10 -1082 AA et GA (tableau 24).

Génotypes	Total		RA		CMV		RA-/CMV-	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
GCC/GCC	6	16	2	40	0	0	4	22
GCC/ACC	12	32	2	40	5	33	5	28
GCC/ATA	6	16	0	0	5	33	1	6
ACC/ACC	4	11	0	0	1	7	3	17
ACC/ATA	7	18	1	20	2	13	4	22
ATA/ATA	3	8	0	0	2	13	1	6
Total	38	100	5	100	15	100	18	100

Tableau. 18. Distribution des génotypes de l'IL10 et fréquences correspondantes dans la population étudiée

Phénotypes de production	Total		RA		CMV		RA-/CMV-	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Fort	6	16	2	40	0	0	4	22
Intermédiaire	18	47	2	40	10	67	6	33,5
Faible	14	37	1	20	5	33	8	44,5
Total	38	100	5	100	15	100	18	100

Tableau. 19. Distribution des phénotypes de production de l'IL10 dans la population étudiée

Génotype de l'IL10	Fréquence
GCC/GCC	30
GCC/ACC	21
GCC/ATA	21
ACC/ACC	8
ACC/ATA	12
ATA/ATA	8
Total	100

Tableau. 20. Distribution en fréquence des génotypes de l'IL10 dans la population contrôlée de l'étude de Perrey et al. [60]

génotype	CMV +	CMV -
GG+GA	10	14
AA	5	9
total	15	23

Tableau. 21. Comparaison des sous-groupes de patients CMV+/CMV- en fonction de la distribution du génotype de l'IL10 déterminé par le SNP en position -1082 du gène (comparaison IL10 -1082 AA versus GG+GA)

génotype	CMV +	CMV -
GG	0	6
AA+GA	15	17
total	15	23

Tableau. 22. Comparaison des sous-groupes de patients CMV+/CMV- en fonction de la distribution du génotype de l'IL10 déterminé par le SNP en position -1082 du gène (comparaison IL10 -1082 GG versus AA+GA)

Génotype	RA +	RA -
GG+GA	4	20
AA	1	13
total	5	33

Tableau. 23. Comparaison des sous-groupes de patients RA+/RA- en fonction de la distribution du génotype de l'IL10 déterminé par le SNP en position -1082 du gène (comparaison IL10 -1082 AA versus GG+GA)

Génotype	RA +	RA -
GG	2	4
AA+GA	3	29
total	5	33

Tableau. 24. Comparaison des sous-groupes de patients RA+/RA- en fonction de la distribution du génotype de l'IL10 déterminé par le SNP en position -1082 du gène (comparaison IL10 -1082 GG versus AA+GA)

3.4. Polymorphisme du TGFβ1

Les polymorphismes génétiques retrouvés au niveau de 2 loci, sur les codons 10 et 25 localisés sur la séquence codante du gène du TGFβ1, ont été étudiés dans notre population de patients.

3.4.1. Distribution des génotypes et phénotypes de production du TGFβ1 dans la population étudiée

Les fréquences des génotypes et des phénotypes de production du TGFβ1 de notre population de patients sont données dans les tableaux 25 et 26. Les fréquences génotypiques du TGFβ1 retrouvées dans une autre étude [60] sont données dans le tableau 27.

3.4.2. Influence du polymorphisme génétique du TGFβ1 sur la survenue du CMV et sur la survenue du rejet aigu

Dans la population étudiée, nous n'avons pas retrouvé les génotypes du TGFβ1 correspondant au phénotype faible producteur de TGFβ1. Nous nous sommes contentés de comparer les groupes selon les phénotypes de production du TGFβ1 fort et intermédiaire.

3.4.2.1. Comparaison des sous-groupes de patients CMV/témoins

Il n'y a pas de différence significative entre les distributions des phénotypes de production du TGFβ1 (limités aux phénotypes faible et intermédiaire) dans les groupes CMV+ et CMV- ($P > 0,99$) (tableau 28).

3.4.2.2. Comparaison des sous-groupes de patients : Rejet aigu/témoins

Il n'y a pas de différence significative entre les distributions des phénotypes de production du TGFβ1 (limités aux phénotypes faible et intermédiaire) dans les groupes RA+ et RA- ($P = 0,32$) (tableau 29).

Génotypes	Total		RA		CMV		RA-/CMV-	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
TT GG	16	42	4	80	5	33	7	39
TC GG	11	29	1	20	6	40	4	22
TC GC	5	13	0	0	3	20	2	11
CC GG	6	16	0	0	1	7	5	28
Total	38	100	5	100	15	100	18	100

Tableau. 25. Distribution des génotypes du TGFβ1 et fréquences correspondantes dans la population étudiée

Phénotypes de production	Total		RA		CMV		RA-/CMV-	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Fort	27	71	5	100	11	73	11	61
Intermédiaire	11	29	0	0	4	27	7	39
Total	38	100	5	100	15	100	18	100

Tableau. 26. Distribution des phénotypes de production du TGFβ1 dans la population étudiée

Génotype du TGFβ1	Fréquence
TT GG	41
TC GG	36
TC GC	12
CC GG	5
TT GC	0
CC GC	6
CC CC	1
TT CC	0
TC CC	0
Total	100

Tableau. 27. Distribution en fréquence des génotypes du TGFβ1 dans la population contrôlée de l'étude de Perrey et al. [60]

Phénotype	CMV +	CMV -
Fort	11	16
Intermédiaire	4	7
total	15	23

Tableau. 28. Comparaison des sous-groupes de patients CMV+/CMV- en fonction de la distribution du phénotype de production du TGFβ1 (comparaison TGFβ1 +874 fort versus intermédiaire)

Phénotype	RA +	RA -
Fort	5	22
Intermédiaire	0	11
total	5	33

Tableau. 29. Comparaison des sous-groupes de patients RA+/RA- en fonction de la distribution du phénotype de production du TGFβ1 (comparaison TGFβ1 +874 fort versus intermédiaire)

3.5. Polymorphisme de l'IL6

Le polymorphisme situé sur le promoteur du gène de l'IL6 en position -174 a été étudié dans notre population de patients.

3.5.1. Distribution des génotypes et phénotypes de production de l'IL6 dans la population étudiée

Les fréquences des génotypes et des phénotypes de production de l'IL6 de notre population de patients sont données dans les tableaux 30 et 31. Les fréquences génotypiques de l'IL6 retrouvées dans une autre étude [69] sont données dans le tableau 32.

3.5.2. Influence du polymorphisme génétique de l'IL6 sur la survenue du CMV ou du rejet aigu

Nous avons comparé le génotype IL6 -174 CC versus les génotypes GG+GC. En effet, les génotypes IL6 -174 GG et GC déterminent le phénotype fort producteur d'IL6 par rapport au génotype IL6 -174 CC [62].

3.5.2.1. Comparaison des sous-groupes de patients : CMV/témoins

Les groupes CMV+ et CMV- ne diffèrent pas significativement par rapport au génotype de l'IL6 ($p>0,99$) lorsque les porteurs du génotype IL6 -174 CC sont comparés versus les porteurs des génotypes IL6 -174 GG+GC (tableau 33).

3.5.2.2. Comparaison des sous-groupes de patients : Rejet aigu/témoins

Les groupes RA+ et RA- ne diffèrent pas significativement par rapport au génotype de l'IL6 ($p=0,51$) lorsque les porteurs du génotype IL6 -174 CC sont comparés versus les porteurs du génotype IL6 -174 GG+GC (tableau 34).

Génotypes	Total		RA		CMV		RA-/CMV-	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
GG	14	37	2	40	6	40	6	33
GC	16	42	3	60	6	40	7	39
CC	8	21	0	0	3	20	5	28
Total	38	100	5	100	15	100	18	100

Tableau. 30. Distribution des génotypes de l'IL6 et fréquences correspondantes dans la population étudiée

Phénotypes de production	Total		RA		CMV		RA-/CMV-	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Fort	30	79	5	100	12	80	13	72
Faible	8	21	0	0	3	20	5	28
Total	38	100	5	100	15	100	18	100

Tableau. 31. Distribution des phénotypes de production de l'IL6 dans la population étudiée

Génotype du TGFβ1	Fréquence
GG	42
GC	42
CC	16
Total	100

Tableau. 32. Distribution en fréquence des génotypes de l'IL6 dans une autre population de patients transplantés rénaux [69]

génotype	CMV +	CMV -
GG+GC	12	18
CC	3	5
total	15	23

Tableau. 33. Comparaison des sous-groupes de patients CMV+/CMV- en fonction de la distribution du génotype de l'IL6 (comparaison IL6 -174 CC versus GG+GC)

Génotype	RA +	RA -
GG+GC	5	25
CC	0	8
total	5	33

Tableau. 34. Comparaison des sous-groupes de patients RA+/RA- en fonction de la distribution du génotype de l'IL6 (comparaison IL6 -174 CC versus GG+GC)

4. Résultats du génotypage du gène FCGR3A

4.1. Profil des génotypes du FCGR3A obtenu par l'étude des courbes de fusion par PCR en temps réel

Nous avons défini les paramètres opératoires par rapport aux nombres de cycles d'amplification et par rapport à la concentration du $MgCl_2$ dans le mix (tableau 35).

Il faut savoir d'une part qu'un nombre de cycles trop élevé provoque l'accumulation de produits non spécifiques. En revanche, il faut aussi tenir compte du cycle seuil ou Ct (cycle threshold ou crossing threshold) qui correspond au nombre de cycles requis pour que la fluorescence des produits amplifiés passe une ligne seuil. Cette ligne seuil est située au-dessus du bruit de fond de fluorescence.

D'autre part, le $MgCl_2$ augmente la température de dissociation de l'ADN double brin et forme des complexes solubles avec les désoxy-nucléotides ou dNTP (substrat reconnu par les polymérase). En conséquence, il est possible de diminuer le cycle seuil en augmentant la concentration en $MgCl_2$ du mix.

En ce qui concerne la quantité d'ADN introduit, nous avons travaillé avec les solutions d'ADN extraits non diluées, à des concentrations entre 20 et 80 ng/ μ l. Nous avons comparé au départ les résultats des courbes de fusion obtenues à partir des solutions d'ADN pures et diluées au demi. Dans la fourchette des concentrations de nos solutions d'ADN, nous n'avons pas constaté de différences entre les courbes de fusion lorsque nous partons d'une solution d'ADN pure et une solution diluée au demi.

Les figures 24, 25 et 26 représentent les courbes de fusion des génotypes du gène FCGR3A, homozygote V, homozygote F et hétérozygote V/F respectivement.

Nombre de cycles	Concentration en MgCl ₂ (mM)	Résultats de l'amplification
35	2	Nombre de cycles insuffisant : un début d'amplification est observée mais la fluorescence mesurée est insuffisante
45	2	Nombre de cycles trop élevé : des pics sont observés à l'analyse des courbes de fusion, mais ils sont dédoublés par la présence de produits d'amplification non spécifiques en quantité importante
38	2	Amplification satisfaisante de l'allèle FCGR3A 158 V, mais l'allèle FCGR3A 158 F est peu amplifié
38	4	Amplification satisfaisante des deux allèles, mais une amplification plus importante de l'allèle FCGR3A peut être envisagée
35	4	Amplification satisfaisante de l'allèle FCGR3A 158 V, mais l'allèle FCGR3A 158 F est très peu amplifié, difficilement distinguable des signaux non spécifiques
40	4	Amplification satisfaisante des deux allèles

Tableau. 35. Tableau des résultats de la PCR en temps réel sur LightCycler pour le gène FCGR3A en fonction du nombre de cycles et de la concentration en MgCl₂

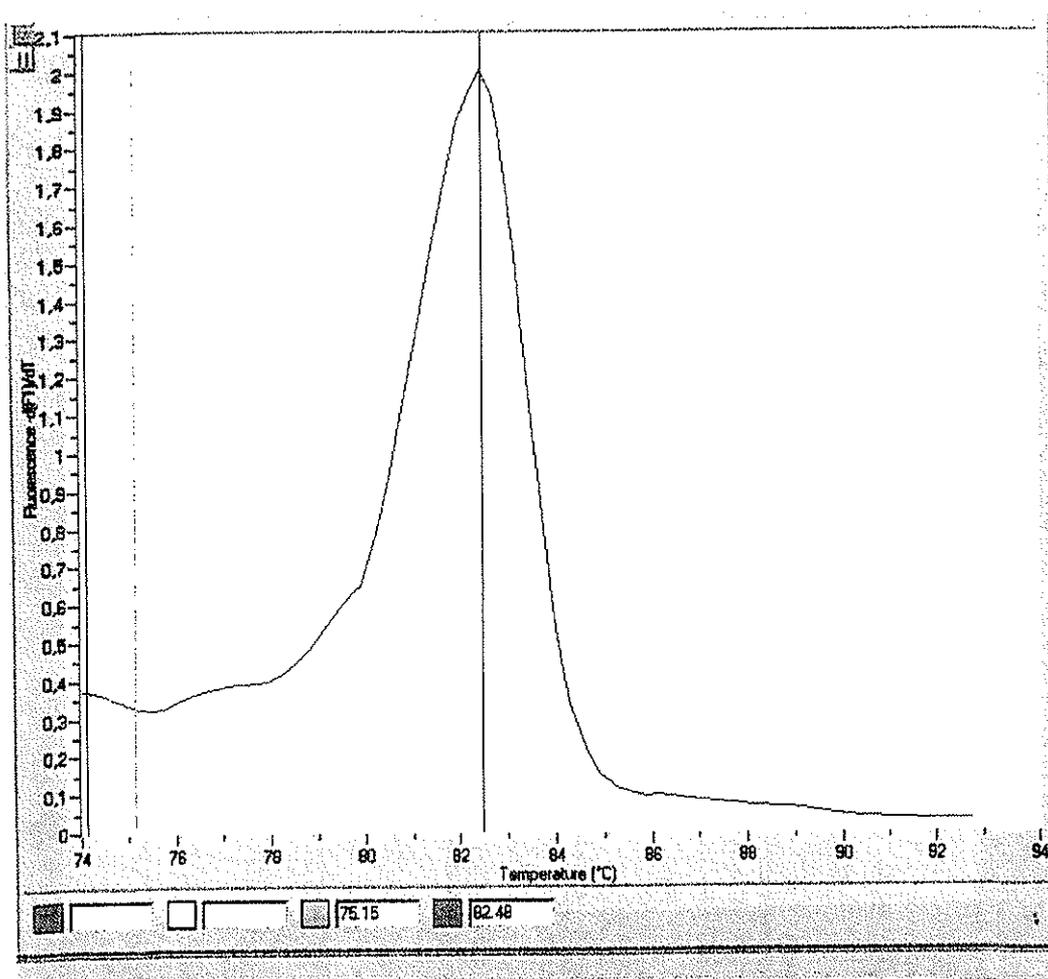


Fig. 24. Courbe de fusion correspondant au génotype FCGR3A 158 V homozygote (contrôle) - 35 cycles d'amplification/4 mM de MgCl₂

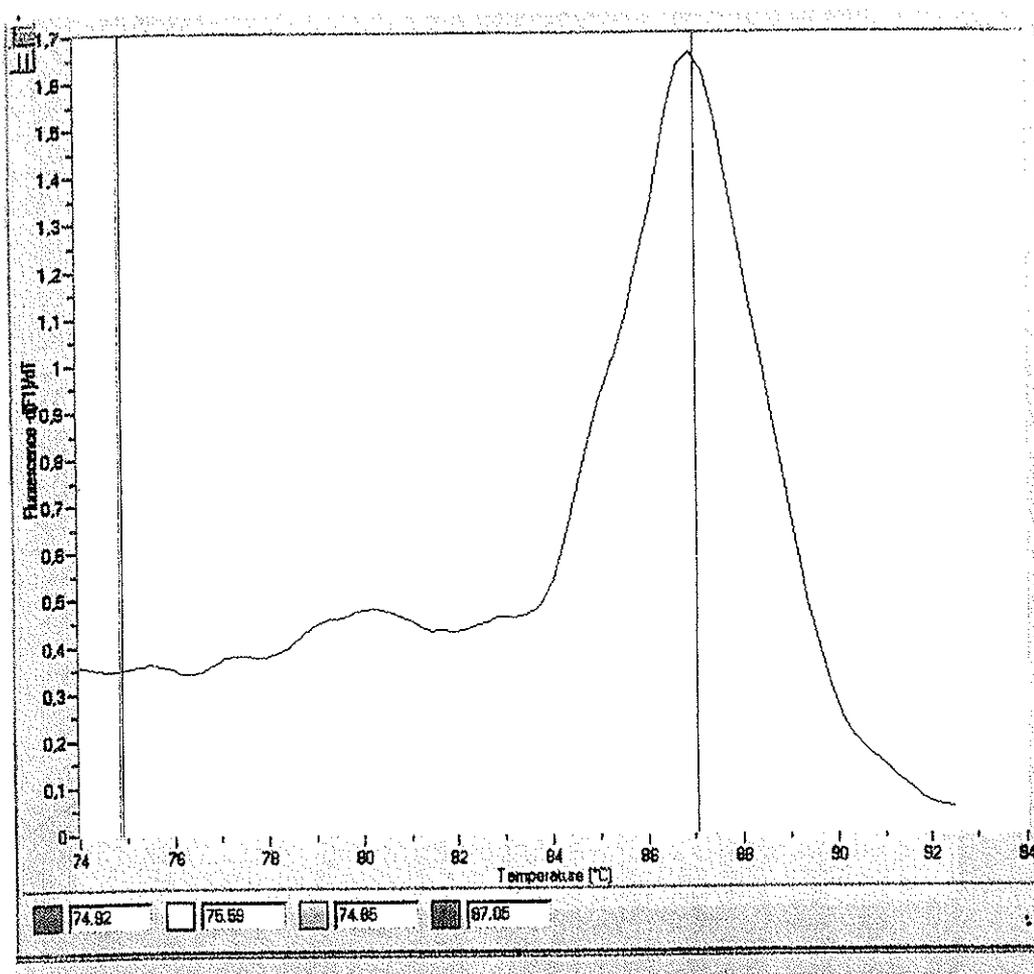


Fig. 25. Courbe de fusion correspondant au génotype FCGR3A 158 F homozygote (contrôle) – 40 cycles d'amplification/4 mM de MgCl₂

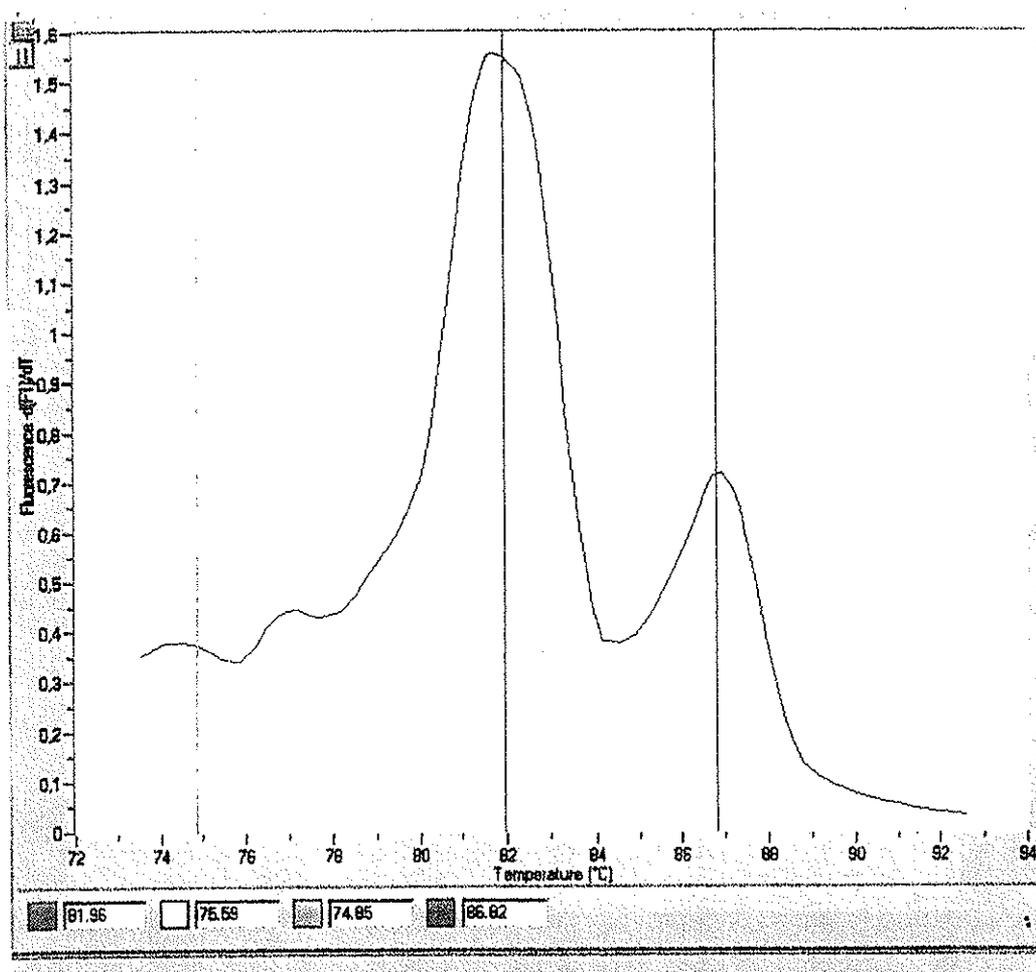


Fig. 26. Courbe de fusion correspondant au génotype FCGR3A 158 V/F hétérozygote (contrôle) – 40 cycles d’amplification/4 mM de MgCl₂

4.2. Distribution des génotypes du FCGR3A dans la population étudiée

La population considérée pour le génotypage du gène FCGR3A concerne 17 patients parmi les 38 patients inclus dans notre étude au départ. Il s'agit des patients traités par CsA. Parmi ces 17 patients, 10 patients ont reçu l'anti-CD25 (Zenapax* ou Simulect*) en induction de l'immunosuppression.

La distribution des différents génotypes issus du polymorphisme du FCGR3A dans notre population de patients est présentée dans le tableau 36, qui montre en parallèle les fréquences de ces génotypes dans une autre étude [97]. Nous retrouvons globalement une répartition des génotypes dans les mêmes proportions. Le tableau 37 détaille les génotypes du gène FCGR3A parmi les groupes de patients CMV+, RA+ et CMV-/RA-.

Génotypes	Population étudiée		Population contrôle
	Nombre	%	%
V V	1	6	11
V F	7	41	39
F F	9	53	50
Total	17	100	100

Tableau. 36. Distribution des génotypes du FCGR3A dans la population étudiée et dans une population contrôle d'origine caucasienne [98]

Génotypes	Total		RA +		CMV +		RA-/CMV-	
	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
V V	1	6	0	0	0	0	1	20
V F	7	41	2	67	2	22	3	60
F F	9	53	1	33	7	78	1	20
Total	17	100	3	100	9	100	5	100

Tableau. 37. Distribution des génotypes du FCGR3A en fonction du rejet aigu et du CMV

Discussion

Nous pouvons envisager cette étude tout d'abord en considérant les aspects techniques, puis cliniques.

1. Aspects techniques de l'étude

1.1. Les méthodes de génotypage

Nous avons eu recours à la technique de PCR, qui est largement utilisée pour l'analyse des acides nucléiques depuis sa première description en 1985 par Mullis K et collaborateurs. Depuis, elle a bénéficié de nombreuses adaptations techniques, dont celle que nous avons utilisée, la PCR-SSP (PCR sequence specific primer) ; en premier lieu dans des conditions classiques pour le génotypage des cytokines mais optimisées pour la réalisation d'un grand nombre de PCR avec un minimum de manipulation ; et en second lieu pour le génotypage du gène FCGR3A dans des conditions de PCR multiplex permettant d'amplifier plusieurs allèles à partir du même milieu réactionnel.

Nous avons profité de l'existence de la trousse de génotypage de One Lambda rendant possible la détermination simultanée du génotype de 5 cytokines avec une seule programmation de PCR. Cette trousse de génotypage One Lambda s'inscrit dans l'optique d'une recherche de la diminution des manipulations opératoires dans un souci de gain de temps adapté à des génotypages grande série, associée à la possibilité d'obtenir un maximum d'informations. D'autres supports techniques offrant de telles garanties sont en cours d'évaluation (puce à ADN).

Le recours à une étape post-PCR de détection de l'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose est une contrainte fastidieuse, et notamment elle nécessite la manipulation du bromure d'éthidium, produit cancérigène. Elle nécessite aussi la mise à disposition d'une salle post-PCR et d'autres appareils (cuve à électrophorèse, transilluminateur UV).

C'est pourquoi, nous avons testé une autre technique d'amplification de l'ADN adaptée entre autres à la recherche de mutations génétiques : la PCR en temps réel, rendue possible par les progrès en matière de thermocycleur. Nous avons utilisé le LightCycler (Roche). Cet appareil permet à la fois l'amplification des acides nucléiques et leur détection grâce à un système de détection intégré à l'appareil.

Certes les étapes pré-PCR exigent plus de rigueur par rapport à la PCR classique, du fait de la manipulation de petits capillaires en verre très fragiles, mais cette technique offre l'avantage d'être dispensée de manipulations supplémentaires post-PCR. Les tubes de réaction contenant l'ADN amplifié restent bouchés pendant l'étape de détection des acides nucléiques, limitant les risques de contamination des pièces de travail.

La difficulté de la technique consiste en l'élaboration des amorces spécifiques. Ce sont elles qui vont déterminer des températures de fusion suffisamment distinctes pour détecter les différents génotypes issus d'un polymorphisme génétique. En outre, le recours au SYBR Green I comme molécule fluorescente présente quelques limites. Comme il se lie à tout dimère d'ADN, il peut produire des signaux parasites en présence de dimères d'ADN non souhaités, les dimères d'amorce par exemple [99], d'où la nécessité d'optimiser les conditions opératoires pour obtenir une amplification préférentielle des gènes recherchés, et de choisir des amorces les plus spécifiques des allèles recherchés.

1.2. Profil de cytokines établi par la trousse de génotypage One Lambda

Les études sur l'implication du polymorphisme des cytokines en transplantation d'organes ne s'accordent pas entre elles en ce qui concerne les cytokines pouvant être associées au rejet. Par conséquent, il est difficile de définir un profil clair de cytokines à génotyper, d'autant plus que des polymorphismes décrits pour d'autres familles de molécules intervenant dans la réponse immune, sont déjà en cours d'évaluation quant à leur impact sur la survie du greffon.

Le récepteur de type 5 des CC chimiokines (CCR5) présent sur les cellules mononucléées peut présenter une délétion très rare de 32 pb au niveau de son gène, qui donne lieu à un récepteur inactif. Au cours du rejet aigu ou chronique, les cellules de la réponse immune, sont attirées vers le site inflammatoire selon un gradient croissant de chimiokines (dont les chimiokines de type Rantes et Mip-1 α , ligands des CCR5). En cas de CCR5 non fonctionnel, le recrutement des cellules mononucléées est limité, conduisant à une meilleure survie du greffon [100].

Il est intéressant aussi de citer l'exemple du polymorphisme du Cytotoxique T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA 4). Cette molécule se fixe sur les mêmes récepteurs que le CD28 sur les CPA (molécules B7). Cependant, tandis que les interactions CD28-B7 induisent des signaux de costimulation, l'interaction CTLA 4-B7 entraîne un effet inhibiteur sur la prolifération des lymphocytes T. Le polymorphisme sur le gène du CTLA 4 repose entre autres sur le nombre de microsatellites sur l'exon 3 et certains allèles issus de ce polymorphisme sont associés à un risque accru de rejet aigu en transplantation de foie et de rein [101].

1.3. Corrélation entre le génotype des cytokines et la capacité de production des cytokines in vitro

Un point très important des différentes études menées sur l'implication du polymorphisme des cytokines en transplantation concerne la mise en évidence réelle d'une association entre un génotype donné et un phénotype particulier, à savoir le niveau de production de la cytokine. Nous l'avons déjà évoqué dans les méthodes d'étude des polymorphismes génétiques, le phénotype de production a pu être obtenu grâce à la mesure des ARNm ou des protéines des cytokines produites après stimulation de cultures cellulaires in vitro ou bien grâce à l'étude de la capacité transcriptionnelle après stimulation de la région promotrice d'un gène par une technique de gène « rapporteur ». Or, certaines équipes ont montré récemment que les résultats de la production de cytokines par différentes

populations cellulaires issues des patients et stimulées in vitro, ne sont pas toujours corrélées avec le niveau de production attendu, compte tenu d'un génotype donné. Ainsi, Cartwright et al. [102] ont mesuré par ELISA la production d'IL4, IL6, IL10 et IFN γ au niveau d'une culture mixte lymphocytaire. Ils ont fait de même sur un groupe contrôle dont les cellules mononucléées ont été activées par la phytohémagglutinine. Ils ont également réalisé le génotypage de ces cytokines pour chaque patient. Ils n'ont trouvé aucune corrélation entre le génotype et la production des cytokines in vitro. Enfin, ils n'ont trouvé aucune corrélation entre le polymorphisme des cytokines et la survenue du rejet aigu. Nous pouvons penser que leurs résultats ont aussi été limités par le nombre de transplantés rénaux inclus dans leur étude (57 patients, 30 témoins), sans doute insuffisant.

Une étude a fait le point sur les différents protocoles techniques employés pour rechercher une corrélation entre les génotypes des cytokines et leur niveau de production in vitro [103]. Cette étude a notamment mis l'accent sur la diversité des méthodes de stimulation des cultures cellulaires, sur la diversité des types cellulaires stimulées (sang total, monocytes, lymphocytes, cellules mononucléées), ainsi que sur les variations dans les temps de stimulation des cellules. Selon cette étude, tous ces paramètres contribuent à la diversité des conclusions rendues. Une autre question qui a été soulignée concerne le milieu d'où sont prélevées les cellules pour l'étude in vitro. Par exemple la maladie initiale ou bien encore l'immunosuppression pourraient prendre le pas sur toute influence du polymorphisme génétique des cytokines. Ainsi, dans notre étude, nous avons choisi le temps J0 pour essayer de corréler les génotypes du TNF α et de l'IFN γ avec la production des cytokines intracellulaires et la MFI. Or, au temps J0, tous les patients étaient en situation de dialyse chronique et nous ne savons pas si ce paramètre a une incidence sur le comportement des cellules.

Une dernière remarque concerne la quantification de la production du TNF α et de l'IFN γ in vitro par les pourcentages des lymphocytes CD3+ CD4+ ou CD8+ produisant ces cytokines après stimulation in vitro. Ces données rendent compte en fait du nombre de lymphocytes

d'une population lymphocytaire donnée CD3+ CD4+ ou CD8+, capables de produire du TNF α ou de l'IFN γ après stimulation, et non directement la quantité de cytokine produite par ces lymphocytes in vitro. Les travaux de Cartwright et al. [104] ont constaté que le niveau de production de l'IFN γ , mesuré par ELISA dans les surnageants de culture des cellules mononucléées issues d'une population contrôle, n'était pas dépendant du nombre de lymphocytes CD3+ CD4+ ou CD8+ produisant cette cytokine, mesuré par cytométrie en flux, ni du polymorphisme génétique du gène de l'IFN γ . Pour en revenir à notre étude, nous pouvons avancer que le nombre de lymphocytes d'une population lymphocytaire donnée produisant du TNF α ou de l'IFN γ après stimulation in vitro n'est pas le marqueur adéquat de la capacité de production de ces cytokines par les lymphocytes dans le cadre d'une étude de corrélation avec les génotypes de production de ces cytokines. Nous avons aussi eu recours aux valeurs de MFI, qui est la moyenne de l'intensité de fluorescence des lymphocytes positifs pour les marqueurs recherchés, c'est-à-dire les marqueurs de surface des lymphocytes T (CD3, CD4, CD8) et les cytokines intracellulaires TNF α et IFN γ . Partant de l'idée que les valeurs de MFI étaient dépendantes du nombre moyen de cibles cellulaires fixant les anticorps spécifiques employés pour l'analyse cellulaire en cytométrie en flux, nous avons utilisé les valeurs de MFI pour estimer les quantités moyennes de cytokines intracellulaires produites par les lymphocytes T. Dans notre étude, il n'a pas été montré de corrélation entre les différents génotypes des gènes du TNF α et de l'IFN γ et les valeurs de MFI correspondantes.

2. Aspects cliniques de l'étude

Les aspects cliniques de l'étude se résument en la recherche de la place des polymorphismes génétiques considérés, en tant que facteurs indépendants qui conditionnent les variations inter-individuelles en ce qui concerne les événements immunologiques qui suivent la transplantation de rein. Nous avons considéré 2 types d'événements, l'infection à

CMV et le rejet aigu, qui peuvent survenir suite à la prise en charge des patients transplantés par une thérapeutique immunosuppressive ; l'infection à CMV étant le reflet d'un excès d'immunosuppression et le rejet aigu, celui d'un défaut d'immunosuppression.

Plusieurs points sont à discuter à propos des résultats qui ressortent de notre étude.

2.1. Distributions génotypiques dans notre population de patients

Pour pouvoir réaliser une analyse statistique complète des résultats, nous avons été limités par la faible représentation, voire de l'absence de représentation, de certains génotypes et phénotypes de production dans notre population d'étude. Par exemple, un seul patient était porteur du génotype homozygote fort sécréteur du TNF α -308A/A ; ou bien nous n'avons pas détecté de phénotype faible sécréteur de TGF β 1 parmi les patients étudiés. Ceci a limité fortement nos études comparatives.

D'autre part, les événements cliniques pris en compte pour notre étude, à savoir rejet aigu et CMV ont été observés dans un trop faible nombre de cas. Surtout, l'incidence du rejet aigu (5 cas sur 38 patients considérés) a considérablement diminué depuis l'utilisation des anti-calceurines, et ce chiffre est dans la normalité des résultats d'autres équipes. En conséquence, il faudrait inclure d'autres patients dans cette étude afin d'augmenter le nombre de patients subissant un rejet aigu ou une infection à CMV. Quelques études ont ouvert la discussion concernant l'éventuel effet du polymorphisme des cytokines sur l'installation du rejet chronique. Il s'agit d'un événement observé plutôt à long terme, dont la mise en place va dépendre de la présence de nombreux facteurs, immunologiques et non immunologiques. Certaines cytokines sont connues pour être impliquées dans la détérioration tardive du greffon, telles que l'IFN γ , déjà impliqué dans l'installation de la fibrose pulmonaire [78]; ou le TGF β 1, en transplantation pulmonaire [105] et rénale [106]. Dans ce dernier article sur l'importance du TGF β 1 dans le rejet chronique en transplantation rénale, Cuhaci et al. ont associé la néphrotoxicité de la CsA à la production de TGF β induite

par ce traitement, et ont observé la présence en quantité élevée de cette cytokine au niveau du greffon lors du diagnostic du rejet chronique. Ce sont les variations inter-patients observées sur les niveaux d'expression du TGF β , pour les mêmes concentrations sanguines de CsA, qui ont soulevé dans cette étude l'hypothèse de l'implication du polymorphisme génétique du TGF β dans le rejet chronique en transplantation de rein.

2.2. Polymorphisme génétique des cytokines et CMV

Nous avons tenté de rechercher une éventuelle implication du génotype de production des cytokines sur la survenue du CMV. Dans notre étude, 15 patients ont présenté une infection à CMV. Nous pourrions penser que le génotype de certaines cytokines pro-inflammatoires qui conditionne un phénotype de faible production de ces cytokines, pourrait amener une sensibilité du patient aux immunosuppresseurs plus importante par rapport aux forts sécréteurs de cytokines aux mêmes doses de traitement. En conséquence, un risque accru d'infection à CMV pourrait s'établir. Si tel était le cas, il faudrait soumettre ces patients à une prophylaxie anti-CMV plus longue et à une surveillance biologique de l'infection à CMV plus soutenue. Cependant, compte tenu du faible nombre de patients, nous n'avons pas mis en évidence dans cette population de patients traités par immunosuppresseurs, de corrélation entre le génotype des cytokines et l'incidence du CMV ; exceptée une tendance ($p=0,09$) avec le génotype IL10 -1082 GG. Aucun des patients CMV+ de notre étude ne porte ce génotype, et donc 100% des patients CMV+ sont faibles producteurs d'IL10 contre 74% des patients CMV-. Dans l'étude de Masri et al.[95], 71,5% des patients CMV+ sont également faibles producteurs d'IL10.

2.3. Facteurs pouvant influencer l'impact des polymorphismes génétiques

Les différents résultats constatés dans les études sur l'implication des cytokines en transplantation d'organes peuvent être influencés par de nombreux facteurs.

Tout d'abord, le type d'immunosuppression utilisé peut faire varier l'expression des cytokines. Par exemple, le génotype du TNF α pourrait être pris en considération en cas de monothérapie par CsA uniquement ; mais pas en cas d'association avec les corticostéroïdes dans la mesure où ceux-ci inhibent la synthèse de TNF α [107]. A l'inverse, il faudrait aussi étudier l'influence des corticostéroïdes sur la quantité de TNF α produit par les forts et les faibles sécréteurs, afin de voir s'ils ont une incidence différente selon le génotype.

Par ailleurs, l'allo-immunisation joue un grand rôle dans le rejet aigu [108]. Les patients de notre étude ne présentaient pas d'anticorps anti-HLA avant leur transplantation de rein (tableau 4), nous n'avons pas tenu compte de ce facteur de risque sur le rejet aigu. Dans la thèse de Gicquel-Fontenelle Anne (Rennes, 2002) [93], près de la moitié des patients est allo-immunisée. Lorsqu'elle considère l'ensemble de sa population, aucun polymorphisme génétique des gènes des cytokines étudiées n'est statistiquement corrélé au rejet aigu. Par contre, en ne retenant que les patients avec des antécédents de transplantation ou allo-immunés, pour lesquels est observée une augmentation du nombre de rejet dans son étude et dans d'autres travaux [109,110], elle trouve une tendance au rejet aigu chez les porteurs de l'allèle IL10 -1082 G, associé au phénotype fort producteur de l'IL10. Ce phénomène va à l'inverse des propriétés anti-inflammatoires de l'IL10, connue pour inhiber la différenciation des lymphocytes T vers une réponse de type Th1. Cependant, l'IL10 possède également la propriété d'orienter la réaction allogénique vers le versant humoral, ceci prend alors toute son importance dans le cas de patients allo-immunisés.

Enfin, nous avons déjà évoqué en première partie l'influence du polymorphisme génétique de certaines cytokines sur le rejet aigu. Par exemple en transplantation rénale, le génotype

IL6 -174 CC porté par le donneur et correspondant au phénotype faible producteur de l'IL6, est un facteur de risque indépendant du rejet aigu chez le receveur [111]. En transplantation cardiaque, ce sont les polymorphismes génétiques portés par le promoteur du gène de l'IL4, chez le donneur, qui sont liés au rejet aigu [112]. L'IL4 est une cytokine importante pour le développement des lymphocytes T en faveur d'un phénotype Th2 et l'inhibition de la production de cytokines de type Th1. Ainsi, les organes issus de donneurs présentant un phénotype fort producteur d'IL4, orienteraient l'environnement immunologique du greffon vers un profil anti-inflammatoire de type Th2. Il en découle quelques hypothèses sur la notion de l'appariement donneur/receveur en fonction de leurs génotypes du gène de l'IL4. Ainsi, des génotypes associés à un phénotype faible producteur d'IL4 chez les donneurs seraient un facteur de risque de rejet aigu chez les receveurs portant aussi des génotypes associés à un phénotype faible producteur d'IL4, du fait que ces génotypes ne sont pas propices à la mise en place d'une tolérance envers le greffon. Du point de vue technique, pour étudier les génotypes des donneurs, nous pourrions travailler à partir d'ADN extrait de leurs lymphocytes. En effet, dans le cadre d'une autre étude sur l'implication du polymorphisme génétique des cytokines en transplantation hépatique, nous avons repris les lymphocytes des donneurs, fournis par l'établissement français du sang Aquitaine Limousin, et conservés dans des paillettes congelées dans de l'azote liquide. Nous avons pu extraire l'ADN génomique de ces lymphocytes, sans précaution particulière pour la décongélation des paillettes, et nous avons retrouvé des profils électrophorétiques interprétables après utilisation de la trousse de génotypage des cytokines One Lambda.

2.4. Génotypage du FCGR3A

Seulement 10 patients ont reçu de l'anti-CD25 parmi les patients traités par CsA (17 patients). Parmi les patients traités par anti-CD25, 3 ont présenté un épisode de rejet aigu et 9 une infection ou une maladie à CMV, cependant aucun de ces patients sont homozygotes pour l'allèle FCGR3A 158V. Nous manquons de sujets traités par anti -IL2R en induction de

l'immunosuppression pour mener notre étude. Cependant, les essais menés jusqu'à présent montrent que la méthode est opérationnelle avec les équipements du laboratoire. Ceci permettra rapidement de poursuivre cette étude en incluant un grand nombre de patients. En effet, les traitements d'induction par anticorps anti-CD25 tendent à se généraliser actuellement.

Conclusion

Notre étude a été fortement limitée par l'effectif de notre population.

Nous n'avons pas pu obtenir de résultats significatifs à propos de l'implication du polymorphisme des gènes des cytokines dans la manifestation du rejet aigu ou du CMV, dans l'année qui suit la transplantation de rein.

Quant à la partie sur l'implication du polymorphisme génétique du FCGR3A en transplantation rénale, aucune analyse statistique n'a pu être réalisée.

Cette étude sur la recherche des facteurs génétiques qui peuvent influencer le traitement par anti-CD25 en situation de transplantation rénale est une première étape car il serait intéressant de poursuivre d'autres études du même type, d'autant plus que la PCR en temps réel offre de nombreux avantages techniques pour la détermination des génotypes, et notamment un gain de temps important par rapport aux méthodes classiques.

L'adaptation d'un traitement immunosuppresseur en fonction du terrain génétique du patient représente une perspective intéressante qui a ouvert la porte à de nombreuses voies d'exploration. Nous avons choisi d'étudier 2 familles de gènes dans le cadre de la transplantation de rein, mais elles sont également étudiées dans d'autres domaines pathologiques tels que celui des maladies auto-immunes ou des maladies infectieuses. Enfin, d'autres familles de gènes ou bien d'autres types de polymorphisme génétique sont également en considération afin de répondre à l'espoir d'une individualisation des thérapeutiques tenant compte des prédispositions génétiques.

Bibliographie

Bibliographie

1. Koulack J, McAlister V C, MacAulay M A, et al. -"Importance of minor histocompatibility antigens in the development of allograft arteriosclerosis". Clin Immunol Immunopathol, 1996, 80, 3 Pt 1: 273-7
2. Roopenian D C. -"What are minor histocompatibility loci? A new look at an old question". Immunol Today, 1992, 13, 1: 7-10
3. Halloran P F. -"T-cell activation pathways: a transplantation perspective". Transplant Proc, 1999, 31, 1-2: 769-71
4. Revillard J P. - IMMUNOLOGIE. - 3ème édition. - Paris: De Boeck Université, 1998. - 461 p.
5. Le Moine A, Goldman M, Abramowicz D. -"Multiple pathways to allograft rejection". Transplantation, 2002, 73, 9: 1373-81
6. Daemen M A, van 't Veer C, Denecker G, et al. -"Inhibition of apoptosis induced by ischemia-reperfusion prevents inflammation". J Clin Invest, 1999, 104, 5: 541-9
7. Daemen M A, van't Veer C, Wolfs T G, et al. -"Ischemia/reperfusion-induced IFN-gamma up-regulation: involvement of IL-12 and IL-18". J Immunol, 1999, 162, 9: 5506-10
8. Rogers N J, Lechler R I. -"Allorecognition". Am J Transplant, 2001, 1, 2: 97-102
9. Li B, Hartono C, Ding R, et al. -"Noninvasive diagnosis of renal-allograft rejection by measurement of messenger RNA for perforin and granzyme B in urine". N Engl J Med, 2001, 344, 13: 947-54
10. Nickel P, Lacha J, Ode-Hakim S, et al. -"Cytotoxic effector molecule gene expression in acute renal allograft rejection: correlation with clinical outcome; histopathology and function of the allograft". Transplantation, 2001, 72, 6: 1158-60

11. Porter C J, Ronan J E, Cassidy M J. -"fas-fas-ligand antigen expression and its relationship to increased apoptosis in acute renal transplant rejection". Transplantation, 2000, 69, 6: 1091-4
12. Pascual M, Theruvath T, Kawai T, et al. -"Strategies to improve long-term outcomes after renal transplantation". N Engl J Med, 2002, 346, 8: 580-90
13. Schmouder R L. -"Immunosuppressive therapies for the twenty-first century". Transplant Proc, 2000, 32, 7: 1463-7
14. Vinet B. -"Dosage des nucléotides de la 6-thioguanine (N6TG), de la 6-mercaptopurine (N6MP) et de la 6-méthylmercaptopurine (N6MMP) lors de l'administration de l'azathioprine (Imuran*) et de la mercaptopurine (Purinethol*)". Ann. Biochim. Clin. Qué, 2000, 38, 1: p.5-6
15. Vinet B, Morissette P. -"L'acide mycophénolique en transplantation: mécanisme d'action, métabolisme et "monitoring" sérique". Ann. Biol. Clin. Qué, 2001, 39, 1: p.11-14
16. Kaufman D B, Leventhal J R, Koffron A J, et al. -"A prospective study of rapid corticosteroid elimination in simultaneous pancreas-kidney transplantation: comparison of two maintenance immunosuppression protocols: tacrolimus/mycophenolate mofetil versus tacrolimus/sirolimus". Transplantation, 2002, 73, 2: 169-77
17. Halloran P F. -"Mechanism of action of the calcineurin inhibitors". Transplant Proc, 2001, 33, 7-8: 3067-9
18. Gurkan A, Tuncer M, Colak T, et al. -"Comparison of tacrolimus and neoral-based immunosuppressive regimens in renal transplantation patients: singles-center experience". Transplant Proc, 2002, 34, 5: 1661-2
19. Mayer A D, Dmitrewski J, Squifflet J P, et al. -"Multicenter randomized trial comparing tacrolimus (FK506) and cyclosporine in the prevention of renal allograft rejection: a report of the European Tacrolimus Multicenter Renal Study Group". Transplantation, 1997, 64, 3: 436-43

20. Vincenti F, Jensik S C, Filo R S, et al. -"A long-term comparison of tacrolimus (FK506) and cyclosporine in kidney transplantation: evidence for improved allograft survival at five years". Transplantation, 2002, 73, 5: 775-82
21. Flechner S M. -"Minimizing calcineurin inhibitor drugs in renal transplantation". Transplant Proc, 2003, 35, 3 Suppl: S118-21
22. Khanna A K. -"Mechanism of the combination immunosuppressive effects of rapamycin with either cyclosporine or tacrolimus". Transplantation, 2000, 70, 4: 690-4
23. Carpenter P A, Tso J Y, Press O W, et al. -"Non-FcR-binding, humanized anti-CD3 antibody Hu291 induces apoptosis of human T cells more effectively than OKT3 and is immunosuppressive in vivo". Transplant Proc, 2000, 32, 7: 1545-6
24. Norman D J, Vincenti F, de Mattos A M, et al. -"Phase I trial of HuM291, a humanized anti-CD3 antibody, in patients receiving renal allografts from living donors". Transplantation, 2000, 70, 12: 1707-12
25. Cole M S, Stellrecht K E, Shi J D, et al. -"HuM291, a humanized anti-CD3 antibody, is immunosuppressive to T cells while exhibiting reduced mitogenicity in vitro". Transplantation, 1999, 68, 4: 563-71
26. Weimar W, van Riemsdijk I C, Smak Gregoor P J, et al. -"Anti-CD25 prophylaxis allows steroid free kidney transplantation". Transplant Proc, 2001, 33, 7-8: 3176-7
27. Cantarovich M, Metrakos P, Giannetti N, et al. -"Anti-CD25 monoclonal antibody coverage allows for calcineurin inhibitor "holiday" in solid organ transplant patients with acute renal dysfunction". Transplantation, 2002, 73, 7: 1169-72
28. Dong V M, Yuan X, Coito A J, et al. -"Mechanisms of targeting CD28 by a signaling monoclonal antibody in acute and chronic allograft rejection". Transplantation, 2002, 73, 8: 1310-7
29. Nakayama Y, Abe H, Rapaport F T, et al. -"Influence of donor factors other than serologic status on transmission of cytomegalovirus to renal transplant recipients". Transplant Proc, 1994, 26, 2: 936-7

30. Bouedjoro-Camus M C, Novella J L, Toupance O, et al. -"[Cytomegalovirus infection, a risk factor for acute graft rejection in renal transplant recipients. A case-controlled study]". Presse Med, 1999, 28, 12: 619-24
31. Inkinen K, Soots A, Krogerus L, et al. -"Cytomegalovirus infection enhances connective tissue growth factor mRNA expression in a rat model of chronic renal allograft rejection". Transplant Proc, 2001, 33, 1-2: 379
32. Lautenschlager I, Soots A, Krogerus L, et al. -"Time-related effects of cytomegalovirus infection on the development of chronic renal allograft rejection in a rat model". Intervirolgy, 1999, 42, 5-6: 279-84
33. Kaplan B, Lown K, Craig R, et al. -"Low bioavailability of cyclosporine microemulsion and tacrolimus in a small bowel transplant recipient: possible relationship to intestinal P-glycoprotein activity". Transplantation, 1999, 67, 2: 333-5
34. Christians U, Sewing K F. -"Alternative cyclosporine metabolic pathways and toxicity". Clin Biochem, 1995, 28, 6: 547-59
35. Safarcik K, Brozmanova H, Bartos V, et al. -"Evaluation and comparison of therapeutic monitoring of whole-blood levels of cyclosporin A and its metabolites in renal transplantation by HPLC and RIA methods". Clin Chim Acta, 2001, 310, 2: 165-71
36. Murthy J N, Yatscoff R W, Soldin S J. -"Cyclosporine metabolite cross-reactivity in different cyclosporine assays". Clin Biochem, 1998, 31, 3: 159-63
37. Steimer W. -"Performance and specificity of monoclonal immunoassays for cyclosporine monitoring: how specific is specific?" Clin Chem, 1999, 45, 3: 371-81
38. David-Neto E, Lemos F B, Furusawa E A, et al. -"Impact of cyclosporin A pharmacokinetics on the presence of side effects in pediatric renal transplantation". J Am Soc Nephrol, 2000, 11, 2: 343-9
39. Nashan B, Cole E, Levy G, et al. -"Clinical validation studies of Neoral C(2) monitoring: a review". Transplantation, 2002, 73, 9 Suppl: S3-11

40. Lukaschek J, Hofmann J, Aerne D, et al. -"Neoral drug monitoring in stable kidney allotransplant recipients: C(0) versus C(2)". Transplant Proc, 2001, 33, 7-8: 3104-5
41. Einecke G, Mai I, Diekmann F, et al. -"Cyclosporine absorption profiling and therapeutic drug monitoring using C(2) blood levels in stable renal allograft recipients". Transplant Proc, 2002, 34, 5: 1738-9
42. Vinet B, Busque S. -"Revue sur le tacrolimus (FK506): un immunosuppresseur en gain de popularité". Ann. Biochim. Clin. Qué, 1997, 36: p.1-4
43. Alak A M. -"Measurement of tacrolimus (FK506) and its metabolites: a review of assay development and application in therapeutic drug monitoring and pharmacokinetic studies". Ther Drug Monit, 1997, 19, 3: 338-51
44. Batiuk T D, Urmsen J, Vincent D, et al. -"Quantitating immunosuppression. Estimating the 50% inhibitory concentration for in vivo cyclosporine in mice". Transplantation, 1996, 61, 11: 1618-24
45. Taupin J L, Merville P, McBride T, et al. -"Functional quantification of cyclosporine A and FK506 in human whole blood by flow cytometry, using the green fluorescent protein as an interleukin-2 reporter gene". J Immunol Methods, 2001, 256, 1-2: 77-87
46. Wenner P R, Di Padova F, Keown P A. -"Detection and quantification of cyclosporine in body fluids using an interleukin-2 reporter-gene assay". J Immunol Methods, 1997, 201, 1: 125-35
47. Garraffo R. -"Suivi thérapeutique des immunosuppresseurs: données actuelles". Revue française des laboratoires, juin 1998, 304: p.75-82
48. Yatscoff R W, Aspeslet L J, Gallant H L. -"Pharmacodynamic monitoring of immunosuppressive drugs". Clin Chem, 1998, 44, 2: 428-32
49. Mircheva J, Legendre C, Soria-Royer C, et al. -"Monitoring of azathioprine-induced immunosuppression with thiopurine methyltransferase activity in kidney transplant recipients". Transplantation, 1995, 60, 7: 639-42

50. Banchereau J. - Structure et action des cytokines. In: Hervé P, Riffle G and Vuitton D A. Transplantation d'organes et greffe de tissus. -. Paris: INSERM, 1994. p.169-82.
51. Joseph J V, Guy S P, Brenchley P E, et al. -"Th1 and Th2 cytokine gene expression in human renal allografts". Transplant Proc, 1995, 27, 1: 915-6
52. McLean A G, Hughes D, Welsh K I, et al. -"Patterns of graft infiltration and cytokine gene expression during the first 10 days of kidney transplantation". Transplantation, 1997, 63, 3: 374-80
53. Noronha I L, Eberlein-Gonska M, Hartley B, et al. -"In situ expression of tumor necrosis factor-alpha, interferon-gamma, and interleukin-2 receptors in renal allograft biopsies". Transplantation, 1992, 54, 6: 1017-24
54. Le Naour R, Gangloff S, Guenounou M. -"Le réseau des cytokines en situation normale et pathologique". Revue française des laboratoires, 2000, 328: p.23-29
55. Bidwell J, Keen L, Gallagher G, et al. -"Cytokine gene polymorphism in human disease: on-line databases, supplement 1". Genes Immun, 2001, 2, 2: 61-70
56. Daly A K, Day C P, Donaldson P T. -"Polymorphisms in immunoregulatory genes: towards individualized immunosuppressive therapy?" Am J Pharmacogenomics, 2002, 2, 1: 13-23
57. Wilson A G, Symons J A, McDowell T L, et al. -"Effects of a polymorphism in the human tumor necrosis factor alpha promoter on transcriptional activation". Proc Natl Acad Sci U S A, 1997, 94, 7: 3195-9
58. Wilson A G, de Vries N, Pociot F, et al. -"An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alpha promoter region is strongly associated with HLA A1, B8, and DR3 alleles". J Exp Med, 1993, 177, 2: 557-60
59. McGuire W, Hill A V, Allsopp C E, et al. -"Variation in the TNF-alpha promoter region associated with susceptibility to cerebral malaria". Nature, 1994, 371, 6497: 508-10

60. Perrey C, Pravica V, Sinnott P J, et al. -"Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report". Transpl Immunol, 1998, 6, 3: 193-7
61. Pravica V, Asderakis A, Perrey C, et al. -"In vitro production of IFN-gamma correlates with CA repeat polymorphism in the human IFN-gamma gene". Eur J Immunogenet, 1999, 26, 1: 1-3
62. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, et al. -"The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis". J Clin Invest, 1998, 102, 7: 1369-76
63. Gibson A W, Edberg J C, Wu J, et al. -"Novel single nucleotide polymorphisms in the distal IL-10 promoter affect IL-10 production and enhance the risk of systemic lupus erythematosus". J Immunol, 2001, 166, 6: 3915-22
64. Poli F, Piccolo G, Scalamogna M. -"Genetic polymorphisms influencing therapy and susceptibility to rejection in organ allograft recipients". BioDrugs, 2002, 16, 1: 11-7
65. Bathgate A J, Pravica V, Perrey C, et al. -"The effect of polymorphisms in tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and transforming growth factor-beta 1 genes in acute hepatic allograft rejection". Transplantation, 2000, 69, 7: 1514-7
66. Warle M C, Farhan A, Metselaar H J, et al. -"Cytokine gene polymorphisms and acute human liver graft rejection". Liver Transpl, 2002, 8, 7: 603-11
67. Tambur A R, Ortelgel J W, Ben-Ari Z, et al. -"Role of cytokine gene polymorphism in hepatitis C recurrence and allograft rejection among liver transplant recipients". Transplantation, 2001, 71, 10: 1475-80
68. Poole K L, Gibbs P J, Evans P R, et al. -"Influence of patient and donor cytokine genotypes on renal allograft rejection: evidence from a single centre study". Transpl Immunol, 2001, 8, 4: 259-65

69. Marshall S E, McLaren A J, Haldar N A, et al. -"The impact of recipient cytokine genotype on acute rejection after renal transplantation". Transplantation, 2000, 70, 10: 1485-91
70. Reviron D, Dussol B, Andre M, et al. -"TNF-alpha and IL-6 gene polymorphism and rejection in kidney transplantation recipients". Transplant Proc, 2001, 33, 1-2: 350-1
71. Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S, et al. -"Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation". Kidney Int, 1999, 56, 1: 281-8
72. Awad M R, Webber S, Boyle G, et al. -"The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome". J Heart Lung Transplant, 2001, 20, 6: 625-30
73. Abdallah A N, Cucchi-Mouillot P, Biteau N, et al. -"Analysis of the polymorphism of the tumour necrosis factor (TNF) gene and promoter and of circulating TNF-alpha levels in heart-transplant patients suffering or not suffering from severe rejection". Eur J Immunogenet, 1999, 26, 4: 249-55
74. Mor E, Klein T, Shabtai E, et al. -"Cytokine gene polymorphism in liver allograft recipients". Transplant Proc, 2001, 33, 6: 2941-2
75. Pelletier R, Pravica V, Perrey C, et al. -"Evidence for a genetic predisposition towards acute rejection after kidney and simultaneous kidney-pancreas transplantation". Transplantation, 2000, 70, 4: 674-80
76. Mazariegos G V, Reyes J, Webber S A, et al. -"Cytokine gene polymorphisms in children successfully withdrawn from immunosuppression after liver transplantation". Transplantation, 2002, 73, 8: 1342-5
77. Asderakis A, Sankaran D, Dyer P, et al. -"Association of polymorphisms in the human interferon-gamma and interleukin-10 gene with acute and chronic kidney transplant outcome: the cytokine effect on transplantation". Transplantation, 2001, 71, 5: 674-7

78. Awad M, Pravica V, Perrey C, et al. -"CA repeat allele polymorphism in the first intron of the human interferon-gamma gene is associated with lung allograft fibrosis". Hum Immunol, 1999, 60, 4: 343-6
79. Awad M R, El-Gamel A, Hasleton P, et al. -"Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation". Transplantation, 1998, 66, 8: 1014-20
80. Holweg C T, Baan C C, Balk A H, et al. -"The transforming growth factor-beta1 codon 10 gene polymorphism and accelerated graft vascular disease after clinical heart transplantation". Transplantation, 2001, 71, 10: 1463-7
81. Shin G T, Khanna A, Ding R, et al. -"In vivo expression of transforming growth factor-beta1 in humans: stimulation by cyclosporine". Transplantation, 1998, 65, 3: 313-8
82. Hutchinson I V. -"The role of transforming growth factor-beta in transplant rejection". Transplant Proc, 1999, 31, 7A: 9S-13S
83. Wynn C, Pan F, Erickson L, et al. -"High level of TGF-beta in organ transplantation might be due to rejection rather than calcineurin inhibitor medication". Transplant Proc, 2002, 34, 5: 1387-9
84. Fijen C A, Bredius R G, Kuijper E J, et al. -"The role of Fc gamma receptor polymorphisms and C3 in the immune defence against Neisseria meningitidis in complement-deficient individuals". Clin Exp Immunol, 2000, 120, 2: 338-45
85. Edberg J C, Langefeld C D, Wu J, et al. -"Genetic linkage and association of Fc gamma receptor IIIA (CD16A) on chromosome 1q23 with human systemic lupus erythematosus". Arthritis Rheum, 2002, 46, 8: 2132-40
86. Salmon J E, Ng S, Yoo D H, et al. -"Altered distribution of Fc gamma receptor IIIA alleles in a cohort of Korean patients with lupus nephritis". Arthritis Rheum, 1999, 42, 4: 818-9

87. Dijkstra H M, Bijl M, Fijnheer R, et al. -"Fcγ receptor polymorphisms in systemic lupus erythematosus: association with disease and in vivo clearance of immune complexes". Arthritis Rheum, 2000, 43, 12: 2793-800
88. Dijkstra H M, Scheepers R H, Oost W W, et al. -"Fcγ receptor polymorphisms in Wegener's granulomatosis: risk factors for disease relapse". Arthritis Rheum, 1999, 42, 9: 1823-7
89. Cartron G, Dacheux L, Salles G, et al. -"Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene". Blood, 2002, 99, 3: 754-8
90. Perrey C, Turner S J, Pravica V, et al. -"ARMS-PCR methodologies to determine IL-10, TNF-α, TNF-β and TGF-β 1 gene polymorphisms". Transpl Immunol, 1999, 7, 2: 127-8
91. Guarrigue I. -Mise au point d'une technique de quantification de l'ADN du cytomégalovirus par PCR en temps réel. Diplôme d'études approfondies Biologie Santé. Microbiologie. Bordeaux: Université Victor Segalen de Bordeaux 2, 2002. -19 p.
92. Germer S, Higuchi R. -"Single-tube genotyping without oligonucleotide probes". Genome Res, 1999, 9, 1: 72-8
93. Gicquel-Fontenelle A. -Evaluation de l'implication du polymorphisme génétique des cytokines dans le rejet aigu immunologique: application à la greffe de rein. Thèse de doctorat en médecine. Rennes: Université de Rennes I, 2002. -159 p.
94. Pravica V, Perrey C, Stevens A, et al. -"A single nucleotide polymorphism in the first intron of the human IFN-γ gene: absolute correlation with a polymorphic CA microsatellite marker of high IFN-γ production". Hum Immunol, 2000, 61, 9: 863-6
95. Masri M A, Barbari A, Stephan A, et al. -"Cytokine gene polymorphism in a Lebanese transplant population and its impact on graft acceptance: a single-center pilot study". Transplant Proc, 2003, 35, 1: 251-2

96. Turner D M, Williams D M, Sankaran D, et al. -"An investigation of polymorphism in the interleukin-10 gene promoter". Eur J Immunogenet, 1997, 24, 1: 1-8
97. Lehrnbecher T L, Foster C B, Zhu S, et al. -"Variant genotypes of FcgammaRIIIA influence the development of Kaposi's sarcoma in HIV-infected men". Blood, 2000, 95, 7: 2386-90
98. Lehrnbecher T, Foster C B, Zhu S, et al. -"Variant genotypes of the low-affinity Fcgamma receptors in two control populations and a review of low-affinity Fcgamma receptor polymorphisms in control and disease populations". Blood, 1999, 94, 12: 4220-32
99. Donohoe G G, Laaksonen M, Pulkki K, et al. -"Rapid single-tube screening of the C282Y hemochromatosis mutation by real-time multiplex allele-specific PCR without fluorescent probes". Clin Chem, 2000, 46, 10: 1540-7
100. Fischereder M, Luckow B, Hocher B, et al. -"CC chemokine receptor 5 and renal-transplant survival". Lancet, 2001, 357, 9270: 1758-61
101. Slavcheva E, Albanis E, Jiao Q, et al. -"Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 gene polymorphisms and susceptibility to acute allograft rejection". Transplantation, 2001, 72, 5: 935-40
102. Cartwright N H, Keen L J, Demaine A G, et al. -"A study of cytokine gene polymorphisms and protein secretion in renal transplantation". Transpl Immunol, 2001, 8, 4: 237-44
103. Warle M C, Farhan A, Metselaar H J, et al. -"Are cytokine gene polymorphisms related to in vitro cytokine production profiles?" Liver Transpl, 2003, 9, 2: 170-81
104. Cartwright N, Demaine A, Jahromi M, et al. -"A study of cytokine protein secretion, frequencies of cytokine expressing cells and IFN-G gene polymorphisms in normal individuals". Transplantation, 1999, 68, 10: 1546-52
105. El-Gamel A, Awad M, Sim E, et al. -"Transforming growth factor-beta1 and lung allograft fibrosis". Eur J Cardiothorac Surg, 1998, 13, 4: 424-30

106. Cuhaci B, Kumar M S, Bloom R D, et al. -"Transforming growth factor-beta levels in human allograft chronic fibrosis correlate with rate of decline in renal function". Transplantation, 1999, 68, 6: 785-90
107. Marshall S E, Welsh K I. -"The role of cytokine polymorphisms in rejection after solid organ transplantation". Genes Immun, 2001, 2, 6: 297-303
108. Susal C, Opelz G. -"Kidney graft failure and presensitization against HLA class I and class II antigens". Transplantation, 2002, 73, 8: 1269-73
109. Lee P C, Terasaki P I, Takemoto S K, et al. -"All chronic rejection failures of kidney transplants were preceded by the development of HLA antibodies". Transplantation, 2002, 74, 8: 1192-4
110. Fernandez-Fresnedo G, Pastor J M, Lopez-Hoyos M, et al. -"Relationship of donor-specific class-I anti-HLA antibodies detected by ELISA after kidney transplantation on the development of acute rejection and graft survival". Nephrol Dial Transplant, 2003, 18, 5: 990-5
111. Marshall S E, McLaren A J, McKinney E F, et al. -"Donor cytokine genotype influences the development of acute rejection after renal transplantation". Transplantation, 2001, 71, 3: 469-76
112. Bijlsma F J, vanKuik J, Tilanus M G, et al. -"Donor interleukin-4 promoter gene polymorphism influences allograft rejection after heart transplantation". J Heart Lung Transplant, 2002, 21, 3: 340-6

Ressource internet

113. Etablissement Français des greffes, site <http://www.efg.sante.fr/> [en ligne].- Le prélèvement et la greffe en France en 2001. Disponible sur http://www.efg.sante.fr/fr/rapport/index_2.html (page consultée le 20 avril 2003)
114. Lamoril J, Bogard M.- Biologie moléculaire en biologie clinique, principales techniques de détection des mutations. In : Biotribune [en ligne]. Disponible sur : <http://www.biotribune.com/articles/dossiers/biomedicaux/d29/index.html>. (page consultée le 15 mai 2003)

SERMENT DE GALIEN

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.

BON A IMPRIMER N° 398

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Vu, le Doyen de la Faculté

VU et PERMIS D'IMPRIMER

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ

RESUME :

Assujettie à moins de complications, la transplantation rénale a bénéficié de l'emploi des immunosuppresseurs pour contrôler les différents mécanismes mis en jeu dans la reconnaissance des alloantigènes. L'utilisation des immunosuppresseurs est toutefois tributaire d'une surveillance pharmacologique et, si possible pharmacodynamique car, malgré l'utilisation de protocoles thérapeutiques standard, il existe des variations inter-individuelles dans la réponse au traitement, qui peuvent notamment donner lieu à des évènements liés à un excès d'immunosuppression, par exemple l'infection à CMV, ou inversement à ceux liés à une insuffisance des doses thérapeutiques de type rejet de greffe. Considéré comme un facteur important dans la mise en place des différents évènements immunologiques qui suivent la transplantation de rein, le polymorphisme génétique a été vu dans cette étude sous l'angle du polymorphisme de quelques gènes de cytokines et sous celui du polymorphisme du gène FCGR3A.

DISCIPLINE :

Immunologie

MOTS-CLES :

Transplantation rénale
Immunosuppression
Polymorphisme génétique
Cytokines

FCGR3A, récepteur au fragment Fc des immunoglobulines de type IIIA
PCR-SSP
PCR en temps réel
Courbes de fusion et SYBR Green I

INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE :

Laboratoire d'Immunologie
Hôpital Pellegrin
Place Amélie Raba-Léon – BORDEAUX