ANNEE 2016

N°

Insuffisance rénale chronique : De la sénescence à l'immunosénescence accélérée

Etude de la variation des transcrits Lymphocytaires du gène *Klotho* en fonction de l'insuffisance rénale

THESE

présentée

à l'UFR des Sciences de Santé de Dijon

Circonscription Médecine

et soutenue publiquement le 7 juin 2016

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par LEGENDRE Mathieu

Né(e) le 05/03/1986

à Dijon

UNIVERSITE DE BOURGOGNE — Année Universitaire 2015-2016

UFR des Sciences de Santé — au **1er Mai 2016**

Doyen :	**M. Frédéric HUET**
1er Assesseur :	M. Yves ARTUR
Assesseurs :	Mme Laurence DUVILLARD
	M. Pablo ORTEGA-DEBALLON
	M. Marc MAYNADIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

			Discipline
M.	Marc	**BARDOU**	Pharmacologie clinique
M.	Jean-Noël	**BASTIE**	Hématologie - transfusion
M.	Emmanuel	**BAULOT**	Chirurgie orthopédique et traumatologie
M.	Laurent	**BEDENNE**	Gastroentérologie et hépatologie
M.	Yannick	**BEJOT**	Neurologie
M.	Charles	**BENAIM**	Médecine physique et réadaptation
			(Mise à disposition pour convenances personnelles jusqu'au 31/10/2016)
M.	Alain	**BERNARD**	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M.	Jean-François	**BESANCENOT**	Médecine interne
Mme	Christine	**BINQUET**	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
M.	Bernard	**BONIN**	Psychiatrie d'adultes
Mme	Claire	**BONITHON-KOPP**	Thérapeutique
M.	Philippe	**BONNIAUD**	Pneumologie
M.	Alain	**BONNIN**	Parasitologie et mycologie
M.	Bernard	**BONNOTTE**	Immunologie
M.	Olivier	**BOUCHOT**	Chirurgie cardiovasculaire et thoracique
M.	Belaid	**BOUHEMAD**	Anesthésiologie - réanimation chirurgicale.
M.	Alexis	**BOZORG-GRAYELI**	ORL
M.	Alain	**BRON**	Ophtalmologie
M.	Laurent	**BRONDEL**	Physiologie
M.	François	**BRUNOTTE**	Biophysique et Médecine Nucléaire
M.	Patrick	**CALLIER**	Génétique
M.	Philippe	**CAMUS**	Pneumologie
M.	Jean-Marie	**CASILLAS-GIL**	Médecine physique et réadaptation
Mme	Catherine	**CHAMARD-NEUWIRTH**	Bactériologie - virologie; hygiène hospitalière
M.	Pierre-Emmanuel	**CHARLES**	Réanimation
M.	Pascal	**CHAVANET**	Maladies infectieuses
M.	Nicolas	**CHEYNEL**	Anatomie
M.	Alexandre	**COCHET**	Biophysique et médecine nucléaire
M.	Luc	**CORMIER**	Urologie
M.	Yves	**COTTIN**	Cardiologie
M.	Charles	**COUTANT**	Gynécologie-obstétrique
M.	Gilles	**CREHANGE**	Oncologie-radiothérapie
Mme	Catherine	**CREUZOT-GARCHER**	Ophtalmologie
M.	Frédéric	**DALLE**	Parasitologie et mycologie
M.	Serge	**DOUVIER**	Gynécologie-obstétrique
Mme	Laurence	**DUVILLARD**	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Laurence	**FAIVRE-OLIVIER**	Génétique médicale
Mme	Patricia	**FAUQUE**	Biologie et Médecine du Développement
Mme	Irène	**FRANCOIS-PURSSELL**	Médecine légale et droit de la santé
M.	Pierre	**FUMOLEAU**	Cancérologie
M.	François	**GHIRINGHELLI**	Cancérologie
M.	Claude	**GIRARD**	Anesthésiologie – réanimation chirurgicale
M.	Maurice	**GIROUD**	Neurologie
M.	Vincent	**GREMEAUX**	Médecine physique et réadaptation
M.	Patrick	**HILLON**	Thérapeutique
M.	Frédéric	**HUET**	Pédiatrie
M.	Pierre	**JOUANNY**	Gériatrie
M.	Denis	**KRAUSE**	Radiologie et imagerie médicale
M.	Gabriel	**LAURENT**	Cardiologie
M.	Côme	**LEPAGE**	Gastroentérologie et hépatologie
M.	Romaric	**LOFFROY**	Radiologie et imagerie médicale
M.	Luc	**LORGIS**	Cardiologie
M.	Jean-Francis	**MAILLEFERT**	Rhumatologie
M.	Philippe	**MAINGON**	Cancérologie-radiothérapie
M.	Cyriaque Patrick	**MANCKOUNDIA**	Gériatrie
M.	Laurent	**MARTIN**	Anatomie et cytologie pathologiques
M.	David	**MASSON**	Biochimie et biologie moléculaire
M.	Marc	**MAYNADIE**	Hématologie - transfusion
M.	Thibault	**MOREAU**	Neurologie

M.	Klaus Luc	**MOURIER**	Neurochirurgie
Mme	Christiane	**MOUSSON**	Néphrologie
M.	Paul	**ORNETTI**	Rhumatologie
M.	Pablo	**ORTEGA-DEBALLON**	Chirurgie Générale
M.	Jean-Michel	**PETIT**	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Lionel	**PIROTH**	Maladies infectieuses
Mme	Catherine	**QUANTIN**	Biostatistiques, informatique médicale
M.	Patrick	**RAT**	Chirurgie générale
M.	Jean-Michel	**REBIBOU**	Néphrologie
M.	Frédéric	**RICOLFI**	Radiologie et imagerie médicale
M.	Paul	**SAGOT**	Gynécologie-obstétrique
M.	Emmanuel	**SAPIN**	Chirurgie Infantile
M.	Henri-Jacques	**SMOLIK**	Médecine et santé au travail
M.	Eric	**STEINMETZ**	Chirurgie vasculaire
M.	Jean-Raymond	**TEYSSIER**	Génétique moléculaire
Mme	Christel	**THAUVIN**	Génétique
M.	Pierre	**VABRES**	Dermato-vénéréologie
M.	Bruno	**VERGES**	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
M.	Narcisse	**ZWETYENGA**	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie

PROFESSEURS ASSOCIES DE MEDECINE D'URGENCE

M.	Bruno	**MANGOLA**	(du 01/05/2016 au 14/11/2016)

PROFESSEURS EN SURNOMBRE

M.	Frédéric	**MICHEL**	(surnombre du 20/10/2015 au 31/08/2019)
M.	Roger	**BRENOT**	(surnombre jusqu'au 31/08/2018)
Mme	Monique	**DUMAS-MARION**	(surnombre jusqu'au 31/08/2018)
M.	Marc	**FREYSZ**	(surnombre jusqu'au 31/08/2016)
M.	Philippe	**ROMANET**	(surnombre du 10/07/2013 au 31/08/2016)
M.	Pierre	**TROUILLOUD**	(surnombre du 05/02/2014 au 31/08/2017)

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES MEDICALES

			Discipline Universitaire
M.	Sylvain	**AUDIA**	Médecine interne
Mme	Shaliha	**BECHOUA**	Biologie et médecine du développement
Mme	Marie-Claude	**BRINDISI**	Nutrition
M.	Jean-Christophe	**CHAUVET-GELINIER**	Psychiatrie, psychologie médicale
M.	Alexis	**DE ROUGEMONT**	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
M.	Olivier	**FACY**	Chirurgie générale
Mme	Ségolène	**GAMBERT-NICOT**	Biochimie et biologie moléculaire
Mme	Françoise	**GOIRAND**	Pharmacologie fondamentale
Mme	Agnès	**JACQUIN**	Physiologie
M.	Sylvain	**LADOIRE**	Histologie
M.	Alain	**LALANDE**	Biophysique et médecine nucléaire
M.	Louis	**LEGRAND**	Biostatistiques, informatique médicale
Mme	Stéphanie	**LEMAIRE-EWING**	Biochimie et biologie moléculaire
M.	André	**PECHINOT**	Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière
M	Maxime	**SAMSON**	Médecine interne
M.	Benoit	**TROJAK**	Psychiatrie d'adultes ; addictologie
M.	Paul-Mickaël	**WALKER**	Biophysique et médecine nucléaire

PROFESSEURS EMERITES

M.	Jean	**CUISENIER**	(01/09/2014 au 31/08/2017)
M.	Jean-Pierre	**DIDIER**	(01/09/2011 au 31/08/2017)
M.	Jean	**FAIVRE**	(01/09/2012 au 31/08/2018)
M	Philippe	**GAMBERT**	(01/09/2014 au 31/08/2017)
M.	François	**MARTIN**	(01/09/2012 au 31/08/2018)
M.	Pierre	**POTHIER**	(01/09/2015 au 31/08/2018)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

M.	Jean-Noël	**BEIS**	Médecine Générale

PROFESSEURS ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

Mme	Patricia	**MERCIER**	Médecine Générale
M.	Gilles	**MOREL**	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE

Mme	Catherine	**AUBRY**	Médecine Générale
M.	Didier	**CANNET**	Médecine Générale
M.	Clément	**CHARRA**	Médecine Générale
M.	Arnaud	**GOUGET**	Médecine Générale
M.	François	**MORLON**	Médecine Générale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

M.	Didier	**CARNET**	Anglais
M.	Jean-Pierre	**CHARPY**	Anglais
Mme	Catherine	**LEJEUNE**	Pôle Epidémiologie
M.	Gaëtan	**JEGO**	Biologie Cellulaire
Mme	France	**MOUREY**	Sciences et techniques des activités physiques et sportives

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Mme	Marianne	**ZELLER**	Physiologie

PROFESSEURS AGREGES de L'ENSEIGNEMENT SECONDAIRE

Mme	Marceline	**EVRARD**	Anglais
Mme	Lucie	**MAILLARD**	Anglais

PROFESSEURS CERTIFIES

Mme	Anaïs	**CARNET**	Anglais
M.	Philippe	**DE LA GRANGE**	Anglais
Mme	Virginie	**ROUXEL**	Anglais (Pharmacie)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme	Evelyne	**KOHLI**	Immunologie
M.	François	**GIRODON**	Sciences biologiques, fondamentales et cliniques

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

M.	Mathieu	**BOULIN**	Pharmacie clinique
M.	Philippe	**FAGNONI**	Pharmacie clinique
M.	Frédéric	**LIRUSSI**	Toxicologie
M.	Marc	**SAUTOUR**	Botanique et cryptogamie
M.	Antonin	**SCHMITT**	Pharmacologie

L’UFR des Sciences de Santé de Dijon, Circonscription Médecine, déclare que les opinions émises dans les thèses qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs, et qu'elle n'entend ne leur donner ni approbation, ni improbation.

COMPOSITION DU JURY

Président :

Mr le Professeur Jean-Michel Rebibou

Membres :

Mr le Professeur Jean-François Besancenot

Mme le Professeur Christiane Mousson

Mr le Professeur Didier Ducloux

Mr le Docteur Thomas Crepin - Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Jean-Michel Rebibou,

Vous m'avez fait l'honneur de présider cette thèse. Vous m'avez toujours accordé votre confiance dans ce travail et dans de nombreux autres. Vous m'avez guidé, orienté, soutenu. Vos enseignements, votre passion et dévouement dans la Néphrologie clinique, l'Immunologie et la recherche m'ont conforté dans mon choix de spécialité.

Veuillez recevoir ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Professeur Christiane Mousson,

Durant ces cinq années de formation, vous m'avez transmis une partie de votre savoir et votre amour de la Transplantation rénale. Vos connaissances en Thérapeutique, en Immunologie ont été des aides précieuses dans ma pratique quotidienne de la Médecine au lit du malade. Vous m'avez aussi encouragé à découvrir la recherche médicale. Je vous en serais toujours reconnaissant.

Veuillez recevoir avec ce travail l'expression de mon profond respect.

A Monsieur le Professeur Jean-François Besancenot,

Vous m'avez accueilli dans votre service une année durant. Je ne pourrais jamais assez vous en remercier de m'avoir tant enseigné sur la sémiologie, la thérapeutique et l'histoire de la médecine. Vous m'avez appris que chaque malade doit être considéré avec l'ensemble de ses symptômes, antécédents, traitements et que c'est un devoir de médecin de lui trouver son diagnostic et le traitement approprié. Vous m'avez apporté votre soutien dans tous mes projets professionnels.

J'aimerais que ce travail soit un début de témoignage de ma profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur Didier Ducloux,

Vous m'avez permis de travailler durant une année avec votre formidable équipe et accordé votre confiance pour poursuivre l'un de vos nombreux travaux de Recherche Médicale. Vous m'avez encadré dans ce travail et vos orientations, enseignements m'ont été très précieux.

Veuillez trouver ici le témoignage de ma sincère considération

A Monsieur le Docteur Thomas Crepin,

Tu m'as fait l'honneur de diriger cette thèse et d'accepter ma collaboration sur cette étude. Tu m'as enseigné de nombreuses techniques de laboratoire et appris le cheminement complexe nécessaire à la mise au point de celles-ci. Tu as toujours été présent pour répondre à mes nombreuses interrogations, corriger mes erreurs et permettre à ce travail de voir le jour.

Que cette thèse soit l'occasion d'exprimer ma reconnaissance.

A ma fiancée Marzia,

Maintenant 8 ans que tu me supportes, que ce soit dans les moments de bonheur comme dans les épreuves. Je n'ai jamais été doué pour exprimer mes sentiments, cependant j'aimerais que tu saches que tu es tout à la fois : ma meilleure amie, mon amour et mon âme sœur. On a passé notre vie à se croiser avant de se rencontrer, jamais on ne pourra nous séparer. Je ressens ta présence derrière chaque ligne de ce travail. Je t'aime.

A ma Mère,

Tu es la personne qui m'a donné l'amour des sciences de la Médecine et de la recherche. Si je me trouve ici aujourd'hui, c'est parce que tu m'y as mené. Tu m'as toujours donné ton amour et ton soutien sans condition. Tu m'as appris la valeur du travail, la tolérance. J'aimerais que ce travail soit le reflet des valeurs que tu m'as inculquées (sauf peut-être l'orthographe).

A mon Père,

Je t'ai toujours admiré pour ta culture, ton intelligence et ta capacité à ne pas perdre patience devant mon incompréhension des mathématiques. J'espère que ce travail sera à la hauteur de la rigueur que tu as tenté de me transmettre et des espérances que tu as placé en moi. Je sais que tu ne seras pas là ce soir mais toutes mes pensées sont avec toi.

A ma sœur Amélie,

Je ne connais personne au monde qui pense autant aux autres que toi. J'adore ton altruisme et ta compassion sans limite. Je sais qu'on ne se le dit pas souvent mais tu es un exemple pour moi. Même si nous avons passé les premières années de notre vie à nous bagarrer, aujourd'hui rien ne semble pouvoir nous opposer. Tu es la maman de la plus belle des petites filles et tu as trouvé un homme génial qui te rend heureuse.

A ma Belle-famille,

A Mahram, Bibi Gole, Nader, Nassima, Naïma, Mehdi : merci encore de m'avoir accueilli dans votre si belle famille

A mes Amis de toujours,

A Miloud ensemble on a fait les 400 coups, **A Romain** et toute notre enfance passée ensemble, **A Jerem'** qui sait systématiquement me remettre en place, **A Damien** et notre passion commune du cinéma. Et à toutes leurs compagnes qui sont rentrées dans notre famille: **Elodie et Anne Laure**.

A mes Amis des bancs d'école,

A Raphael le sosie wallon d'épaule de Ryan Gosling (j'ai connu une femme à Gordon Street), **A Jean** ou plutôt Bulkian l'empereur du code 2 (sosie d'épaule de heu…) (j'ai écrit cette thèse en Français pour que tu puisses la lire), **A Maud** ma « BFFE » qui après moi a un deuxième enfant à gérer, **A Alex** le Cristina Cordula Portugo-Algérien qui a essayé de me convaincre de l'existence des jupes pour homme, **A Tony** qui maitrise le C-walk en Gazelles de toutes les couleurs comme personne et avec qui on a passé un des meilleurs semestres de mon internat, **A Olivier** qui m'a fait découvrir la littérature et qui m'a démontré que les cartons de pizza sont d'excellents murs porteurs, **A Mathilde** connue pour sa passion pour les prises de décisions et les siestes à 21h, **A Victor** le dernier fan d'Avril Lavigne, mais aussi **Benji** le pire binôme du monde, **A Pauline**, **Sylvain**, **Mitch**, **Vivien**, **Mélanie**, **Pierre-Yves**, **Anaïs** et tous ceux que j'oublie.

A mes Amis bgirls / bboys,

A bob le James Brown globe-trotter dijonnais, **A Jenny** qui arrive à danser avec 2 kilos de cheveux sur la tête et des talons de 10 cm, **Aux BDF Merwan, Medja, Silhem et Yanis** qui ont bien (trop) grandi en huit ans , **A Max** futur star du Bodybuilding, **A Alaey**, **Eddy**, **Daddou** et tous les autres.

A mes Collègues,

A Alizée une vraie amie qui est toujours capable de cloner des bactéries ou de trouver le bar à chat le plus proche, **A Christophe** la force tranquille de l'un de mes meilleurs semestres, **A Salim** porté disparu du service d'anapath… et d'hématologie probablement en train de pirater la NSA, **A PH** grâce à qui j'ai eu de nombreux débat constructifs sur les GNRP / Grenn Lantern et les ewoks, **A Anna** amis dès la première année et 10 ans plus tard on se retrouve dans le même service, j'espère que nous resterons toujours aussi proche, **A Caroline** la spécialiste cagole du myélôome, **A Léa** qui est capable de faire des annonces diagnostics à la manière de personne d'autre (assez génial), **A Damien** qui m'a fait connaitre entre autres les joies de la Macro, **A Julie / Elsa / Clémence et**

Olivier qui m'ont tous fait beaucoup rire et rappelé que je ne comprenais vraiment rien à l'Ophtalmologie, **A PSP** le mec le plus droit du monde (et trop costaud pour que je puisse dire l'inverse), **A Clémence** la représentante Bisontine des Gossip-Girls, **A Nadjla** mariage improbable entre un Jukebox et un microscope, **A Alice** qui se forçait toujours à rire de mes blagues, **A Nathalie** que j'ai eu comme co-interne et comme chef qui a toujours été brillante et juste, **A Stéphane** que je ne vois pas assez souvent !, **A Magalie** brillante et qui a le cœur sur la main, **A Malala** et son humour, **A Jeff** qui m'a montré des lignes « B » sur un échographe alors que je ne voyais que des traits et des points noirs, **A Charline** dont rien mais vraiment rien ne peut altérer sa bonne humeur, **A Allyriane** à qui je meurs d'envie d'acheter une télé, **A Wendy** et sa passion de la Médecine, **A Dj Fiftissem** et « sa chanson », **A Hamid** le tentateur, **A Coch'**, **A Jean Charles**, **A Geoffrey** futur Mister Univers et à tous les autres.

Aux infirmiers de Néphrologie (**Rémy, Marie, Dan, Anne So, Christelle et toute l'équipe**), de Médecine 2 (**Pascaline, Cécile, Emilies, et toute l'équipe**), de Gaffarel et de Réa / Néphrologie à Macon, et à l'équipe de **Biomonitoring** et **toute l'UMR 1098**.

A mes Chefs,

A Nabil qui m'a accompagné tout au long de mon internat, qui était toujours disponible pour communiquer son savoir et pour me superviser, **A Gilbert** qui a encadré ma formation, fait découvrir les Soins Intensifs, m'a appris la prise en charge de l'insuffisance rénale aigue et les vainqueurs du tour de France de ces 50 dernières années. **A Samir** qui m'avait accueilli au centre puis formé à l'hémodialyse, qui m'a transmis le souci du détail et appris que l'intérêt du patient passe toujours en premier, **A Manu** qui a été la première personne à me pousser à faire de la Néphrologie ma Spécialité et qui m'a donné l'envie de faire ce métier, **A Zarah** qui avec beaucoup de patience et d'humour m'a montré l'hémodialyse et surtout la dialyse péritonéale, , **A Philip** qui essai encore aujourd'hui de m'expliquer ce qu'est une choroidite multifocale, qui m'a accordé sa confiance pour travailler avec lui tout en supportant mes Mails à 23h les dimanches soirs, **A Hervé** qui sera un grand Universitaire, qui m'a systématiquement supervisé dans tous mes travaux de recherche (et qui parle le Gungan). **A Géraldine** qui m'a partagée une petite partie de son savoir sur l'HTAP et sur les maladies de systèmes et qui s'est arrachée les cheveux sur la grammaire dans mes courriers, **A Alin** qui partage avec une bonne humeur communicative son savoir, **Au Professeur Martin** qui m'a enseigné la Néphropathologie, **A Hamid**, **Au Professeur Saas** qui m'a accueilli dans son UMR de recherche et qui a toujours pris le temps pour corriger mes travaux, **Au service de réanimation de Macon**.

SERMENT D'HIPPOCRATE

"Au moment d'être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité.

Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera.

Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j'y manque."

Sommaire

I- Abréviations 13

II- Introduction 14

1) Immunosénescence 14

2) Immunosénescence et insuffisance rénale chronique 17

3) La protéine Klotho 17

4) Objectifs principaux et secondaires 20

III- Matériel et Méthodes 21

1) Schéma d'étude 21

2) Population de l'étude 21

3) Recueils Biologiques 22

4) Culture Cellulaire 23

5) Biologie Moléculaire 23

6) Western Blot de la protéine Klotho 30

7) Analyse statistique 31

IV- Résultats 32

1) Caractéristiques des populations étudiées 32

2) Immunosénescence lymphocytaire T accélérée dans l'insuffisance rénale 33

3) Hyper-expression des transcrits du gène *Klotho* lymphocytaire dans l'insuffisance rénale 37

4) Présence d'une expression intracellulaire de la protéine Klotho dans les PBMCs de patients insuffisants rénaux sévères et terminaux 40

5) Expression de *Klotho* non modulée *in vitro* par les toxines urémiques 41

V- Discussion 42

VI- Conclusion 47

VII- Bibliographie 48

I- Abréviations

1,25 OH D_3 :*1,25-dihydroxycholécalciférol*

ADN : *Acide Désoxyribonucléique*

Ag HBs: *antigène de surface de l'hépatite B*

ARA2: *Antagonistes du Récepteur de l'Angiotensine II*

ARN: *Acide Ribonucléique*

ARNm: *ARN messager*

CCR: *chemokine receptor*

CD: *cluster de différenciation*

cDNA*: Acide Désoxyribonucléique complémentaire*

CG : *centres germinatifs*

CHU : *Centre Hospitalo-Universitaire*

CMH: *Complexe Majeur d'Histocompatibilité*

CMV : *Cytomégalovirus*

CRP : *Protéine C Réactive*

DFG: *Débit de filtration glomérulaire*

ECL: *Enhanced Chemiluminescence*

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*

FGF 23: *Fibroblast growth factor 23*

FISH: *Fluorescence in situ hybridization*

GAPDH: *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase*

hTERT: *Human Telomerase Reverse Transcriptase*

IEC: *Inhibiteurs de l'Enzyme de Conversion*

IMC: *Index de masse corporelle*

IGF1: *Insulin-like Growth Factor 1*

IL: *Interleukine*

MDRD: *Modification of Diet in Renal Disease*

miRNA: *micro ARN*

PBMCs: *Peripheral Blood Mononuclear Cells*

PBS: *Phosphate Bufffered Saline*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

PTH: *Parathormone*

PVDF: *Polyvinylidene Difluoride*

RIG-I: *retinoic-acid-inducible gene-I*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

RT-PCR: Real *Time–Polymerase Chain Reaction*

RTE: *Recent Thymic Emigrant*

SDS: *Sodium Dodecyl Sulfate*

SEM: *Standard Error of the Mean*

T EMRA : *Lymphocytes T Effecteurs Mémoires Ré-exprimant le CD45RA*

TCR: *T Cell Receptor*

TREC: *T cell Receptor rearrangement Excision Circles*

VIH : *Virus de l'immunodéficience humaine*

II- Introduction

Le déclin de la fonction rénale est associé à une altération de l'immunité et à un état d'inflammation systémique (1) qui a des conséquences majeures à long terme. D'un point de vue clinique, cette altération de l'immunité se manifeste par une sensibilité accrue aux infections, une augmentation de l'incidence des néoplasies et des maladies cardiovasculaires (2–4). De nombreuses hypothèses ont été émises pour expliquer cette altération de la réponse immune. Un vieillissement accéléré du système immunitaire est une des hypothèses soulevées. Il existe à l'heure actuelle un faisceau d'arguments la justifiant. Le vieillissement du système immunitaire, commun à toutes les personnes âgées, est aussi appelé immunosénescence.

1) Immunosénescence

L'immunosénescence est responsable d'une augmentation de la fréquence et de la sévérité des infections virales et bactériennes, possiblement en rapport avec une diminution de l'efficacité de l'immunité cellulaire et humorale (5). Il s'agit d'une dérégulation profonde du système immunitaire avec comme autre conséquence une apparition de maladies auto-immunes, de néoplasies et d'événements athéromateux (6).

A- Fonction thymique

La pathogenèse de l'immunosénescence serait principalement liée à une atteinte de la fonction lymphocytaire T, en rapport avec une involution thymique et à la répétition des stimulations antigéniques. Le thymus est un organe bilobé situé dans le médiastin antéro-supérieur. Cet organe lymphoïde primaire permet la maturation des lymphocytes T via la présentation antigénique. Le thymus subit très tôt dans la vie des transformations structurelles et fonctionnelles. Le volume maximal du thymus est atteint vers l'âge d'un an et décroit par la suite lentement. Au cours de l'involution, le tissu cortical et médullaire (thymocytes, cellules épithéliales thymiques, espace périvasculaire) se réduit à de minces espaces cernés de tissus fibreux et adipeux (7). Cette involution thymique a été présentée comme en grande partie responsable de l'immunosénescence. Une atteinte de la fonction thymique est connue pour être responsable d'une surmortalité toutes

causes confondues chez le sujet âgé (8). La fonction thymique ou plus précisément le nombre de lymphocytes naïfs quittant le thymus peut être évalué avec la mesure du nombre de *single joint T cell Receptor rearrangement Excision Circles* (sjTREC) et du taux de lymphocytes T présentant un phénotype de *Recent Thymic Emigrant* (RTE) $CD45RA^{+}/RO^{-}CD31^{+}$ (phénotype de lymphocytes T naïfs sortant du thymus).

Les TRECs sont des fragments d'ADN extra-chromosomiques obtenus lors du réarrangement du TCR au cours de la maturation thymique des lymphocytes T**.** Ces fragments circulaires proviennent de l'épissage des exons VDJ qui garantit la diversité des TCR. Les TRECs persistent ensuite dans le noyau mais ne se répliquent pas lors des divisions cellulaires (9). A chaque division seul un lymphocyte sur 2 contient le TREC. Il est possible dans une population lymphocytaire de quantifier le nombre de TREC par RT-PCR quantitative. Une diminution de leur nombre est un reflet de l'involution thymique ainsi que du nombre de lymphocytes T émigrant du thymus (RTE). Ces deux phénomènes ont été mis en évidence de manière parallèle au cours du vieillissement (10).

B- Interactions Lymphocytes B et T

La réponse immune à une stimulation antigénique nécessite la formation des centres germinatifs. Situés dans les organes lymphoïdes secondaires, ils sont le lieu où les lymphocytes B prolifèrent et se différencient. Les lymphocytes T naïfs et mémoires centraux ont seuls, grâce à l'expression de CD62L et de CCR7, la capacité d'entrer dans les ganglions et de former les centres germinatifs (CG). Un déclin des lymphocytes T naïfs compromet la capacité de former des CG et de répondre efficacement à une stimulation antigénique (11). Ainsi une diminution de cette population naïve réduit considérablement les capacités de défense humorale de l'organisme en altérant la création des centres germinatifs.

C- Diminution de la longueur des télomères

Les cellules eucaryotes, à la différence des procaryotes, possèdent une conformation chromosomique linéaire. Pour prévenir la perte de séquences codantes et pour limiter les réarrangements chromosomiques, les chromosomes sont protégés par une partie terminale répétitive nucléoprotéique : les télomères (12). A chaque mitose, il existe une érosion de ceux-ci qui passé un certain cap, favorise l'instabilité génomique, la sénescence et l'apoptose. Les cellules du système immunitaire adaptatif nécessitent de pouvoir proliférer massivement, et pour se faire, de conserver des télomères intacts. Les lymphocytes sont capables de produire la télomérase via le gène *hTERT*. Cette enzyme de la classe des ADN polymérases, a la capacité de rallonger les séquences télomèriques et ainsi de prolonger la durée de vie de ces cellules. Lors du vieillissement, il existe une diminution progressive de cette activité enzymatique avec pour conséquence une diminution de la longueur des télomères lymphocytaires. Le stress provoqué par la stimulation antigénique, ou l'action des radicaux libres oxygénés sont des hypothèses émises pour expliquer cette attrition télomèrique lymphocytaire (12). La longueur des télomères lymphocytaires peut être quantifiée et constitue un marqueur spécifique d'immunosénescence réplicative (13).

D- Les TEMRA et le rôle du CMV

Lors du vieillissement et de la stimulation antigénique chronique, la diversité répertoire lymphocytaire T diminue, il existe une expansion de populations lymphocytaires T oligoclonales plutôt $CD8^+$. L'infection par le CMV participe à cette expansion de lymphocytes T $CD8^+$ très différenciés. Ces cellules ont le phénotype de lymphocytes T stimulés de façon chronique (notamment par les virus latents de la famille des *herpesviridae*): ce sont les T Effecteurs Mémoires Ré-exprimant le CD45RA ou TEMRA de phénotype ($CD28^-$ $CD27^-$ $CD45RA^+$ $CD57^+$). Cette expansion de lymphocytes en phase terminale de différentiation semble aujourd'hui constituer un marqueur d'immunosénescence et a été directement impliquée dans de nombreuses pathologies (cancer, auto-immunité, infections virales chroniques) (14,15).

2) Immunosénescence et insuffisance rénale chronique

Récemment, Betjes *et al* ont en partie démontré l'existence d'une immunosénescence accélérée chez des patients au stade terminal d'insuffisance rénale chronique (16). Ainsi, les auteurs rapportent entre autre une diminution du taux circulant de lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ naïfs (diminution du taux de sjTRECs notamment) (17,18) et un raccourcissement de la longueur des télomères dans les PBMCs (évaluée par FISH) (10). Une des hypothèses serait que chez ces patients, les cellules souches hématopoïétiques s'orienteraient plus favorablement vers un phénotype myéloïde plutôt que lymphoïde. Ce phénomène serait du à des modifications épigénétiques secondaires à l'action des toxines urémiques et expliquerait la diminution des lymphocytes naïfs dans cette population (16). De plus, parmi ces patients, le CMV aurait un rôle central dans l'augmentation homéostatique des TEMRA (19). Les malades au stade terminal d'insuffisance rénal auraient un vieillissement accéléré de leur système immunitaire (de l'ordre de 20 ans) (16). Ce phénotype de vieillissement du système immunitaire ne serait pas réversible après transplantation rénale (20). L'ensemble de ces résultats nécessitent cependant confirmation avec de nouvelles évaluations précises sur de plus grandes cohortes. A ce jour, les mécanismes de la sénescence du système immunitaire aux stades intermédiaires d'insuffisance rénale restent inconnus.

3) La protéine Klotho

A- Fonction

Klotho est désormais reconnue comme une protéine ayant des propriétés dite « antivieillissement ». Les animaux surexprimant cette protéine ont une durée de vie allongée. A l'inverse, un déficit de l'expression du gène *Klotho* chez les souris entraîne un vieillissement accéléré, des pathologies associées à l'âge tels que les maladies cardiovasculaires ou le déclin cognitif (21,22). Chez l'homme, la protéine Klotho serait présente sous 3 formes distinctes, ayant chacune des conformations et des fonctions différentes.

La forme membranaire a une distribution tissulaire limitée et est très majoritairement exprimée dans les tubes contournés distaux rénaux, dans les glandes parathyroïdes ainsi que dans les plexus choroïdes cérébraux. Il s'agit d'une protéine de 130 kDa avec une courte partie carboxyterminale intracellulaire et une partie extracellulaire aminoterminale plus longue composée de 2 régions

homologues KL1 et KL2 (23). Cette protéine se lie au FGF (Fibroblast Growth Factor) 23 circulant et augmente son affinité pour son récepteur. Le FGF 23 est une protéine circulante (synthétisée par les ostéocytes et les ostéoblastes) qui se fixe à un récepteur membranaire le FGFR (24). Ce complexe Klotho-FGFR possède un rôle hypophosphatémiant. Ainsi, au niveau rénal, ce complexe inhibe l'expression de Npt2a et Npt2c (2 transporteurs favorisant la réabsorption tubulaire de phosphore), inhibe le gène Cyp27b1 (code pour la α-1-hydroxylase, l'enzyme de conversion du 25hydroxycholécalciférol en calcitriol : inhibe ainsi la synthèse de calcitriol), active l'expression de Cyp24 (code pour la 24-hydroxylase : enzyme qui inactive le calcitriol) et favorise la réabsorption de calcium en stimulant le canal TRPV5 (23,25). Au niveau des glandes parathyroïdes, ce complexe favorise la baisse de sécrétion de la PTH (23).

La seconde forme de la protéine Klotho, est la forme sécrétée. Cette forme soluble existe sous deux isotypes différents. Le premier isotype (contenant les sous-unités KL1 et KL2) correspondrait a une forme membranaire clivée (110 kDa). Le second isotype, directement sécrété, serait le produit d'un épissage alternatif de *Klotho* (60 kDa) (23). Alors que le complexe Klotho-FGFR possède une forte affinité pour le FGF23, ce n'est pas le cas pour le Klotho soluble, ce qui suppose un rôle indépendant de l'axe FGF23 (23). Les formes sécrétées de la protéine Klotho présenteraient des actions pléiotrope. Tout d'abord, cette protéine soluble participerait à l'inhibition de nombreux facteurs de croissance, de cytokines et de voies de signalisations tel que l'axe Insuline / IGF1, Wnt, Transforming Growth Factor-β et Interféron γ (23,26–28). L'activation de ces différentes voies favorise un état pro-inflammatoire associé à une sénescence accélérée. Ensuite, cette protéine soluble possèderait un rôle propre sur le métabolisme phospo-calcique indépendant du FGF23 via une activité β-glucuronidase. Cette activité réduit l'expression de canaux au phosphore rénaux (NaPi-IIa) et intestinaux (NaPi-IIb) (23).

La troisième et dernière forme décrite de la protéine Klotho (60 kDa) est une forme cytoplasmique, non sécrétée avec une distribution intracellulaire préférentielle au pourtour de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique (26,27,29). Le rôle métabolique de cette dernière forme reste encore très peu étudié. Une hyper-expression de cytokines pro-inflammatoire telles que les interleukines (IL) 6 et IL8 est associé à une sénescence accélérée. La sécrétion de ces cytokines est sous la dépendance du gène *retinoic-acid-inducible gene-I* (RIG-I) (30). En 2013, Liu a montré que le Klotho intracellulaire empêcherait la multimérisation de RIG-I et favoriserait ainsi son inhibition (30).

B- Klotho et Immunosénescence

Récemment, il a été mis en évidence dans deux études, que la forme cytoplasmique de la protéine Klotho était présente au sein des lymphocytes T $CD4^+$ (sans forme membranaire associée) (29,31). Parmi 15 patients indemnes de maladie chronique, l'expression du transcrit (PCR quantitative relative) et de la protéine Klotho diminuait avec le vieillissement. Le nombre de transcrits de *Klotho* était parallèle au taux d'expression du CD28 membranaire. Ainsi, les auteurs faisaient une corrélation entre la diminution du Klotho intracellulaire et l'augmentation du nombre de TEMRA. De plus, chez ces patients, la diminution de Klotho intracellulaire était statistiquement associée à une baisse de l'activité β-glucuronidase. Ces constatations ont aussi été mises en évidence dans un modèle d'immunosénescence accélérée que sont les patients souffrant de polyarthrite rhumatoïde, une maladie avec un état inflammatoire chronique (29,31). Ces deux travaux permettaient de supposer que la transcription du gène Klotho dans les lymphocytes T $CD4^+$ humain serait un marqueur d'immunosénescence. Ces résultats nécessitent d'être confirmés sur des cohortes indépendantes aux effectifs plus importants.

C- Klotho et insuffisance rénale chronique

L'expression dans les cellules tubulaires rénales et l'activité transmembranaire de la protéine Klotho diminuent conjointement à la progression de la maladie rénale chronique. La destruction progressive du parenchyme rénal induit une diminution de son expression, ce qui conduit en partie au phénotype observé d'hyperparathyroïdie secondaire, d'hypocalcémie et d'hyperphosphorémie (25). Le dosage de la forme soluble extracellulaire semble discordant d'une étude à l'autre. Certains résultats d'études en font un marqueur stable d'insuffisance rénale chronique alors que dans d'autres, il n'existe aucune corrélation entre le taux de protéine Klotho et le degré d'insuffisance rénale (32,33).

A ce jour, la modulation de l'expression lymphocytaire T des transcrits de *Klotho* en fonction du stade d'insuffisance rénale n'a jamais été évaluée.

4) Objectifs principaux et secondaires

L'objectif principal de ce travail était d'évaluer l'expression des ARNm de *Klotho* au niveau des PBMCs à différents stades d'insuffisance rénale chronique. Une diminution de cette expression était attendue chez les patients urémiques. L'objectif était de confirmer que la diminution de l'expression des ARNm du gène *Klotho* est un marqueur d'immunosénescence dans une population indemne d'insuffisance rénale, puis de tester l'hypothèse d'une immunosénescence accélérée chez les patients insuffisants rénaux chroniques. Dans un premier temps, des dosages témoins, connus comme marqueurs d'immunosénescence ont été mesurés sur ces PBMCs : la quantification des sjTRECs, des RTE $CD4^+$, des TEMRA $CD8^+$ et la longueur relative des télomères. Nous avons ensuite comparé ces marqueurs à l'expression des transcrits du gène *Klotho* au sein des PBMCs. Les objectifs secondaires étaient de mettre en évidence une diminution de la protéine Klotho intra-cytoplasmique et d'évaluer la variation des transcrits après contact avec des toxines urémiques.

III- Matériel et Méthodes

1) Schéma d'étude

Il s'agissait d'une étude prospective uni-centrique (Centre Hospitalo-Universitaire de Besançon, service du Professeur Ducloux) observationnelle et transversale qui étudie le vieillissement du système immunitaire en milieu urémique.

2) Population de l'étude

L'échantillon était constitué de patients recrutés dans le centre investigateur (Besançon), répartis en trois groupes. La période d'inclusion allait du 11 septembre 2013 au 11 mars 2016.

Critères d'inclusion/exclusion

Les patients étaient répartis en 3 groupes selon la sévérité de l'atteinte rénale et les modalités de suppléance, le groupe 3 étant constitué de 2 sous-groupes, selon leur modalité de dialyse.

a. Critères d'inclusion

<u>- Pour tous les patients :</u>

- Patients de plus de 18 ans
- Patients capables de comprendre les modalités de l'étude
- Patients ayant donné leur accord éclairé et signé un formulaire de consentement à la participation au projet, et acceptant des prélèvements biologiques à des fins scientifiques expérimentales.

<u>- Pour le groupe 1 « Groupe témoin non urémique» :</u>

- Le groupe témoin était recruté lors d'une consultation dans les services de Néphrologie du CHU de Besançon
- Patients avec un débit de filtration glomérulaire supérieur à 60 ml/mn/1,73m^2 estimé avec la formule MDRD ou créatininémie <120 µmol/l.

<u>- Pour le groupe 2 « Insuffisance rénale chronique sévère » :</u>

- Patients ayant une insuffisance rénale chronique stade 4 (débit de filtration glomérulaire entre 30 et 15 ml/mn/1,73 m^2 estimé avec la formule MDRD).

- Pour le groupe 3DP « Dialyse péritonéale » :
    - Patients traités par dialyse péritonéale depuis plus de 3 mois.
- Pour le groupe 3HD « Hémodialyse » :
    - Patients en hémodialyse intermittente depuis plus de 3 mois.

b. Critères d'exclusion

- Femme en cours de grossesse
- Patients sans assurance santé
- Troubles cognitifs ou psychiatriques jugés par l'investigateur comme incompatibles avec un consentement éclairé
- Tout antécédent de traitement immunosuppresseur (sauf corticothérapie jusqu'à 5 mg/jour)
- Antécédent de néoplasie ou d'hémopathie maligne (sauf traitement par chirurgie uniquement ayant une période de rémission inférieure à 5 ans)
- Sepsis ayant nécessité une hospitalisation au cours des trois derniers mois
- Signes d'infection évolutive lors de la visite d'inclusion
- Infection active par le virus de l'hépatite B avec Ag HbS positif, infection par le virus de l'hépatite C ou par le VIH
- Pour les patients en épuration extra rénale : patient ayant été traité par les 2 techniques de dialyse dans les 6 derniers mois.

3) Recueils Biologiques

A- Cellules mononucléées circulantes (PBMC)

Pour chaque patient inclut, 4 tubes de sang (7 mL) sur EDTA étaient prélevés. Les PBMCs étaient séparés par gradient Ficoll (U-17 EuroBio) et conservés en culot sec à -80 °C jusqu'à utilisation. Une autre équipe (plateforme de BioMonitoring) mesurait la différenciation lymphocytaire en cytométrie de flux.

B- Echantillons de tissu rénal sain

Chez 9 patients lors d'une néphrectomie totale pour cancer rénal, un échantillon cortico-médullaire de rein sain (à distance de la tumeur) était prélevé dans le service d'anatomopathologie de Besançon et conservé dans l'azote liquide (-196 °C) jusqu'à utilisation.

C- Sérums de patients hémodialysés

Le sérum de 5 patients hémodialysés a été récupéré en début de séance d'épuration extra rénale. Pour chaque patient, 2 tubes secs de 7 ml étaient prélevés. Après coagulation et formation d'un caillot sanguin les tubes étaient centrifugés 10 minutes à 1000 *g* à température ambiante. Le surnageant était ensuite récolté. Tous les sérums étaient mélangés pour minorer les variations interindividuelles. Ce pool était aliquoté et stocké à -20 °C.

4) Culture Cellulaire

Des PBMCs de sujets témoins non urémiques ont été cultivées 72 h en milieu RPMI 1640 (référence 11875-093, Life technologies) avec 1% d'Ampicilline (10,00 UI/ml) et de Streptomycine (10,000 µg/ml) (référence : 16140-122, Gibco) à 37 °C dans des plaques 24 puits sans coating avec, soit 10 % de sérum humain de patients sans insuffisance rénale, soit 10 % de sérum de patients hémodialysés. Chaque puits contenait 1 million de cellules. Le recueil pour analyse consistait en 8 millions de cellules minimum, soit 8 à 12 puits.

5) Biologie Moléculaire

A- Extraction d'ADN

L'ensemble des ADN était extrait à l'aide d'un réactif commercial (QIAMP DNA Blood Mini Kit référence 51106, Qiagen). Cette extraction des ADN totaux est basée sur le principe de fixation de l'ADN sur une membrane de silicate. Après lyse des membranes cellulaires et élimination des

contaminants par lavages successifs, les ADN étaient élués dans 30 µl de tampon adéquat fourni dans le réactif. Les ADN étaient conservés jusqu'à utilisation à 4 °C.

B- Extraction d'ARNm et synthèse d'ADNc

Les ARN étudiés étaient extraits à l'aide de réactifs RNEASY Mini Kit (référence : 74106 Qiagen). De la même manière que pour l'ADN, le principe correspond à une fixation de l'ARN à une membrane à base de gel de silice. Tout d'abord, les échantillons étaient lysés puis homogénéisés dans un tampon contenant de l'isothiocyanate de guanidium. Les ARN étaient fixés par adsorption sur la membrane (colonne RNeasy) à l'aide d'ajout d'éthanol. Les ARN étaient ensuite purifiés par lavages successifs et par action de la DNase I (référence 79254 Qiagen). Pour finir ils étaient élués avec de l'eau distillée stérile. Les échantillons étaient congelés à -80 °C jusqu'à utilisation.

Pour la synthèse de l'ADNc complémentaire de l'ARN, le mélange réactionnel (20 µl) comprenait pour chaque échantillon : 10 µl de tampon 2X, 1 µl d'enzyme (référence 4387406 Applied Biosystems) et 9 µl d'ARNm. Le mélange réactionnel était ensuite mis dans des micro-tubes prévus à cet effet. Le programme d'hybridation était successivement de 60 minutes à 37 °C et de 5 minutes à 95 °C. Les échantillons d'ADNc étaient stockés à 4 °C jusqu'à utilisation.

C- Réactions de PCR

Les réactions de PCR étaient réalisées dans des plaques 96 puits prévues à cet effet. Les échantillons et les gammes d'étalonnage étaient testés en double et pour chaque plaque il existait 2 contrôles négatifs (eau à la place de l'ADN ou de l'ADNc). Les PCR qualitatives étaient amplifiées avec à l'aide du thermocycleur Gene Amp PCR system 2700 (Applied Biosystems). Les RT-PCR quantitative étaient amplifiées à l'aide du thermocycleur CFX96 Real Time System (Bio-Rad), et les résultats calculés à l'aide du logiciel Bio-Rad CFX Manager.

D- Quantification de l'ARNm du gène *Klotho* par RT-PCR quantitative absolue

a. Principe

De manière inédite, une PCR quantitative absolue a été mise au point. L'amplification des ARNm du gène *Klotho* a été réalisée à l'aide d'un réactif commercial (« assay on demand » quantitative PCR assay Hs00183100_m1, Life Technologies), qui amplifie 74 paires de bases dans la partie interne du gène (3036 nucléotides au total) (34). Ce mélange réactionnel comprenait les amorces du gène *Klotho* et une sonde TaqMan spécifique. Le principe de la sonde Taqman repose sur l'activité exonucléasique 5'3' de la Taq polymérase. Lors de l'amplification, la Taq polymérase dégrade la sonde préalablement fixée à l'ADN de l'échantillon, et libère ainsi un fluorophore. Cette sonde se fixe de manière spécifique à chaque cycle aux produits de PCR amplifiés ; la fluorescence émise est le reflet de leur accumulation. Le thermocycleur évaluait cette fluorescence à la fin de chaque cycle.

b. Gamme étalon

Dans un premier temps, une gamme étalon a été mise au point. De l'ADNc extrait de PBMCs d'un sujet sain était amplifié par PCR avec une DNA-polymérase possédant l'activité TA cloning (capacité de rajouter une base adénine en fin de produit d'amplification). Le mélange réactionnel pour chaque échantillon comprenait : 2 µl du mélange de sondes présent dans le réactif fourni par Life Technologies, 2 µl de cDNA de l'échantillon, 10 µl de tampon (5X, MyTaq Bioline), 0,25 µl de Taq polymérase (Taq MyTaq 5UI/µl, Bioline) et 38,75 µl d'eau pour un volume total de 50 µl. Le programme d'amplification était de 5 minutes à 94 °C suivi de 39 cycles de 45 secondes à 94 °C, 1 minute à 55 °C et 1 minute à 72 °C. A la fin des cycles, le mélange était incubé 5 minutes à 72 °C, puis conservé à 4 °C. Les produits d'amplification obtenus étaient purifiés selon le protocole du réactif commercial utilisé (Nucleic Acid Purification Kit, référence 740523.250 Thermo Fisher Scientific).

L'étape suivante consistait à amplifier cet ADN. Dans cette optique, l'ADN était inclus dans un plasmide. Le mélange réactionnel (10 µl) comprenait: 2 µl de tampon de ligation, 1 µl de plasmide pGEM T, 3 µl de produit de PCR, 1µl de DNA ligase et 3 µl d'eau (pGEM-T easy vector Systems, Promega). Le mélange était déposé sur une colonie de bactéries *E. Coli* JM 105. Après une incubation d'une heure dans de la glace pilée, les plasmides étaient incorporés dans les bactéries à l'aide d'un choc thermique de 1 min 45 s à 42 °C, suivi d'une mise en culture à 37 °C (sans antibiotique) pendant 24 h. La colonie était ensuite sélectionnée, par reconnaissance de son gène de sélection, qui induisait une coloration blanche. Après 24 h de culture avec ampicilline, 500 µl du mélange réactionnel étaient prélevés pour culture dans 200 ml de milieu avec ampicilline dans les

mêmes conditions. Les plasmides étaient ensuite extraits selon le protocole d'un réactif commercial (référence 740410.60, NucleoBond Xtra Midi). Ainsi, les cellules étaient lysées, l'ADN du plasmide purifié par chromatographie, puis précipité. Plusieurs étapes de lavages de colonne à 4 °C à 3000 *g* étaient effectuées. Le produit obtenu était séquencé pour vérifier que l'ADN amplifié correspondait bien à l'ADNc du gène *Klotho* (Figure 1). Pour finir, le produit d'amplification était dilué pour obtenir différentes concentrations afin d'établir la gamme étalon (Figure 2).

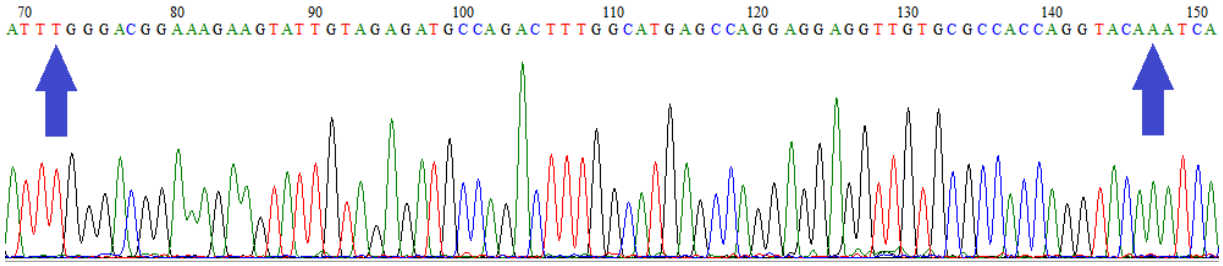

Figure 1 : ***Séquençage du gène Klotho transfecté et amplifié dans les plasmides*** *: Séquence incluse dans les plasmides qui correspondait aux 76 pdb de l'amplicon Klotho (entre les deux flèches), après séquençage par technique Sanger (3130 genetic analyzer AB).*

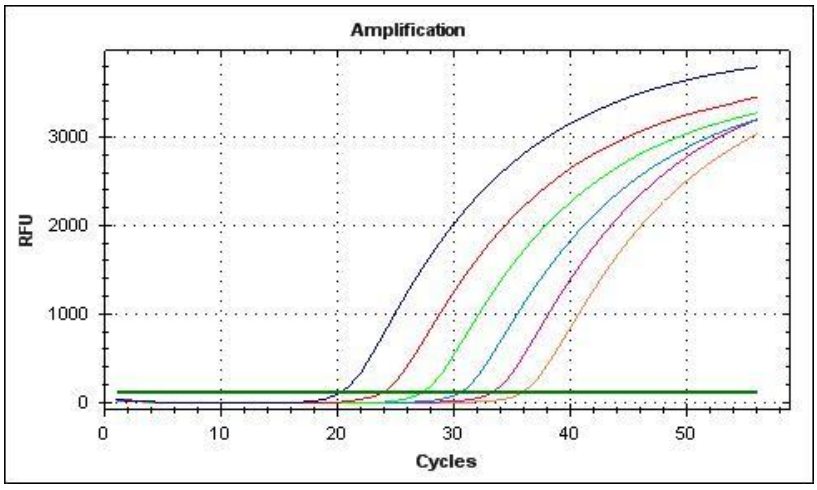

Figure 2: ***Gamme étalon du gène Klotho*** *: Produits d'amplification par RT-PCR de la gamme étalon du gène Klotho de 10^5 à 10 copies de gauche (courbe noire) à droite (courbe rose pâle) analysées par le logiciel Bio Rad Fx Manager*

c. Protocole pour la RT-PCR quantitative absolue

Pour quantifier les transcrits de *Klotho*, le mélange réactionnel (20 µl) était le suivant : 1 µl du réactif « assay on demand », 10 µl de tampon TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (référence : 4304437, Applied Biosystems), 5 µl d'ADNc d'un point de la gamme ou d'échantillon et 4 µl d'eau distillée. Le programme d'amplification est décrit dans le Tableau A. La *GAPDH* a été utilisée comme gène de ménage, car son expression est reconnue comme stable au sein des ARNm de PBMCs (35). Des dilutions de plasmides ont été utilisées pour établir la gamme étalon. Le mélange réactionnel (20µl) pour l'amplification de l'ADNc de *GAPDH* était de : 10 µl de tampon Quantitect Probe Master Mix (référence 204343, Qiagen), 5 µl d'ADNc d'un point de la gamme ou d'échantillon, 1 µl de chaque amorce sens et anti-sens (Tableau B), 0,5 µl de sonde Taqman (à la concentration de 10 pmol/µl) et 2,5 µl d'eau distillée. Le gène de ménage permettait de rapporter le taux d'expression des transcrits du gène *Klotho* à 150 000 PBMC.

Tableau A : ***Programme d'amplification de Klotho et GAPDH réalisé par le thermocycleur CFX96 Real Time System***

	Durée	**Température**	**Cycles**
Pré dénaturation	2 min	50 °C	
Dénaturation	8 min	95 °C	
Amplification : Dénaturation Hybridation	 15 s 1 min	 95 °C 60 °C	50 cycles
Refroidissement		15 °C	

E- Quantification de la longueur relative des Télomères par RT-PCR Multiplex quantitative

a. Principe

Nous avons mis au point une technique de PCR multiplex inspirée de celle décrite par Cawthon en 2009 (13). Le principe reposait sur la collecte de 2 signaux d'amplicons différents au sein d'une même réaction de PCR. Dans ce cas précis, les 2 gènes sont ceux du télomère et celui de

l'albumine. Le recueil séparé des 2 seuils d'amplification (Ct) était possible car la fluorescence émise par le Sybr Green du gène le plus abondant (le télomère) se produisait précocement alors que le gène plus faiblement exprimé (l'albumine) était encore en dessous de son seuil d'amplification (Figure 3). Les seuils d'amplification de l'albumine étaient enregistrés à des températures très supérieures à la température de fusion du premier amplicon (le télomère). Ainsi le premier amplicon se retrouvait en conformation simple brin, ce qui annulait son signal. Les amorces étaient construites de manière à ce que les amplicons soient de petites tailles, et à ce que le second (l'albumine) se termine par des séquences GC afin d'augmenter sa température de fusion.

Les amorces pour l'amplicon du télomère étaient ACA CTA AGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTT GGG TTA GTG T pour « telg » et TGT TAG GTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA TCC CTA ACA pour « telc ». L'amplicon était de taille fixe car seul telg est capable de se fixer à l'ADN télomèrique natif. Telc est capable de se fixer à de nombreuses localisations des produits d'amplification de telg, mais seulement une seule configuration permet l'amorçage de la synthèse d'ADN. L'amplicon ainsi obtenu était de longueur fixe. Ceci est possible car Telc est dans l'incapacité de s'hybrider avec l'ADN natif du fait d'un mismatch au niveau de son extrémité 3'. Cependant, cette zone est parfaitement complémentaire de la zone 3' de telg. Les amorces pour le gène de ménage albumine étaient « albu »: CGG CGG CGG GCG GCG CGG GCT GGGCGG AAA TGC TGC ACA GAA TCC TTG et « albd »: GCC CGG CCC GCC GCG CCC GTC CCG CCG GAA AAG CAT GGT CGC CTG T. Le produit d'amplification avait une longueur attendue de 98 pb.

b. Protocole

Une gamme étalon de 4 points issue d'un pool d'ADN de donneurs était utilisée pour cette PCR. Dans chaque puits, le mélange réactionnel était le suivant : 12,5 µl de tampon Absolute QPCR MIX (AB-1159/A Life Technologies), 2 µl de chaque amorce (1 pmol/µl), 2 µl d'ADN (échantillon à 10 ng/µl ou gamme étalon) et 2,5 µl d'eau. Le programme d'amplification était le suivant : 15 s à 94°C, 15 s à 49°C (2cycles), puis 15 s à 94°C, 10 s à 62°C, 15 s à 74 °C (avec acquisition), 10 s à 94°C, 15 s à 88°C (avec acquisition) (39 cycles) réalisation d'une courbe de fusion pour s'assurer l'absence de dimère d'amorce.

c. Interprétation

Les résultats sont exprimés en ratio T/S. Ce ratio représente la quantité relative du gène cible sur celle du gène de ménage, dans notre cas, le ratio du télomère par rapport à l'albumine. La valeur du ratio T/S oscille autour de 1. Plus la longueur des télomères est réduite, plus sa valeur est proche de

zéro. Chaque expérience était réitérée au minimum 1 fois, s'il persistait une différence d'écart type entre les T/S supérieure à 0,3, le dosage était effectué une troisième fois.

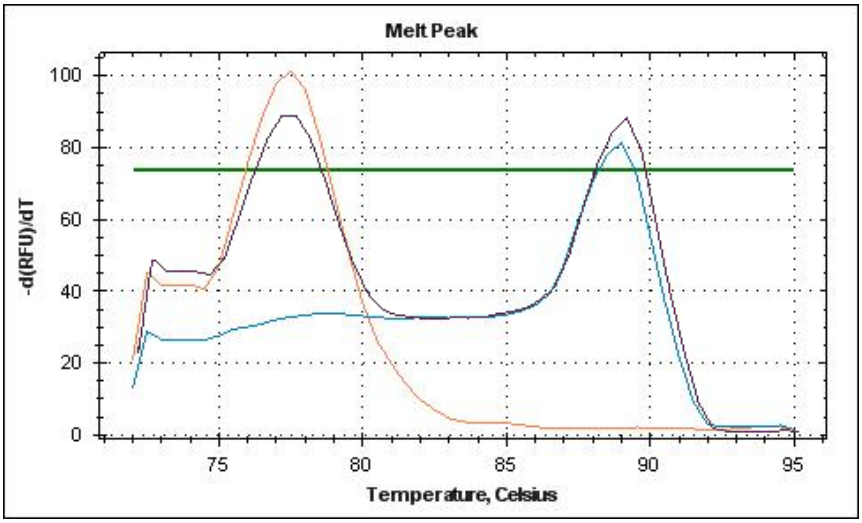

*Figure 3 :**Courbes de fusion des RT-PCR télomère et albumine** : Courbes de fusion après 39 cycles d'amplification avec 20 ng d'ADN humain associé aux sondes de télomère uniquement (courbe rose), aux sondes de l'albumine (courbe bleue) ou à leur association (courbe noire). Il existe approximativement une différence de température de fusion d'amplicons des télomères et de l'albumine de 13 °C.*

F- Dosage des sjTRECS par PCR quantitative absolue en temps réel

Une sonde TAQMAN spécifique des produits d'amplification est utilisée pour cette réaction. Pour chaque échantillon de PBMC, le mélange réactionnel comprenait : 10 µl de tampon TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (référence : 4304437, Applied Biosystems), 1 µl de chaque amorce sens et anti-sens (Tableau B), 0,5 µl de sonde Taqman (à la concentration de 10 pmol/µl) et 2,5 µl d'eau distillée. Le mélange était réparti dans les puits relatifs aux échantillons, auxquels on ajoutait 5 µl de l'ADN correspondant (concentration à 50 ng/µl). Chaque réaction était évaluée comparativement à une quantité connue d'ADN cible présent dans une gamme étalon. Des dilutions de plasmides étaient utilisées. La GAPDH était évaluée comme gène de ménage dans chaque échantillon pour quantifier le nombre de cellules par échantillon. Le mélange réactionnel était équivalent hormis le tampon qui était le Quantitect Probe Master Mix (référence 204343, Qiagen). On rapportait le nombre de TRECs à 150 000 CD3 (nombre de CD3 dans les PBMC pour chaque patient évalué séparément en cytométrie de flux par une autre équipe (données non montrées).Le programme d'amplification était identique à celui du Tableau A.

Tableau B : ***Amorces utilisées des gènes sjTRECs et GAPDH pour les réactions de PCR***

	5'-séquence-3'
Amorce TREC sense (Fw)	CAC ATC CCT TTC AAC CAT GCT
Amorce TRECs anti-sense (Rw)	GCC AGC TGC AGG GTT TAG G
Sonde Taqman TRECs	(Fam) ACA CCT CTG GTT TTT GTA AAG GTG CCC ACT (Tamra)
Amorce GAPDH sense (Fw)	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C
Amorce GAPDH anti-sense (Rw)	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC
Sonde Taqman GAPDH	(Fam) CAA GCT CCC GTT CTC AGC C (Tamra)

6) Western Blot de la protéine Klotho

A- Préparation des échantillons

Les échantillons de parenchyme rénal ont été mélangés pour obtenir suffisamment de matériel biologique, homogénéisés avec l'aide de l'appareil MP Fast Prep 24 (3 cycles de 30 s à 6,5 m/s). Les échantillons étaient homogénéisés dans un tampon comprenant du Tris 10 mmol de sucrose (886 µl), 100 µl d'antiprotéase, 2 µl d'EDTA (0,5 M), 2 µl de fluorure de sodium (0,5 M), 10 µl de Vanadate (100 mM) et 0,5 µl de dithiothréitol. Le surnageant obtenu était ensuite conservé à -80°C. Les PBMCs des patients étudiés (10 millions de PBMC par échantillon) étaient lysées dans la solution « Laemmli 1x ». La quantité totale de protéines par échantillon était quantifiée par photométrie (Eppendorf Biophotometer). La quantité de protéines totales par échantillon était ensuite standardisée par dilution.

B- Migration sur gène SDS-Page et transfert

La séparation des protéines était réalisée sur gel SDS-Page à 7,5 % selon la technique de Laemmli (36). Les protéines étaient ensuite transférées sur une membrane de PVDF, bloquées dans une solution de lait à 6 % en TBS-*Tween*. La membrane était incubée à 4°C en présence de l'anticorps monoclonal primaire, anti-Klotho (KO603, Transgenic inc) à 4 µg/ml de solution ou anti-actine (contrôle) pendant une nuit. L'anticorps secondaire anti-immunoglobulines de rat (711-

035-152 InterChim) était ensuite ajouté après plusieurs lavages et incubé 2 h à température ambiante.

C- Révélation

La révélation se faisait à l'aide d'une réaction d'oxydation grâce à la peroxydase liée à l'anticorps secondaire et au réactif de révélation (ECL Clarity^{TM} Western ECL substrate, BIORAD, ref.170-5061). Les images étaient capturées à l'aide d'une caméra CCD Vilbert Lourmet et analysées avec le logiciel Chemi Capt (BioRad, CA, USA).

7) Analyse statistique

L'analyse portait sur les critères principaux et secondaires. La distribution des variables était étudiée à l'aide du test de normalité d'Agostino et Pearson. Les données démographiques quantitatives étaient comparées avec le test ANOVA, et le test Chi 2 pour les données qualitatives. Les groupes de patients étaient comparés 2 à 2 en utilisant le test non paramétrique de Mann Whitney pour les variables quantitatives ayant une distribution non gaussienne ou le test t de Student pour les variables ayant une distribution gaussienne. La recherche de corrélation entre 2 variables quantitatives était effectuée par analyse de régression linéaire. Tous les tests statistiques étaient réalisés de manière bilatérale avec un risque alpha de 5 %. Les différentes analyses statistiques étaient réalisées à l'aide du logiciel GraphPad version 6 (Prism).

IV- Résultats

1) Caractéristiques des populations étudiées

Les données cliniques et biologiques des différents groupes sont décrites dans le Tableau C. Au total, 184 patients ont été inclus. Les patients du groupe 2 et 3 étaient significativement plus âgés que ceux du groupe 1 (p<0,0001). Afin d'homogénéiser les âges, les patients des 3 groupes étaient répartis selon la médiane d'âge cumulée des groupes 1 et 2 : soit 64,7 ans. Les patients ayant un âge inférieur à 64,7 ans étaient nommés « jeunes » et ceux supérieurs à 64,7 ans étaient nommés « âgés ». Il n'existait pas de différence significative d'âge entre les sous-groupes «jeunes» (p=0,108) et les sous-groupes «âgés» (p=0,083) entre eux ; de même pour le statut CMV (positif ou négatif) entre les sous-groupes «jeunes » (p=0,397) et « âgés » (p=0,317).

Tableau C : ***Données démographiques de la population d'étude***

Groupe	**1**	**2**	**3**		
	Témoins	**Insuffisance rénale sévère**	**Hémodialyse (HD)**	**Dialyse péritonéale (DP)**	
Nombre de patients	74	40	44	26	
Age (année)	53,6 ±17,8	71,3±14,3	68,5±13,2	70,5±15,5	**p<0,0001**
Hommes	44,6%	42,5%	70,5%	76,9%	**p=0,0018**
Durée de dialyse (mois)			68,3±205,2	23,8±20,0	
IMC (kg/m^2)	26,5±5,7	28,5±6,4	23,8±8,9	27,7±4,9	p=0,175
Diabète	17,6%	40,0%	36,4%	38,5%	**p=0,0286**
Hypertension Artérielle	59,5%	90,0%	88,6%	100%	**p<0,0001**
Tabac	12,2%	10,0%	16,7%	11,5%	**p<0,0001**
DFG (ml/min/1,73m²)	70,6±20,0	22,3±4,6			
CMV positif	57,5%	67,5%	77,3%	53,9%	**p<0,0001**
CRP (mg/l)	3,9±3,3	10,1±15,2	8,0±7,1	8,5±7,8	**p<0,0001**
Calcémie (mmol/l)	2,35±0,01	2,39±0,12	2,27±0,17	2,35±0,14	**p=0,0015**
Phosphorémie (mmol/l)	0,94±0,2	1,1±0,2	1,4±0,4	1,4±0,5	**p<0,0001**
Hémoglobine (g/dl)	13,9±1,1	12,8±1,5	11,3±1,9	11,8±1,6	**p<0,0001**
Lymphocytes (Giga/l)	2,2±0,7	1,6±0,7	1,4±0,6	1,3±0,7	**p<0,0001**
Lymphocytes CD4 (cellules/mm^3)	1069,0±444,6	775,5±346,6	652,9±289,4	754,5±521,0	**p<0,0001**
Rapport CD4/CD8	2,7±1,4	2,8±2,2	2,6±1,8	3,3±1,8	p=0,285
TEMRA CD8 (cellules/mm^3)	95,5±101,3	144,3±156,3	141,0±125,5	100,2±138,4	p=0,067
RTE T CD4 (cellules/mm^3)	255,9±170,1	116,0±71,4	84,5±79,7	105,6±117,3	**p<0,0001**

Les variables quantitatives sont exprimées en moyenne ± écart type. Les (p) sont données (p Gras : valeurs significatives en ANOVA)

2) Immunosénescence lymphocytaire T accélérée dans l'insuffisance rénale

A- Dysthymopoïèse et insuffisance rénale chronique

Le nombre de copies de sjTRECs diminuait avec l'âge dans nos 3 groupes de patients. Il existait une association significative entre le nombre de copies de sjTRECs et le vieillissement (r^2=0,36 p<0,0001 ; r^2=0,23 p=0,0017 ; r^2=0,20 p<0,0001 respectivement pour les groupes 1, 2 et 3). Cette association n'était pas significativement différente entre les groupes (p=0,899) (Figure 4A). Une association était retrouvée entre le nombre de sjTRECs et le nombre de $CD4^+$, de TEMRA $CD8^+$, de RTE $CD4^+$ (respectivement : r^2=0,05 p=0,0018 ; r^2=0,02 p=0,05 ; r^2=0,18 p<0,0001). Dans l'évaluation des sous-groupes d'âge, il n'existait aucune différence significative, quel que soit l'âge, entre les patients du groupe 1 et ceux des groupe 2 (p=0,453 pour les «jeunes» ; p=0,957 pour les «âgés» entre eux) et 3 (p=0,195 pour les «jeunes» ; p=0,317 pour les «âgés» entre eux), de même qu'entre les groupes 2 et 3 (p=0,793 pour les «jeunes» ; p=0,376 pour les «âgés» entre eux) (Figure 4B). Le nombre de sjTRECs n'était pas significativement différent entre les patients en hémodialyse ou en dialyse péritonéale (p=0,930). L'insuffisance rénale n'avait pas d'influence sur les sjTRECs.

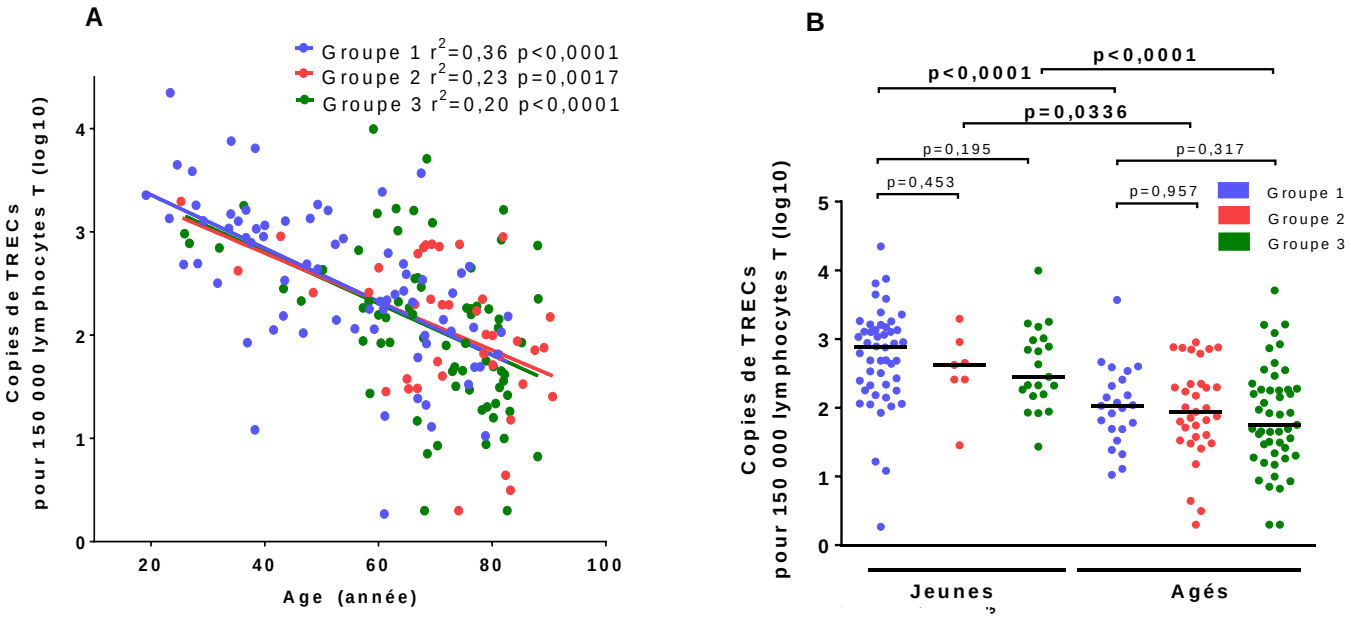

Figure 4 : ***Quantification du nombre de sjTRECS au sein des Lymphocytes T CD3 circulants****. L'évaluation se fait par RT-PCR quantitative absolue. Le nombre de TRECS normalisé (GAPDH) pour 150 000 T CD3 était exprimé en log10. Le Groupe 1 (n=74) comprenait des patients tnon urémiques, le groupe 2 (n=40) des patients ayant une insuffisance rénale sévère et le groupe 3 (n=70) des patients au stade de dialyse. (**A**)* ***Relation entre le nombre de copies de sjTRECs et l'âge. (B) Relation entre le nombre de sjTRECs et l'âge des patients selon les groupes.*** *Les patients étaient dits « jeunes» pour un âge inférieur à 64,7 ans et «âgés» » au-delà. Les «jeunes» du groupe 1 (n=49), ceux du groupes 2 (n=7), ceux du groupe 3 (n=21) étaient comparés entre eux ainsi qu'aux patients « âgés» du groupe 1 (n=23), du groupe 2 (n=33) et ceux du groupe 3 (n=49). Les barres horizontales correspondent aux médianes.*

Avec le vieillissement, les patients non urémiques avaient une diminution significative de leurs RTE $CD4^+$ (r^2=0,13 p=0,0010). Dans le groupe de patients insuffisants rénaux sévères les RTE $CD4^+$ ne variaient pas en fonction de l'âge (r^2=0,00 p=0,668), à la différence des patients dialysés (r^2=0,25 p<0,0001). Les patients non urémiques avaient significativement plus de RTE $CD4^+$ que les patients dialysés (p=0,0366) (Figure 5). Les patients insuffisants rénaux avaient une diminution plus précoce de leurs RTE.

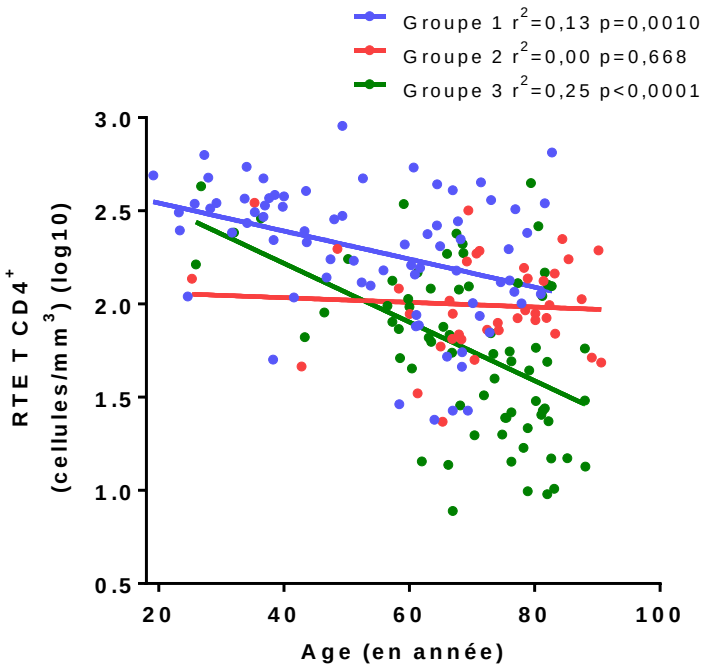

Figure 5: ***Relation entre le nombre de RTE $CD4^+$ et l'âge patients.*** *Le Groupe 1 (n=74) comprenait des patients non urémiques, le groupe 2 (n=40) des patients ayant une insuffisance rénale sévère et le groupe 3 (n=70) des patients au stade de dialyse. Evaluation faite en cytométrie de flux.*

B- Expansion des TEMRA $CD8^+$

Les patients non urémiques augmentaient significativement leurs TEMRA $CD8^+$ lors du vieillissement (patients séropositifs pour le CMV) (r^2=0,15 p=0,0093). Les TEMRA $CD8^+$ des groupes insuffisants rénaux sévères et dialysés ne variaient pas en fonction de l'âge (respectivement r^2=0,00 p=0,888 et r^2=0,03 p=0,289). Le nombre de TEMRA n'était pas significativement différent entre les patients en hémodialyse ou en dialyse péritonéale (p=0,660). L'insuffisance rénale s'accompagnait d'un nombre de TEMRA augmenté de manière précoce, les sujets jeunes avaient un nombre équivalent à ceux des patients âgés (contrairement aux patients non urémiques).

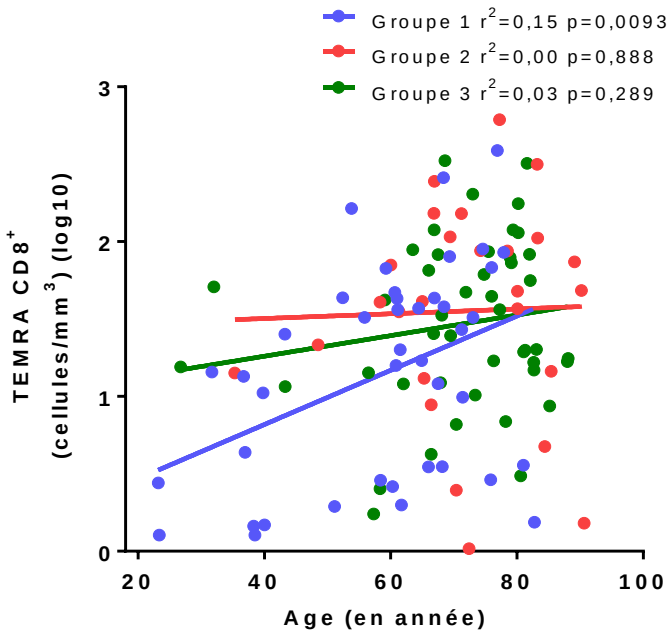

Figure 6 : ***Relation entre le nombre de TEMRA CD8⁺ et l'âge patients****. Le groupe 1 comprenait 42 patients, le groupe 2 comprenait 26 patients et 45 patients dans le groupe 3. Les différences statistiques (p) entre les groupes sont données. Evaluation faite en cytométrie de flux.*

C- Attrition télomèrique précoce chez les patients insuffisants rénaux chroniques

L'évaluation de la longueur relative des télomères (ratio T/S) en RT-PCR multiplex était reproductible avec un écart moyen entre 2 dosages pour le même patient de 0,08 et un coefficient de variation de 0,08. Il existait une association entre le ratio T/S et les TRECs (Figure 7), le nombre de $CD4^+$, et de RTE $CD4^+$ (r^2=0,03 p=0,0263 ; r^2=0,07 p=0,0002 ; r^2=0,07 p=0,05 respectivement) mais n'était pas retrouvée avec les TEMRA $CD8^+$ (r^2=0,00 p=0,516). Le ratio T/S était significativement diminué lors du vieillissement dans les groupes 1, et 3 (r^2=0,15, p=0,0006 ; r^2=0,02, p=0,0201 respectivement). Le ratio T/S n'était pas corrélé à l'âge au sein du groupe 2 (r^2=0,06, p=0,130). L'attrition des télomères semblait accélérée de 20 à 30 ans chez les patients insuffisants rénaux chroniques et dialysées par rapport aux patients non urémiques (p=0,0243) (Figure 8A). La longueur relative des télomères d'un « jeune » patient dialysé n'était pas significativement différente d'un patient « âgé » non urémique (p=0,759). Les patients « âgés » des groupes 2 et 3 avaient un ratio T/S significativement plus faible que ceux « âgés » du groupe 1 (p respectivement de 0,0026 et 0,0340) (Figure 8B). Cette différence entre ces groupes n'était pas

retrouvée chez les patients « jeunes » (p respectivement de 0,104 et 0,228). Aucune différence significative des T/S n'était constatée entre les groupes 2 et 3 parmi les patients «jeunes» et « âgés » entre eux (p respectivement de 0,243 et 0,091). Le ratio T/S n'était pas significativement différent entre les patients en hémodialyse ou en dialyse péritonéale (p=0,185). En analyse univariée, il existait une immunosénescence réplicative plus marquée chez les patients souffrants d'insuffisance rénale sévère et terminale.

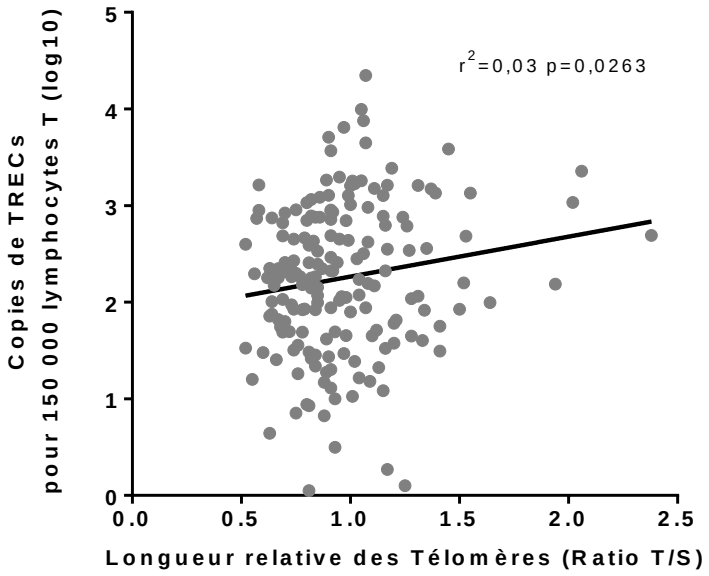

Figure 7: ***Corrélation entre le nombre de copies de sjTRECs et le la longueur relative des télomères appréciée par le ratio T/S.*** *Le nombre de TRECS normalisé (GAPDH) pour 150 000 T CD3$^+$était exprimé en log10. Le ratio T/S reflétait la longueur des télomères rapportée au gène de ménage albumine (mesurés en RT-PCR multiplex quantitative dans les PBMCs) (n=184).*

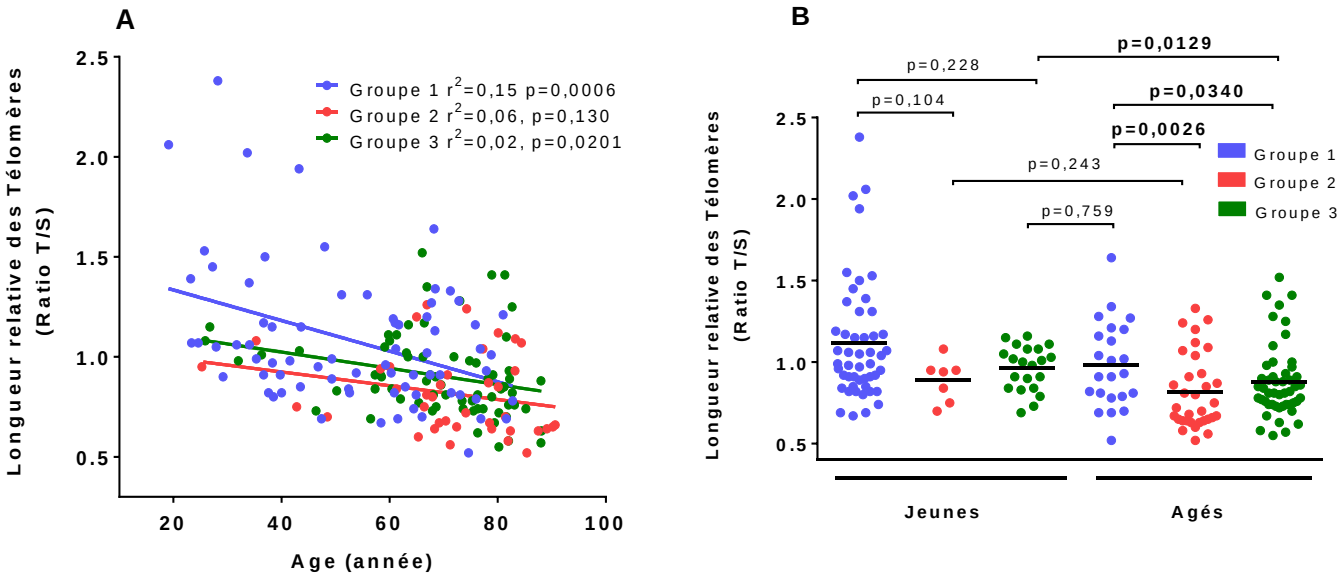

Figure 8: ***Détermination de la longueur relative des télomères appréciée par le ratio T/S dans les PBMCs****. Quantification par RT-PCR multiplex de la longueur relative des télomères et de l'expression du gène de l'albumine. Le Groupe 1 (n=74) comprenait des patients non urémiques, le groupe 2 (n=40) des patients ayant une insuffisance rénale sévère et le groupe 3 (n=70) des patients au stade de dialyse.* ***(A) Relation entre l'âge et le rapport T/S. (B) Comparaisons des rapports T/S selon les groupes d'âges et d'insuffisance rénale.*** *Les patients étaient dits « jeunes» pour un âge inférieur à 64,7 ans et «âgés» » au-delà. Les «jeunes» du groupe 1 (n=49), ceux du groupes 2 (n=7), ceux du groupe 3 (n=21) étaient comparés entre eux ainsi qu'aux patients « âgés» du groupe 1(n=23), du groupe 2 (n=33) et ceux du groupe 3 (n=49). Les barres horizontales correspondent aux médianes. Les différences statistiques (p) entre les groupes sont données.*

3) Hyper-expression des transcrits du gène *Klotho* lymphocytaire dans l'insuffisance rénale

Le nombre de transcrits lymphocytaires du gène *Klotho* était faible, notamment chez les sujets non urémiques, mais la presque totalité de la cohorte conservait une expression supérieure à celle du contrôle négatif (excepté dix sujets). Lorsque l'on pondérait le gène de ménage *GAPDH* au pourcentage de lymphocytes T CD3, il existait une corrélation positive significative entre le nombre de copies d'ARNm de *Klotho* pour 150 000 PBMCs avec ce même ARNm exprimé pour 150 000 lymphocytes T $CD3^+$ (r^2=0,99, p<0,0001) (en log10) (Figure 9A). La quantité de transcrits du gène *Klotho* dans les PBMCs reflétait bien l'expression des transcrit de Klotho dans les lymphocytes T $CD3^+$. En régression linéaire, l'expression du gène *Klotho* était indépendante de l'âge dans les différents groupes (r^2=0,00 et p=0,776 dans le groupe 1 ; r^2=0,01 et p=0,414 dans le 2, r^2=0,00 p=0,483 dans le groupe 3) (Figure 9B).

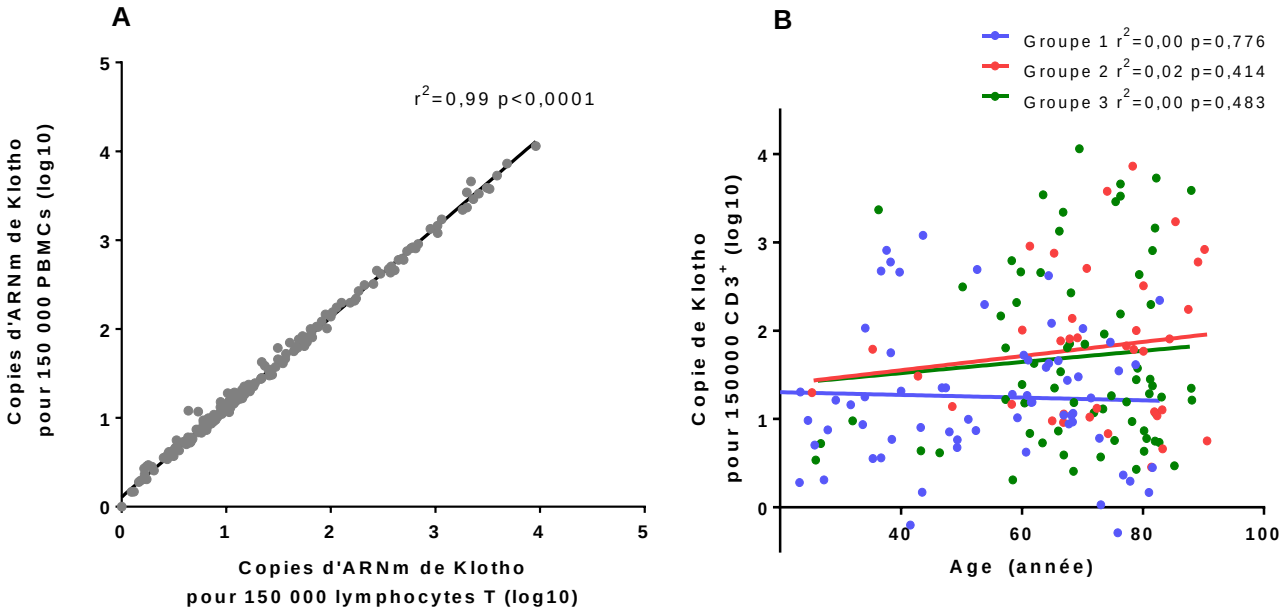

Figure 9: ***Evaluation du nombre de copies des ARNm du gène Klotho par RT-PCR quantitative absolue.*** *Le nombre d'ARNm de Klotho était rapporté à l'expression de la GAPDH. Le Groupe 1 (n=74) comprenait des patients non urémiques, le groupe 2 (n=40) des patients ayant une insuffisance rénale sévère et le groupe 3 (n=70) des patients au stade de dialyse.* ***(A) Expression du nombre de copies en log 10 des transcrits de Klotho au sein des PBMCs par rapport au nombre de copies pour 150000 lymphocytes T. (B) Expression en log10 du nombre de copies des transcrits de Klotho dans les lymphocytes T en fonction de l'âge.***

Aucune association n'était retrouvée entre la quantité de transcrits du gène *Klotho* et le nombre de sjTRECs (Figure 10A), de $CD4^+$, et de TEMRA $CD8^+$ (r^2=0,00 ; p=0,895 ; r^2=0,01 p=0,07 ; r^2=0,00 p=0,543 respectivement). Cependant, le nombre de transcrits de *Klotho* était associée à la variation de la longueur relative des télomères (appréciée par le ratio T/S) (r^2=0,08 ; p<0,0001) (Figure 10B), de même qu'au nombre de RTE $CD4^+$ (r^2=0,02 p=0,0393). L'ARNm de *Klotho* était significativement plus élevé chez les insuffisants rénaux chroniques sévères (p=0,0007) et chez les patients dialysés (p=0,0005) comparativement au groupe 1 de patients non urémiques. Aucune différence significative d'expression de *Klotho* entre les groupes 2 et 3 (p=0,614) n'était retrouvée (Figure 10C). L'expression de *Klotho* n'était pas significativement différente entre les patients en hémodialyse ou en dialyse péritonéale (p=0,900). En régression linéaire, l'augmentation de la quantité d'ARNm de *Klotho* était associée négativement à la clairance de la créatinine (analyse associant les groupes 1 et 2 : r^2=0,06 ; p=0,0086) (figure 10D), positivement à la phosphorémie (r^2=0,03 ; p=0,0458) (Figure 11A), négativement à la calcémie (r^2=0,03 ; p=0,0215) (Figure 11B). Aucune association n'était retrouvée avec les valeurs de CRP (r^2=0,00 ; p=0,585), PTH (r^2=0,00 ; p=0,557) et de 25-OH D3 circulantes (r^2=0,00 ; p=0,457). D'après l'ensemble de ces résultats, l'expression de *Klotho* en transcrits dans les lymphocytes T, ne serait pas corrélée à l'âge, mais aux nombre des RTE $CD4^+$, à la longueur des télomères des PBMCs et à l'insuffisance rénale.

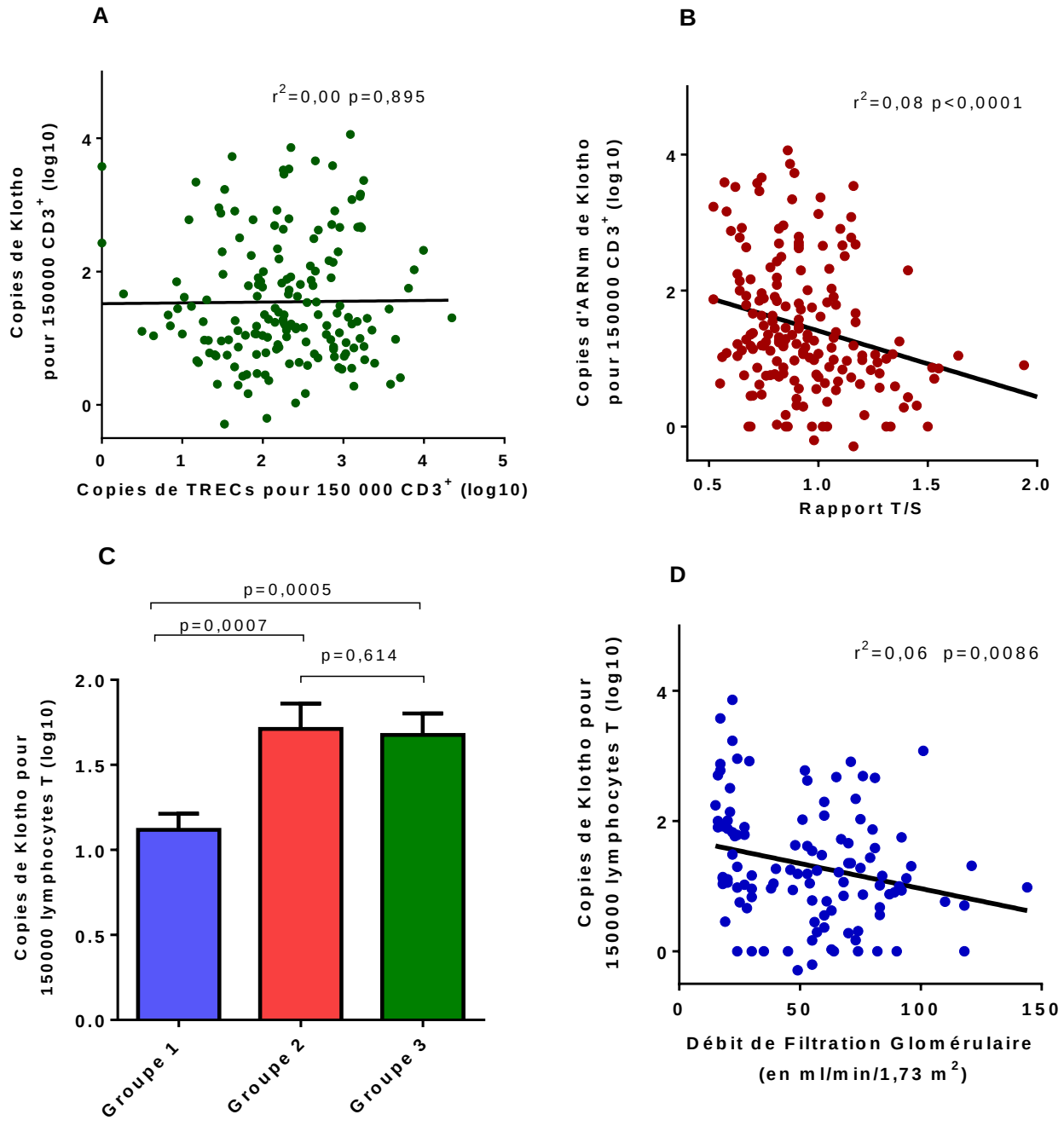

Figure 10: ***Expression des transcrits ARNm du gène Klotho dans les lymphocytes T évaluée par RT-PCR quantitative absolue en fonction de marqueurs d'immunosénescence ou d'insuffisance rénale.*** *L'expression des transcrits était rapportée à l'expression de la GAPDH et exprimée en logarithme 10 pour 150 000 CD3. Le Groupe 1 (n=74) comprenait des patients non urémiques, le groupe 2 (n=40) des patients ayant une insuffisance rénale sévère et le groupe 3 (n=70) des patients au stade de dialyse. (**A**)* ***Expression du nombre de copies de transcrits ARNm de Klotho au sein des lymphocytes T en fonction du nombre de copies de sjTRECs.*** *Le nombre de copies de TRECs, exprimé en logarithme 10, était évalué par RT-PCR quantitative absolue, et normalisé avec le dosage de la GAPDH pour 150 000 T CD3⁺. (n=184) (**B**)* ***Expression du nombre de copies de transcrits ARNm de Klotho au sein des lymphocytes T en fonction de la longueur relative des télomères.*** *Le ratio T/S était le rapport entre l'amplicon du télomère rapporté à l'albumine évalué par une RT-PCR quantitative en multiplex (n=184). (**C**) Comparaison de l'expression de Klotho selon le stade d'insuffisance rénale. Les colonnes correspondaient aux moyennes, les barres aux SEM. Les (p) étaient exprimés. (**D**)* ***Expression des transcrits de Klotho en fonction du débit de filtration glomérulaire*** *(n=114).*

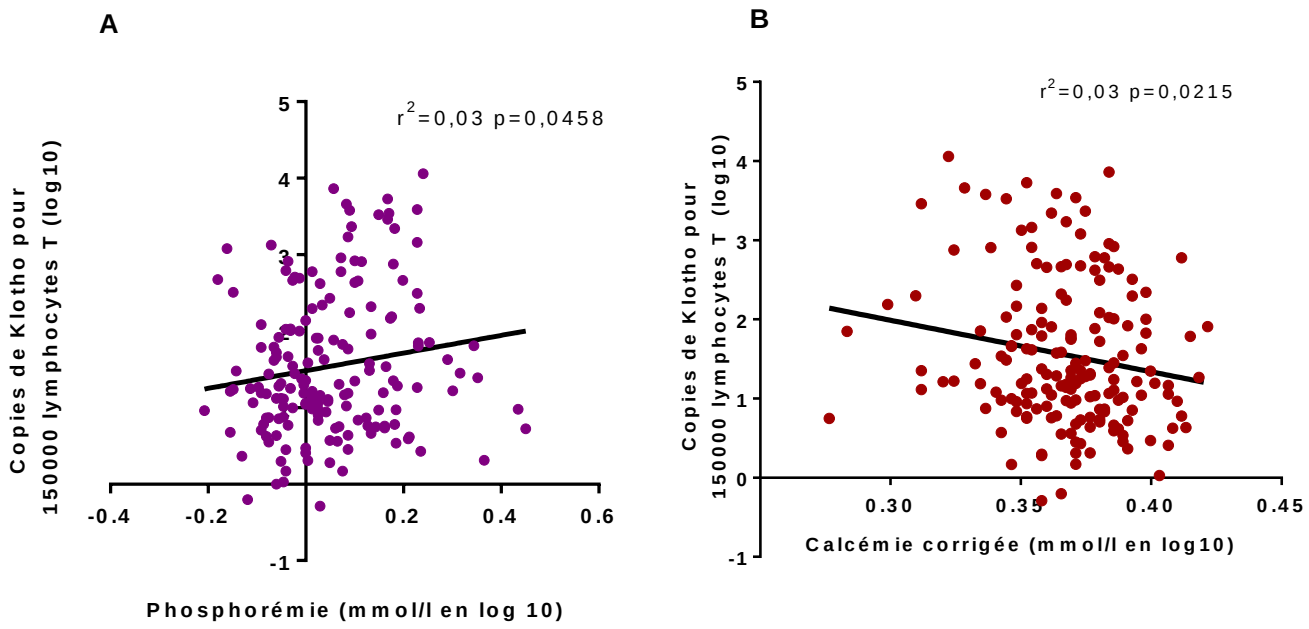

Figure 11: ***Evaluation du nombre de copies des ARNm du gène Klotho par RT-PCR quantitative absolue dans les lymphocytes CD3****. Le nombre de copies d'ARNm de Klotho était rapporté à l'expression de la GAPDH pour le normaliser à 150 000 CD3 (log10) (n=184)* ***(A) Expression des transcrits de Klotho en fonction de la phosphorémie. Pas de corrélation entre l'expression de Klotho et la phosphorémie (log10). (B) Expression des transcrits de Klotho en fonction de la calcémie (log10).***

4) Présence d'une expression intracellulaire de la protéine Klotho dans les PBMCs de patients insuffisants rénaux sévères et terminaux

A l'échelle protéique, l'analyse par Western Blot de la protéine Klotho dans les PBMCs de patients atteints d'insuffisance rénale, mettait en évidence une bande de fixation à 60 kDa. Cette bande n'était pas retrouvée sur les PBMCs d'un patient indemne d'insuffisance rénale. Cette bande répondait aux caractéristiques de masse de la forme intracellulaire de la protéine Klotho. Le standard positif, que nous avions utilisé (échantillons de parenchyme rénal) fixait plus fortement cette bande et présentait d'autres bandes à 130 et 110 kDa pouvant correspondre aux formes membranaires et sécrétées de la protéine (Figure 12). De nombreuses bandes aspécifiques étaient retrouvées sur le standard positif. La protéine Klotho était transcrite dans les PBMCs de patients insuffisants rénaux.

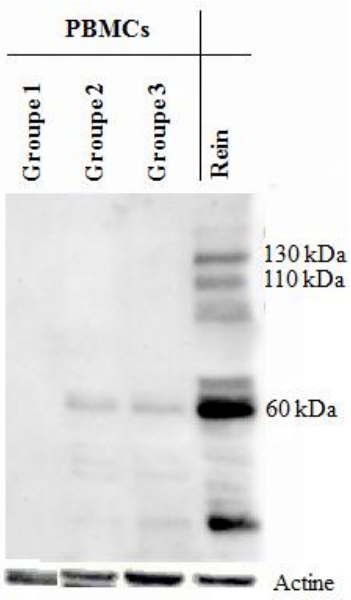

Figure 12: ***Expression de la protéine Klotho par Western Blot****. La colonne rein correspondait à des échantillons de parenchyme rénal sain et constituait le contrôle positif. L'échantillon « groupe 2 » (insuffisant rénal chronique sévère) et « groupe 3 » (patient en hémodialyse) exprimaient une bande à 60 kDa contrairement à l'échantillon « groupe 1 » (sujet « sain »). Le contrôle interne (protéine de ménage Actine) est représenté.*

5) Expression de *Klotho* non modulée *in vitro* par les toxines urémiques

Des PBMCs de sujets témoins non urémiques ont été cultivés, soit avec 10 % de sérum de sujets «sains», soit avec 10 % d'un pool de sérums de patients hémodialysés chroniques. Après 72 h de culture l'augmentation du nombre de copies de l'ARNm de *Klotho* en présence de sérum hémodialysé n'était pas significative (p=0,375) (Figure 13).

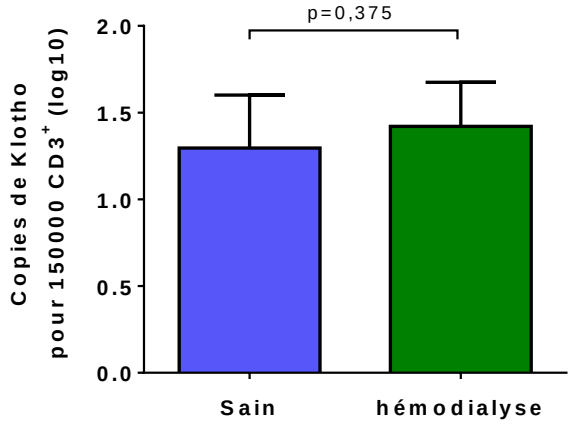

Figure 13: ***Evaluation sur l'expression de l'ARNm de Klotho, de l'effet de PBMCs avec du sérum humain standard ou issu de patients hémodialysés (après 72h de cultures)****. L'évaluation du nombre de copies d'ARNm de Klotho était faite par RT-PCR quantitative absolue, cette expression était rapportée à celle de la GAPDH pour exprimer le nombre de copies pour 150000 lymphocytes T (log10). Les colonnes correspondaient aux médianes et les barres aux quartiles. Les différences statistiques (p) entre les 2 groupes étaient exprimées. (n=5).*

V- Discussion

Ce travail évaluait l'expression de plusieurs marqueurs sanguins d'immunosénescence chez 184 patients (séparés en trois groupes selon leur fonction rénale). L'objectif était dans un premier temps de rechercher l'existence d'une immunosénescence accélérée chez les patients insuffisant rénaux chroniques. Puis, d'évaluer l'expression lymphocytaire des transcrits du gène *Klotho* comme un potentiel nouveau marqueur d'immunosénescence.

Tout d'abord, nous avions, mis au point une technique de quantification des sjTRECs et de la longueur relative des télomères au sein des PBMCs. Il existait un lien significatif entre l'âge et ces deux paramètres. Nous pouvions en conclure que ces nouvelles techniques représentaient des marqueurs fiables d'immunosénescence. De même, il existait une association entre ces marqueurs et d'autres marqueurs d'immunosénescence (nombre de CD4, RTE $CD4^+$). De manière inexpliquée, nous n'avions pas mis en évidence d'association statistique entre le nombre de TEMRA et la longueur relative des télomères (y compris chez les patients séronégatifs pour le CMV, données non montrées). La technique d'analyse des télomères par multiplex, mise au point au cours de ce travail, apparaissait fiable mais aussi reproductible. Cette technique de dosage serait plus sensible, plus spécifique et plus reproductible que la technique FISH et la quantification par PCR simplex (13). L'une des principales différences avec la méthode décrite par Cawthon provenait de la quantité nettement plus faible d'amorces utilisée par échantillon dans notre mélange réactionnel (13).

Nos résultats confortent ceux de Betjes *et al.* quant à l'existence d'une immunosénescence accélérée chez les patients insuffisants rénaux chroniques (10). Cependant, contrairement aux résultats de Betjes, dans notre travail, le nombre de sjTRECs ne diminuait pas plus dans l'insuffisance rénale chronique (10). La présence d'une dysfonction thymique précoce était attestée par la diminution du nombre de RTE $CD4^+$. Le nombre de RTE $CD4^+$ parmi les patients insuffisants rénaux sévères, et de TEMRA $CD8^+$ parmi les patients insuffisants rénaux sévères et dialysés n'étaient pas corrélés à l'âge des patients. Les sujets non urémiques avaient significativement plus de RTE $CD4^+$ et moins de lymphocytes T sénescents $CD8^+$ TEMRA que les patients insuffisants rénaux sévères et dialysés. Les patients urémiques les plus jeunes avaient un phénotype lymphocytaire T équivalent à ceux de patients âgés non urémiques. De plus, nous avions mis en évidence une sénescence réplicative aggravée chez les sujets ayant une fonction rénale

dégradée. En effet, le ratio T/S en fonction de l'âge montrait une plus faible longueur relative de télomères chez les insuffisants rénaux sévères. La longueur relative des télomères dans les PBMCs, était aussi réduite chez les patients âgés insuffisants rénaux sévères et dialysés, comparés aux patients non urémiques d'âge équivalent. La tendance générale de ces résultats montre qu'il existe une accélération de l'immunosénescence chez les patients insuffisants rénaux chroniques. Ceux-ci ont une thymopoïèse dégradée (diminution précoce des RTE), une expansion de populations lymphocytaires T oligoclonales (TEMRA), donc une limitation de leur répertoire vis-à-vis de nouveaux antigènes; et une sénescence réplicative accélérée (attrition de leurs télomères). Nous n'avons pas mis en évidence de différence de sévérité (avec ces marqueurs d'immunosénescence) entre les stades d'insuffisance rénale sévère et terminale.

Une diminution des sjTRECs dans l'insuffisance rénale aurait peut-être pu être mise en évidence dans une plus grande cohorte. Néanmoins, les RTE sont des marqueurs plus sensibles de l'évaluation de la fonction thymique. On peut aussi imaginer qu'une évaluation des βTREC aurait mis en évidence cette diminution. Les βTRECs sont produits par la recombinaison de la chaine β des TCR durant les premières étapes de la différenciation lymphocytaire T. Le ratio sjTREC/βTREC est un indicateur de la capacité de prolifération des progéniteurs thymiques au sein du thymus (37).

De nouvelles investigations sont nécessaires pour comprendre les tenants et les aboutissants de cette atteinte de l'immunité, ainsi qu'instituer des préventions adéquates et adapter les politiques vaccinales. Cet état de vieillissement accéléré est probablement lié à l'inflammation systémique et au stress oxydant induit par les toxines urémiques correspondant à un« inflamm-aging » (38). Dans un travail précédant, notre équipe avait mis en évidence une amélioration de la longueur relative des télomères (méthode qPCR simplex) un an après une transplantation rénale (induction par anticorps anti-CD25) (39). Cette réversibilité post transplantation rénale nécessiterait d'être recherchée de nouveau avec ces nouvelles techniques (20).

Le second objectif, consistait à évaluer si la quantification, dans les lymphocytes T, des ARNm de *Klotho* pouvait être utilisée comme marqueur d'immunosénescence. Dans l'article de Witkowski *et al.* le nombre de transcrits du gène *Klotho* (analysés par PCR qualitative et RT-PCR quantitative relative) dans les $CD4^+$ de 15 patients sains diminuait avec le vieillissement (29). Cette diminution n'était pas retrouvée dans notre étude qui comprenait une cohorte plus importante et une technique de dosage, nouvelle et plus précise (RT-PCR quantitative absolue). Conformément aux constatations faites dans la littérature, le nombre de transcrits du gène *Klotho* était faible dans notre travail. Notre analyse portait sur des PBMCs, et non sur des lymphocytes T $CD4^+$ triés. Le choix de cette population cellulaire (PBMCs), provenait de la faible quantité de matériel cellulaire

disponible. Si nous avions réalisé cette analyse sur des lymphocytes T $CD4^+$ triés à partir de 3 millions de PBMCs, l'évaluation du nombre d'ARNm de *Klotho* en RT-PCR serait probablement en dessous du seuil de détection de la méthode. Il existait une forte association entre l'expression en transcrits de *Klotho* dans les PBMCs et cette même expression pondérée au pourcentage de lymphocyte T. La quantité d'ARNm de *Klotho* mesurée dans les PBMCs était proportionnelle à la quantité d'ARNm de *Klotho* dans les lymphocytes T. Cependant, la quantification des transcrits du gène *Klotho* dans les différentes populations cellulaires des PBMCs (CD4, CD8, *Natural Killer*, monocytes…) pourrait permettre d'expliquer cette discordance de résultats avec ceux de la littérature. On peut imaginer par exemple, que le nombre d'ARNm de *Klotho* dans les lymphocytes T $CD8^+$ pondère celui dans les T $CD4^+$.

La quantification de l'ARNm du gène *Klotho* dans les lymphocytes T des patients non urémiques et insuffisant rénaux n'apparaissait pas dans notre étude comme un marqueur direct d'immunosénescence. L'expression de *Klotho* dans les lymphocytes T, ne serait pas corrélée à l'âge des patients, et augmenterait significativement lors de l'insuffisance rénale. L'association statistique en univariée, entre la longueur relative des télomères, des RTE $CD4^+$ et le nombre de transcrits est probablement liée au fait que ces dosages variaient avec la fonction rénale.

Alors que dans la polyarthrite rhumatoïde, il existerait une diminution de l'expression de *Klotho* dans les lymphocytes T $CD4^+$, cette expression était significativement augmentée dans les lymphocytes T $CD3^+$ des patients urémiques (29) (aucun patient inclus dans notre étude n'était atteint de polyarthrite rhumatoïde). L'augmentation de *Klotho* était associée à la dégradation du débit de filtration glomérulaire. On peut supposer qu'avec l'urémie, il existerait une augmentation de la traduction de Klotho intra-lymphocytaire en réaction au stress oxydatif, klotho intra-lymphocytaire aurait un rôle anti-inflammatoire / antioxydant afin de lutter contre cet état d'inflammation chronique (1). Afin de compléter ce travail il serait intéressant d'évaluer les transcrits de l'ARNm de *Klotho* chez des patients non urémiques ayant une altération de leur immunité avec activation lymphocytaire chronique inflammatoire comme dans le VIH, la broncho-pneumopathie chronique obstructive, les maladies inflammatoires chroniques intestinales (40–42).

Lors de la progression de l'insuffisance rénale, il existe une augmentation progressive de la phosphorémie, du FGF23 avec un état d'hyperparathyroïdie secondaire (43). Au niveau rénal, la protéine Klotho (sa forme membranaire notamment), en permettant d'augmenter l'affinité du FGF23 pour son récepteur, stimule la phosphaturie en induisant l'endocytose du co-transporteur sodium phosphate (NPT2a et NPT2c). Au niveau, des glandes parathyroïdes, Klotho inhibe la sécrétion et l'excrétion de la PTH (43). En analyse univariée, l'hyperphosphorémie, l'hypocalcémie augmentaient l'expression de *Klotho* dans les lymphocytes T. Une autre hypothèse serait que, durant l'insuffisance rénale chronique, cette synthèse de Klotho pallierait à la diminution de

synthèse provenant du parenchyme rénal. Néanmoins, un rôle de cette voie lymphocytaire dans le métabolisme phospho-calcique semble peu probable et aucune corrélation avec les taux de PTH et de 25-OH vitamine D3 n'avait été mis en évidence. Les patients insuffisants rénaux chroniques sont très fréquemment traités par IEC ou ARA2, hors l'Angiotensine II est connue comme un facteur inhibant l'expression du gène *Klotho* (44). Cette majoration de la transcription de *Klotho* retrouvée chez les insuffisants rénaux pourrait provenir du fait qu'une majorité de ces patients sont traités par IEC ou ARA2 contrairement aux patients non urémiques.

Ces résultats sont tout de même à prendre avec précaution. En effet, il existait des différences démographiques significatives entre les groupes de patients évalués. Notamment, les sujets témoins étaient plus jeunes, avec une prédominance féminine, et étaient moins séropositifs pour le CMV que les patients atteints d'insuffisance rénale. Un autre point important à prendre en considération était l'existence d'une insuffisance rénale légère, d'une hypertension artérielle et de diabète chez plusieurs patients témoins. Ceux-ci ne pouvaient donc pas être considérés comme des sujets « sains ». De plus, des analyses statistiques univariées et parfois en sous-groupes (notamment d'âge) ont été utilisées. Ces écueils pouvaient induire des biais. Le choix de 64,7 ans comme critère de séparation entre les patients «jeunes» et «âgés» était critiquable. Le tissu thymique épithélial est en effet réduit à moins de 10 % après l'âge de 70 ans (7). Ainsi, Les patients considérés comme «jeunes» avaient tout de même un âge élevé ; mais cette séparation permettait de s'affranchir des différences en termes d'âge et de séropositivité CMV entre les groupes. Certains sous-groupes avaient un effectif très faible. Le groupe de patients avec une insuffisance rénale chronique sévère ayant moins de 64,7 ans ne comptait que 7 patients. Tous les résultats d'analyse statistique de ce groupe appellent à la prudence.

Par la suite, nous voulions connaitre les conséquences traductionnelles de cette variation d'expression génique chez les patients insuffisants rénaux chroniques. Nous désirions savoir si cette hyper-expression se traduisait par une augmentation de la protéine Klotho lymphocytaire. L'analyse sur des échantillons isolés de patients mettait en évidence une hyper-expression protéique chez les patients insuffisants rénaux (qui ont aussi une forte expression en transcrit de *Klotho*). Chez le patient « sain » testé, aucune expression protéique n'avait été mise en évidence. Comme cela a déjà été décrit la sécrétion dans les PBMCs des différents sujets restait inférieure à celle du contrôle positif (parenchyme rénal). La bande d'intérêt est bien retrouvée à 60 kDa, correspondant probablement à la forme cytosolique (29,30). On peut noter que dans le travail de Witkowski, la bande d'intérêt qui était supposée correspondre à la forme intracellulaire avait un poids moléculaire de 130 kDa contrairement à ce qui avait été précédemment publié (60-65 kDa) (29,30). Notre

expérience devra être répétée afin de pouvoir comparer statistiquement les patients entre eux. De plus, nous ne savions pas si cette forme de Klotho était un simple biomarqueur d'insuffisance rénale, ou si elle avait une fonction métabolique propre. Une évaluation fonctionnelle pourrait permettre de répondre à ces interrogations.

Enfin, nous avions évalué *in vitro* l'effet de sérums de patients hémodialysés sur la transcription des ARNm de *Klotho* au sein des PBMCs. Bien qu'à chaque expérience, la quantité d'ARNm dans les PBMCs au contact du sérum provenant d'hémodialysés se trouvait être supérieure à celle des sujets sains, cette augmentation n'était pas significative. Cette expérience devrait être réitérée à plus grande échelle pour éventuellement faire apparaitre des différences. La durée de culture était définie de manière empirique, peut-être qu'une durée de culture différente permettrait de mettre en évidence des variations. Avec cependant un risque de favoriser l'apoptose des cellules immunitaires en l'absence d'activation si cette durée est allongée. L'activation des lymphocytes T au cours de l'exposition aux toxines urémiques pourrait aussi être testée. De plus, la recherche d'anticorps anti Human Leukocyte Antigen dans ces sérums n'avait pas été effectuée, leur présence aurait pu perturber les voies de signalisation intracellulaire et être un biais à l'interprétation de ces résultats.

VI- Conclusion

Ce travail a été l'occasion de mettre au point: une nouvelle technique de dosage de la longueur relative des télomères, plusieurs techniques centrées sur les ARNm du gène *Klotho* (dont un dosage par RT-PCR quantitative absolue) et sur sa quantification protéique dans les PBMCs.

Ainsi, plusieurs constatations ont été réalisées. Les patients insuffisants rénaux sévères et terminaux présentent un phénotype d'immunosénescence accélérée. L'évaluation de l'expression lymphocytaire du gène *Klotho* n'apparait pas être un marqueur d'immunosénescence. L'expression du transcrit et de la protéine Klotho augmente chez les patients souffrant d'insuffisance rénale chronique.

Le Président du jury,

Pr. J.M REBIBOU

Vu et permis d'imprimer

Dijon, le 10 MAI 2016

Le Doyen

Pr F. HUET

VII- Bibliographie

1. Vaziri ND, Pahl MV, Crum A, Norris K. Effect of uremia on structure and function of immune system. J Ren Nutr. 2012;22:149–56.

2. Maisonneuve P, Agodoa L, Gellert R, Stewart JH, Buccianti G, Lowenfels AB, et al. Cancer in patients on dialysis for end-stage renal disease: an international collaborative study. Lancet. 1999;354:93–9.

3. Eleftheriadis T, Pissas G, Antoniadi G, Liakopoulos V, Stefanidis I. Factors affecting effectiveness of vaccination against hepatitis B virus in hemodialysis patients. World J Gastroenterol. 2014;20:12018–25.

4. Ducloux D, Challier B, Saas P, Tiberghien P, Chalopin J-M. CD4 cell lymphopenia and atherosclerosis in renal transplant recipients. J Am Soc Nephrol. 2003;14:767–72.

5. Weiskopf D, Weinberger B, Grubeck-Loebenstein B. The aging of the immune system. Transpl Int. 2009;22:1041–50.

6. Johnson SA, Cambier JC. Ageing, autoimmunity and arthritis: senescence of the B cell compartment - implications for humoral immunity. Arthritis Res Ther. 2004;6:131–9.

7. Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD. Immunosenescence of ageing. J Pathol. 2007;211:144–56.

8. Ferrando-Martínez S, de la Fuente M, Guerrero JM, Leal M, Muñoz-Fernández MÁ. Impact of thymic function in age-related immune deterioration. Rev Esp Geriatría Gerontol. 2013;48:232–7.

9. Thewissen M, Somers V, Venken K, Linsen L, van Paassen P, Geusens P, et al. Analyses of immunosenescent markers in patients with autoimmune disease. Clin Immunol. 2007;123:209–18.

10. Betjes MGH, Langerak AW, van der Spek A, de Wit EA, Litjens NHR. Premature aging of circulating T cells in patients with end-stage renal disease. Kidney Int. 2011;80:208–17.

11. Lazuardi L, Jenewein B, Wolf AM, Pfister G, Tzankov A, Grubeck-Loebenstein B. Age-related loss of naïve T cells and dysregulation of T-cell/B-cell interactions in human lymph nodes. Immunology. 2005;114:37–43.

12. Andrews NP, Fujii H, Goronzy JJ, Weyand CM. Telomeres and Immunological Diseases of Aging. Gerontology. 2010;56:390–403.

13. Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. Nucleic Acids Res. 2009;37:21.

14. van Baarle D, Tsegaye A, Miedema F, Akbar A. Significance of senescence for virus-specific memory T cell responses: rapid ageing during chronic stimulation of the immune system. Immunol Lett. 2005;97:19–29.

15. Wikby A, Johansson B, Olsson J, Löfgren S, Nilsson BO, Ferguson F. Expansions of peripheral blood CD8 T-lymphocyte subpopulations and an association with cytomegalovirus seropositivity in the elderly: the Swedish NONA immune study. Exp Gerontol. 2002;37:445–53.

16. Betjes MGH. Immune cell dysfunction and inflammation in end-stage renal disease. Nat Rev Nephrol. 2013;9:255–65.

17. Betjes MGH, Huisman M, Weimar W, Litjens NHR. Expansion of cytolytic CD4+CD28- T cells in end-stage renal disease. Kidney Int. 2008;74:760–7.

18. Litjens NHR, Huisman M, van den Dorpel M, Betjes MGH. Impaired immune responses and antigen-specific memory CD4+ T cells in hemodialysis patients. J Am Soc Nephrol. 2008;19:1483–90.

19. Meijers RWJ, Litjens NHR, de Wit EA, Langerak AW, van der Spek A, Baan CC, et al. Cytomegalovirus contributes partly to uraemia-associated premature immunological ageing of the T cell compartment. Clin Exp Immunol. 2013;174:424–32.

20. Meijers RWJ, Litjens NHR, de Wit EA, Langerak AW, Baan CC, Betjes MGH. Uremia-associated immunological aging is stably imprinted in the T-cell system and not reversed by kidney transplantation. Transpl Int. 2014;27:1272–84.

21. Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, et al. Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing. Nature. 1997;390:45–51.

22. Takahashi Y, Kuro-O M, Ishikawa F. Aging mechanisms. Proc Natl Acad Sci. 2000;97:12407–8.

23. Kim J-H, Hwang K-H, Park K-S, Kong ID, Cha S-K. Biological Role of Anti-aging Protein Klotho. J Lifestyle Med. 2015;5:1–6.

24. Urakawa I, Yamazaki Y, Shimada T, Iijima K, Hasegawa H, Okawa K, et al. Klotho converts canonical FGF receptor into a specific receptor for FGF23. Nature. 2006;444:770–4.

25. Izquierdo MC, Perez-Gomez MV, Sanchez-Niño MD, Sanz AB, Ruiz-Andres O, Poveda J, et al. Klotho, phosphate and inflammation/ageing in chronic kidney disease. Nephrol Dial Transplant. 2012;27 Suppl 4:6–10.

26. Li S-A, Watanabe M, Yamada H, Nagai A, Kinuta M, Takei K. Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice. Cell Struct Funct. 2004;29:91–9.

27. Hayashi Y, Okino N, Kakuta Y, Shikanai T, Tani M, Narimatsu H, et al. Klotho-related protein is a novel cytosolic neutral beta-glycosylceramidase. J Biol Chem. 2007;282:30889–900.

28. Thurston RD, Larmonier CB, Majewski PM, Ramalingam R, Midura-Kiela M, Laubitz D, et al. Tumor necrosis factor and interferon-gamma down-regulate Klotho in mice with colitis. Gastroenterology. 2010;138:1384–94.

29. Witkowski JM, Soroczyńska-Cybula M, Bryl E, Smoleńska Ż, Jóźwik A. Klotho-a Common Link in Physiological and Rheumatoid Arthritis-Related Aging of Human CD4+ Lymphocytes. J Immunol. 2007;178:771–7.

30. Liu F, Wu S, Ren H, Gu J. Klotho suppresses RIG-I-mediated senescence-associated inflammation. Nat Cell Biol. 2011;13:254–62.

31. Soroczyńska-Cybula M, Bryl E, Smoleńska Ż, Witkowski JM. Varying expression of four genes sharing a common regulatory sequence may differentiate rheumatoid arthritis from ageing effects on the CD4+ lymphocytes. Immunology. 2011;132:78–86.

32. Seiler S, Wen M, Roth HJ, Fehrenz M, Flügge F, Herath E, et al. Plasma Klotho is not related to kidney function and does not predict adverse outcome in patients with chronic kidney disease. Kidney Int. 2013;83:121–8.

33. Barker SL, Pastor J, Carranza D, Quinones H, Griffith C, Goetz R, et al. The demonstration of Klotho deficiency in human chronic kidney disease with a novel synthetic antibody. Nephrol Dial Transplant. 2015;30:223-33

34. Xu Y, Sun Z. Molecular Basis of Klotho: From Gene to Function in Aging. Endocr Rev. 2015;36:174–93.

35. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. Physiol Genomics. 2005;21:389–95.

36. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 1970;227:680–5.

37. Toubert A, Glauzy S, Douay C, Clave E. Thymus and immune reconstitution after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in humans: never say never again. Tissue Antigens. 2012;79:83–9.

38. Cannizzo ES, Clement CC, Sahu R, Follo C, Santambrogio L. Oxidative stress, inflamm-aging and immunosenescence. J Proteomics. 2011;74:2313–23.

39. Crepin T, Carron C, Roubiou C, Gaugler B, Gaiffe E, Simula-Faivre D, et al. ATG-induced accelerated immune senescence: clinical implications in renal transplant recipients. Am J Transplant. 2015;15:1028–38.

40. Di Stefano A, Caramori G, Ricciardolo FLM, Capelli A, Adcock IM, Donner CF. Cellular and molecular mechanisms in chronic obstructive pulmonary disease: an overview. Clin Exp Allergy. 2004;34:1156–67.

41. Laish I, Katz H, Stein A, Liberman M, Naftali T, Kitay-Cohen Y, et al. Telomere dysfunction in peripheral blood lymphocytes from patients with primary sclerosing cholangitis and inflammatory bowel disease. Dig Liver Dis. 2015;47:790–6.

42. Deeks SG, Tracy R, Douek DC. Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection. Immunity. 2013;39:633–45.

43. Gutiérrez OM. Fibroblast growth factor 23, Klotho and disordered mineral metabolism in chronic kidney disease: unraveling the intricate tapestry of events and implications for therapy. J Ren Nutr. 2013;23:250–4.

44. Mitani H, Ishizaka N, Aizawa T, Ohno M, Usui S, Suzuki T, et al. In Vivo klotho Gene Transfer Ameliorates Angiotensin II-Induced Renal Damage. Hypertension. 2002;39:838–43.