

**Cohorte « COLT »**

Réf RC12\_0333

**Facteurs prédictifs du rejet chronique chez le  
transplanté pulmonaire: Cohorte COLT**

**Investigateur Coordonnateur :**

**Pr Antoine Magnan**

Service de Pneumologie

L'Institut du thorax

Centre National de Référence

Mucoviscidose

Hôpital Guillaume et René Laennec

Boulevard Jacques Monod-St Herblain

44093 Nantes cedex 1

Tel : (33) 02 40 16 52 35

Fax : (33) 02 40 16 52 41

Email : [antoine.magnan@univ-nantes.fr](mailto:antoine.magnan@univ-nantes.fr)

**Responsable de la Recherche :**

**CHU de Nantes**

Département promotion de la  
recherche clinique

Maison de la Recherche en santé

5, allée de l'île Gloriette

44093 Nantes cedex 01 (FRANCE)

tél : (33) 02 53 48 28 35

fax : (33)02 53 48 28 36

Email : [anne.omnes@chu-nantes.fr](mailto:anne.omnes@chu-nantes.fr)

## RESUME

<b>Titre de l'étude</b>	<b>Facteurs prédictifs du rejet chronique chez le transplanté pulmonaire – Cohorte COLT</b>
<b>Mots clés</b>	Transplantation pulmonaire, bronchiolite oblitérante, facteurs prédictifs
<b>Promoteur de l'étude</b>	CHU Nantes
<b>Investigateur coordonnateur</b>	Pr Antoine MAGNAN, service de pneumologie, Institut du thorax, CHU Nantes
<b>Nombre de centres prévus</b>	11 en France : CHU de Nantes, Marseille, Lyon, Strasbourg, Grenoble, Bordeaux, Centre Chirurgical Marie Lannelongue (Le Plessis Robinson), Hôpital Bichat (Paris), Hôpital Européen Georges Pompidou (Paris), Hôpital Foch (Suresnes) et Toulouse 2 en Suisse : Centre Hospitalier Vaudois, Lausanne ; Zurich 1 en Belgique : Hôpital Erasme, Bruxelles
<b>Type d'étude</b>	Recherche non interventionnelle
<b>Planning de l'étude</b>	Durée de suivi par patient : 10 ans
<b>Design de l'étude</b>	Etude de physiopathologie, prospective, multicentrique européenne, en ouvert
<b>Contexte :</b>	<p><b>Rationnel :</b> L'insuffisance respiratoire chronique terminale est l'aboutissement mortel des maladies pulmonaires associées à une destruction ou une fibrose du parenchyme pulmonaire. Depuis maintenant 25 ans, il est possible de proposer à ces patients une transplantation pulmonaire, avec une progression constante du nombre annuel de transplantations.</p> <p>La principale complication à long terme de la transplantation pulmonaire est la survenue d'une dysfonction chronique de greffon ou bronchiolite oblitérante (BO), témoignant d'un rejet chronique aboutissant à la perte de l'organe. Bien qu'une meilleure maîtrise des traitements immunosuppresseurs ait permis d'en diminuer l'incidence, la BO survient encore dans 35 à 50% des cas dans les 2 à 5 ans. La physiopathologie de la BO est encore largement inconnue et a peu été étudiée, essentiellement en raison de la rareté des malades atteints et de la difficulté d'accès à des prélèvements. On sait toutefois qu'il s'agit d'un processus immunologique dans lequel de nombreuses populations cellulaires et plusieurs groupes de médiateurs sont impliqués, comme l'ont montré les études transversales antérieures, sans qu'il soit possible de dire actuellement lesquels sont mis en jeu précocement, faute d'étude prospective longitudinale.</p> <p><b>Objectifs :</b> COLT (COhort in Lung Transplantation) consiste en la mise en commun par les centres participants des données cliniques, biologiques, fonctionnelles et radiologiques des malades, recueillies de façon prospective, homogène et standardisée dans une base de données commune, associée à la réalisation d'une biocollection comprenant des échantillons d'ARN de tissus, d'ADN et de plasma,</p>

	<p>instituée dans le cadre du Centre de Ressource Biologiques du CHU de Nantes.</p> <p>L'objectif de cette cohorte sera de réaliser une étude longitudinale du développement de la BO chez des patients transplantés pulmonaires suivis sur 10 ans post- transplantation, dans le but d'identifier et valider de nouveaux biomarqueurs du développement de la BO. Coordonnée par le Centre National de Référence Mucoviscidose de Nantes, l'étude COLT implique tous les centres de transplantation Français. Elle s'ouvre depuis 2012 à l'Europe, en intégrant deux centres en Suisse et un en Belgique.</p> <p><b>Déroulement :</b> Les patients inclus après avoir été informés et avoir donné leur consentement éclairé signé pour la biocollection, sont revus à la date de la transplantation, à 1 et à 6 mois après la greffe, puis tous les ans pendant 10 ans.</p> <p>Pour les patients inclus en urgence, le consentement « Biocollection » d'une personne de confiance (ou d'un membre de la famille) sera recueilli, après que celle-ci ait été informée de l'étude. Le consentement « Biocollection » du patient sera recueilli à posteriori après sa greffe. En cas de refus de poursuivre l'étude, il sera sorti de la cohorte et ses prélèvements seront détruits. Ces patients ne bénéficieront donc pas de la totalité des examens de la visite d'inclusion lors du bilan pré-greffe. Seule la prise de sang sera réalisée.</p> <p>Lors de la transplantation un prélèvement sanguin du donneur et du receveur sont réalisés, et une biopsie de poumon natif stockée. A chaque visite de suivi, un prélèvement sanguin sera réalisé. Un surnageant d'expectoration induite, un condensat d'air exhalé ou du liquide et des cellules de lavage broncho-alvéolaire pourront être obtenus selon les habitudes des équipes dans le cadre du suivi systématique des transplantés pulmonaires, ou en cas de suspicion de rejet, d'infection pulmonaire ou de BO.</p> <p>Dans le but de détecter des biomarqueurs prédictifs de BO, une analyse de l'activation lymphocytaire T et des cellules dendritiques du sang sera réalisée de façon centralisée à l'Inserm UMR 1087, Nantes et comparée avec les résultats obtenus en présence de cellules du donneur. Une analyse du protéome des différents types d'échantillons prélevés, ainsi qu'une analyse du transcriptome du sang et des biopsies trans-bronchiques seront aussi réalisées chez le receveur. Les polymorphismes de gènes candidats seront analysés à partir du sang du transplanté.</p>
<p><b>Objectifs de l'étude</b></p>	<p><b>Principal :</b> Rechercher si l'évolution longitudinale des populations lymphocytaires Th1, Th2, Th17 et Treg dans le sang sont des marqueurs prédictifs de la Bronchiolite Obliterante (BO).</p> <p><b>Secondaires :</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Rechercher si l'évolution du phénotype des cellules dendritiques dérivées du sang du donneur ou du transplanté et des lymphocytes T après co-culture sont des marqueurs prédictifs de la BO.</li> <li>2. Rechercher si la présence d'IL-17 dans le LBA, le surnageant de l'expectoration induite, le condensat d'air exhalé ou le plasma constitue un facteur prédictif de survenue de la BO.</li> <li>3. Rechercher si la présence de polymorphismes au niveau de CTLA4, du TGF-beta, de l'IL-6, du TNF, de l'IL-10 et de RANTES constitue un facteur prédictif de la survenue de la BO.</li> </ol>

	<p>4. Identifier et valider des marqueurs prédictifs de la BO par analyse longitudinale du transcriptome dans les biopsies transbronchiques des transplantés pulmonaires.</p> <p>5. Identifier et valider des marqueurs prédictifs de la BO par analyse par SELDI-TOF du profil protéomique du plasma, du LBA, de l'expectoration induite et du condensat d'air exhalé des transplantés pulmonaires</p>
<b>Nombre de cas (effectif de l'échantillon)</b>	Environ 200 greffés par an.
<b>Calendrier des différentes visites et des différents examens</b>	<p>Les patients seront suivis sur une période de 10 ans, avec une visite lors de l'inscription sur liste de transplantation (ou de la consultation au cours de laquelle l'intention d'inscription a été prise), une visite post-greffe aux mois M1 et M6, puis tous les ans.</p> <p>A chaque visite, une prise de sang veineux pour l'analyse des populations lymphocytaires, du génome et du transcriptome sera systématiquement réalisée.</p> <p>Un prélèvement de surnageant d'expectoration induite (EI), de condensat de l'air exhalé (CAE), de surnageant ou de cellules de liquide broncho-alvéolaire (LBA) seront obtenus selon les habitudes de chaque centre dans le cadre du suivi systématique des transplantés pulmonaires (en post-greffe à M1), ou en cas de suspicion de rejet, d'infection pulmonaire ou de BO. Une spirométrie pourra également être réalisée dans le cadre du suivi classique</p>
<b>Critères principaux de sélection, d'inclusion, de non-inclusion et d'exclusion</b>	<p>Critères d'inclusion :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Hommes et femmes</li> <li>- affiliés à un régime de sécurité sociale</li> <li>- allant bénéficier d'une transplantation pulmonaire (mono- ou bi-pulmonaire) ou cardio-pulmonaire</li> <li>- ayant donné leur consentement écrit pour la biocollection (recueilli à postériori pour les patients inclus en urgence, après recueil du consentement d'une personne de confiance ou d'un membre de la famille).</li> </ul> <p>Critères de non-inclusion :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Femmes enceintes ou en période d'allaitement</li> <li>- Patients incapables de suivre le protocole ou de donner leur consentement pour la biocollection (recueilli à postériori pour les patients inclus en urgence, après recueil du consentement d'une personne de confiance ou d'un membre de la famille).</li> <li>- Patients porteurs de pathologies inflammatoires concomitantes, indépendamment de tout rejet aigu, chronique ou infection</li> </ul>
<b>Traitement, acte interventionnel à l'étude</b>	Non applicable.
<b>Critère de jugement principal</b>	Le critère principal de jugement est défini par la variation des proportions de lymphocytes Th1 (CD4+ IFN- $\gamma$ +), Th2 (CD4+ IL-13+), Th17 (CD3+IL-17+) et Treg (CD4+CD25+ <sup>high</sup> CD127 <sup>low</sup> ) dans le sang au cours du temps.
<b>Critères de jugement secondaires</b>	1. Variation des proportions de cellules Treg, CTLA4+, de cellules ICOS+ et de cellules exprimant l'IDO après co-culture avec les DC du transplanté ou du donneur, comparées entre transplantés développant une bronchiolite oblitérante et transplantés sans complication, mesurées par cytométrie en flux.

	<ol style="list-style-type: none"> <li>2. Proportions de cellules Treg, CTLA4+, de cellules T ICOS+ et de DC exprimant l'indoleamine 2, 3 dioxygénase après cocultures de DC du donneur et des LT du transplanté, comparées entre transplantés développant une bronchiolite oblitérante et transplantés sans complication, mesurées par cytométrie en flux.</li> <li>3. Variation des concentrations d'IL-17 dans les surnageants de LBA et d'expectoration induite, le CAE et dans le plasma, mesurées par ELISA.</li> <li>4. Présence de polymorphismes génétiques retrouvés dans l'ADN du receveur par analyse des gènes d'intérêt (CTLA-4, TGF-beta, IL-6, TNF-alpha, IL-10, RANTES) par PCR.</li> <li>5. Variation du niveau d'expression des gènes dans les biopsies mesuré par hybridation des cDNA avec une puce à DNA pangénomique comparé entre transplantés développant une bronchiolite oblitérante et transplantés sans complication. Comparaison des résultats aux données du poumon natif. Comparaison des données chez les transplantés développant une bronchiolite oblitérante, avant et pendant l'épisode de rejet.</li> <li>6. Variation du niveau d'expression protéique mesuré par SELDI-TOF dans le plasma, le LBA, l'Exl, et le CAE comparé entre transplantés développant une bronchiolite oblitérante et transplantés sans complication.</li> </ol>
<input type="checkbox"/> Pharmacogénétique <input type="checkbox"/> Pharmacocinétique <input type="checkbox"/> Pharmacodynamique <input type="checkbox"/> Autres analyses	Non applicable
<b>Autres évaluations</b>	Non applicable
<b>Analyse statistique</b>	<p>Des analyses descriptives seront réalisées pour l'ensemble des variables recueillies et des estimations ponctuelles et par intervalles de confiance à 95% seront fournies pour les variables qualitatives et quantitatives. En cas de non normalité des distributions (attestée par un test de Kolmogorov-Smirnov), les médianes et intervalles interquartiles des variables correspondantes seront fournis. La distribution de survenue d'une BO au cours du suivi sera estimée à l'aide de la méthode de Kaplan -Meier.</p> <p><u>Analyse statistique des populations lymphocytaires :</u></p> <p>Dans un premier temps, l'association entre la cinétique d'évolution des populations lymphocytaires Th1, Th2, Th17 et Treg dans le sang et la probabilité de survenue d'une BO au cours du suivi sera évaluée à l'aide d'un modèle à risques proportionnels de Cox incluant des covariables dépendant du temps (populations lymphocytaires).</p> <p>Dans un deuxième temps, la valeur pronostique des populations lymphocytaires précédemment identifiées comme étant associées à la survenue d'une BO sera appréciée à l'aide de courbes de ROC dépendantes du temps (Heagerty PJ, Lumley T, and Pepe SP. Time-Dependent ROC Curves for Censored Survival Data and a Diagnostic Marker. <i>Biometrics</i> 2000;56:337-344,) adaptées au plan expérimental longitudinal et temps-dépendant. Cette approche méthodologique permettra d'estimer les sensibilités et spécificités des marqueurs d'intérêt dépendants du temps et de calculer l'aire sous les courbes de ROC permettant d'évaluer le pouvoir prédictif de ces marqueurs (l'aire sous la courbe étant d'autant plus grande que leur valeur pronostique est élevée).</p>

	<p>L'association, avec la probabilité de survenue de BO au cours du suivi, et l'évaluation de la valeur pronostique de la cinétique d'évolution des critères suivants seront appréciées selon la même stratégie que celle décrite précédemment :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- proportions de cellules T CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>, CTLA4+, de cellules ICOS+ et de cellules exprimant l'indoleamine 2, 3 dioxygénase après co-cultures en présence : <ul style="list-style-type: none"> <li>o de DC-TC du transplanté</li> <li>o de DC du donneur et TC du transplanté</li> </ul> </li> <li>- concentrations d'IL-17 dans les surnageants de LBA et d'expectoration induite, de CAE et dans le plasma, mesurées par ELISA</li> </ul> <p><u>Analyse statistique des données génétiques :</u></p> <p>L'analyse des données génétiques relatives aux gènes codant pour des cytokines vise à comparer la fréquence des phénotypes : faible producteur de cytokines, producteur intermédiaire de cytokines et fort producteur de cytokines chez les patients indemne de BO et les patients ayant développé une BO lors de l'étude. A cet effet, un score global de production de cytokines sera tout d'abord calculé pour chaque patient en additionnant les scores (faible=0, intermédiaire=1, fort=2) propres à chacun des gènes TNF-<math>\alpha</math>, TGF-<math>\beta</math>1, IL-10 et IL-6 et RANTES (64). L'influence de ce score composite sur la survenue de la BO sera alors évaluée par régression logistique. La contribution individuelle de chaque gène sera aussi testée séparément. Concernant CTLA4, pour lequel on ne dispose pas de phénotype établi comme pour les cytokines, le test de tendance de Cochran-Armitage sera appliqué à chacun des 3 polymorphismes génotypés. L'influence potentielle des haplotypes formés par ces 3 loci sera aussi testée par une méthode prenant correctement en compte l'incertitude qui leur est associée (65).</p> <p>Une analyse du délai de survenue de la BO analogue à celle décrite ci-dessus mais par modèle de régression de Cox pourra être envisagée. Celle-ci permettra d'affiner la première analyse où la survenue de la BO est traitée comme un événement binaire.</p> <p><u>Analyse statistique des données du transcriptome :</u></p> <p>En ce qui concerne spécifiquement les données du transcriptome, après normalisation et filtrage des données, celles-ci seront visualisées au moyen de classifications hiérarchiques (Eisen et al. 1998). Les gènes différentiellement exprimés entre les prélèvements issus de patients porteurs de bronchiolite oblitérante ou sans complication de la transplantation, seront recherchés par test t de Student ou par la méthode SAM (Tusher, Tibshirani, and Chu 2001).</p> <p><u>Analyse statistique des données du protéome :</u></p> <p>Les profils protéiques seront analysés avec le logiciel CIPHERGEN Express Client 3.0. Les pics protéiques (en Da) seront estimés présents ou absents, selon si leur rapport signal/bruit est respectivement &gt;5 ou &lt;5. Un test-U de Mann et Whitney sera appliqué pour comparer les intensités (le rapport signal/bruit des pics) au sein des 2 populations. Les protéines dont la valeur de p est inférieure à 0.05 (après correction des tests multiples) seront considérées comme statistiquement significatives.</p> <p>La performance des pics d'intérêts identifiés sera aussi évaluée par l'analyse des courbes ROC (logiciel SPSS version 12). Dans un second temps, un algorithme diagnostique associant plusieurs marqueurs (discriminants seuls ou non) sera construit (test de régression) pour augmenter la performance des pics d'intérêts pris individuellement (logiciel Biomarker Pattern®).</p>
--	--

<b>Retombées :</b>	<p>Aucune étude de cette ampleur n'a encore été menée en Europe. COLT va permettre le rapprochement des centres Français et Européens de transplantation pulmonaire ainsi que la constitution d'un réseau pérenne.</p> <p>La découverte d'une éventuelle signature biologique du rejet chronique permettra d'identifier précocement les patients à fort risque de BO et de renforcer chez eux l'immunosuppression et la surveillance. A l'inverse la découverte d'une signature prédictive de la tolérance permettra d'utiliser des doses moindres d'immunosuppression, évitant ainsi certains effets secondaires. Enfin, COLT permettra l'identification de cibles potentielles pour de futurs traitements de la BO.</p>
--------------------	---

## PAGE DE SIGNATURES

Cette page est une page de validation du protocole. Elle permet d'attester de l'exactitude des données du protocole.

Nom	Coordonnées	Date	Signature
<b>Investigateur coordonnateur</b>	Pr Antoine Magnan Pneumologie L'Institut du thorax Centre National de Référence Mucoviscidose Hôpital Guillaume et René Laennec Boulevard Jacques Monod-St Herblain 44093 Nantes cedex 1 Tel : (33) 02 40 16 52 35 Fax : (33) 02 40 16 52 41 Email : <a href="mailto:antoine.magnan@chu-nantes.fr">antoine.magnan@chu-nantes.fr</a>		
<b>Promoteur</b>	Mme Anne OMNES Responsable Département promotion à la recherche clinique CHU de Nantes 5, allée de l'île Gloriette 44093 Nantes cedex 01 (FRANCE) tél : (33) 02 53 48 28 35 / fax : (33)02 53 48 28 36		
<b>Méthodologistes</b>	<p><b>- Véronique Sébille</b> Plateforme Biostatistique - Cellule de Promotion de la Recherche Clinique CHU de Nantes 5, allée de l'île Gloriette 44093 Nantes cedex 01 (FRANCE) tél : +33 (0)2 40 41 29 96 / fax : +33 (0)2 40 41 29 96 Email : <a href="mailto:veronique.sebille@univ-nantes.fr">veronique.sebille@univ-nantes.fr</a></p> <p><b>- Emmanuel Nowak</b> Centre d'Investigation Clinique de Brest INSERM CIC 0502 Hôpital de la Cavale Blanche 29609 Brest Cedex</p> <p><b>- Rémi Houlgatte</b> Plateforme Transcriptome- Puces à ADN - OGP- Nantes Université de Nantes 1 Quai de Tourville BP 13522 / NANTES</p>		

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

*(si nécessaire)*

BO	Bronchiolite Oblitérante
BOS	Syndrome de Bronchiolite Oblitérante
CAE	Condensat de l'air exhalé
CEC	Cellules Endothéliales Circulantes
CVF	Capacité Vitale Forcée
CVL	Capacité vitale
DC	Cellule Dendritique
EI	Evénement Indésirable
Ex I	Expectoration induite
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
PEC	Progéniteurs Endothéliaux Circulants
PBMC	Cellules mononucléées du sang périphérique
SELDI-TOF	Surface-Enhanced Laser Desorption-Ionisation – Time Off Flight
VEMS	Volume Expiré Maximum en une Seconde

## TABLE DES MATIERES

1.	Justification de l'étude :.....	12
1.1	La bronchiolite oblitérante du transplanté pulmonaire: une complication fréquente et mortelle peu étudiée.....	12
1.2	Physiopathologie de la bronchiolite oblitérante et justification de l'étude COLT .....	13
1.3	Justification des approches expérimentales mises en œuvre.....	14
1.3.1	Etude des lymphocytes T en transplantation pulmonaire .....	14
1.3.2	Recherche de polymorphismes des gènes d'intérêt.....	16
1.3.3	Analyse du transcriptome .....	16
1.3.4	Analyse du protéome .....	17
1.4	Faisabilité de l'étude .....	18
2.	Objectifs de la recherche :.....	19
2.1	Objectif et critère d'évaluation principal .....	19
2.1.1.	Objectif principal .....	19
2.1.2.	Critère d'évaluation principal .....	20
2.2.	Objectifs et critères d'évaluation secondaires.....	20
2.2.1.	Objectifs secondaires.....	20
2.2.2.	Critères de jugement secondaires .....	20
3.	Description de la population étudiée .....	21
3.1	Description de la population .....	21
3.2	Critères d'inclusion.....	21
3.3	Critères d'exclusion .....	22
4.	Déroulement de l'étude .....	22
4.1	Méthodologie générale de la recherche .....	22
4.2	Techniques d'études et d'analyses .....	22
4.2.1	Description détaillée des paramètres d'évaluation .....	22
4.3	Calendrier de l'étude.....	23
4.4	Description des techniques et analyses .....	27
4.4.1	Récupération et prise en charge des échantillons .....	27
4.4.1.1	Echantillons sanguins.....	27
4.4.1.2	Biopsies de poumon natif .....	28
4.4.1.3	Lavages Broncho-alvéolaires (LBA) .....	28
4.4.1.4	Condensat de l'air exhalé.....	29
4.4.1.5	Expectoration Induite .....	29
4.4.2	Conservation des échantillons avant entrée dans la biocollection.....	30
4.4.3	Transport des échantillons.....	30
4.4.4	Rattachement à la biocollection COLT .....	31
4.4.5	Analyse des prélèvements.....	31
4.4.5.1	Phénotypage des LT et des DC dans le sang par cytométrie de flux .....	31
4.4.5.2	Mesure de l'IL-17 par ELISA .....	32
4.4.5.3	Etude des polymorphismes génétiques.....	32
4.4.5.4	Etude du niveau d'expression des transcrits .....	32
4.4.5.5	Analyse du niveau d'expression protéique par SELDI-TOF .....	33
4.5	Critères d'arrêt prématuré de la participation d'une personne à la recherche.....	33
5.	Data Management et statistiques .....	33
5.1	Recueil et traitement des données de l'étude.....	33
5.1.1	Recueil des données.....	33
5.1.2	Codage des données .....	34
5.1.3	Traitement des données .....	35
5.2	Statistiques.....	35

5.2.1	Description des méthodes statistiques prévues, y compris du calendrier des analyses intermédiaires prévues .....	36
5.2.1.2	Tests statistiques utilisés .....	36
5.2.1.3	Analyse en sous groupes prévues.....	37
5.2.3	Degré de signification statistique prévu.....	38
5.2.4	Critères statistiques d'arrêt de la recherche.....	38
5.2.5	Méthode de prise en compte des données manquantes, inutilisées ou non valides.....	38
5.2.6	Gestion des modifications apportées au plan d'analyse de la stratégie initiale.....	38
5.2.7	Choix des personnes à inclure dans les analyses .....	38
6.	Sécurité / Effet indésirable .....	38
7.	Aspects administratifs et réglementaires.....	39
7.1	Droit d'accès aux données et documents source.....	39
7.2	Données informatisées et soumission à la CNIL .....	39
7.4	Amendements au protocole .....	39
7.5	Règles relatives à la publication .....	39
8.	Considérations éthiques .....	40
8.1	Information et recueil du consentement écrit du patient .....	40
	Liste des annexes.....	41
	Annexe 1 : Références bibliographiques.....	42

## **1. JUSTIFICATION DE L'ETUDE :**

### **1.1 La bronchiolite oblitérante du transplanté pulmonaire: une complication fréquente et mortelle peu étudiée**

L'insuffisance respiratoire chronique terminale est l'aboutissement mortel des maladies pulmonaires associées à une destruction ou une fibrose du parenchyme pulmonaire. Ces maladies sont le plus fréquemment les fibroses pulmonaires, la broncho-pneumopathie chronique obstructive, l'hypertension artérielle pulmonaire, les dilatations des bronches diffuses et la mucoviscidose. Depuis maintenant 25 ans, il est possible de proposer à ces patients une transplantation pulmonaire, avec une progression constante du nombre annuel de transplantations. Actuellement la France, avec 223 greffes réalisées en 2007, est le troisième pays en nombre de transplantations, derrière les USA et l'Allemagne (1).

La mucoviscidose est une maladie génétique rare qui est devenue au cours des dernières années une cause émergente d'insuffisance respiratoire terminale de l'adulte jeune, du fait d'une prise en charge améliorée au cours de l'enfance. Cette maladie est ainsi devenue la première cause de transplantation pulmonaire, représentant aujourd'hui 35 % des indications (1).

La principale complication à long terme de la transplantation pulmonaire est la survenue d'une dysfonction chronique de greffon ou bronchiolite oblitérante (BO), témoignant d'un rejet chronique aboutissant à la perte du greffon et à nouveau à l'insuffisance respiratoire terminale et à une indication de retransplantation (2). Le diagnostic de BO repose sur l'apparition d'un syndrome de bronchiolite oblitérante (BOS), caractérisé par un trouble ventilatoire obstructif irréversible. Bien qu'une meilleure maîtrise des traitements immunosuppresseurs ait permis d'en diminuer l'incidence, le BOS survient encore dans 35 à 50% des cas dans les 2 à 5 ans (2).

La physiopathologie du BOS est encore largement inconnue, et a relativement peu été étudiée en comparaison à d'autres rejets chroniques d'organes solides tels que le rein ou le cœur, essentiellement en raison de la rareté des malades atteints et de la difficulté d'accès à des prélèvements de patients porteurs de BO. Un workshop du national Heart Lung and Blood Institute (3) soulignait en 2005 (i) la pauvreté de la recherche dans le domaine de la transplantation pulmonaire, faute d'infrastructures facilitant les études prospectives multicentriques permettant d'obtenir une puissance suffisante, et (ii) la rareté des équipes de recherche travaillant sur la biologie de la transplantation pulmonaire. La cohorte de transplantés pulmonaires que nous proposons de mettre en place doit pouvoir répondre à terme à ces deux limitations, en offrant aux centres participant l'infrastructure de recherche clinique nécessaire aux études multicentriques, et en facilitant l'accessibilité à des prélèvements provenant de transplantés pulmonaires

à des laboratoires de recherche intéressés par la biologie de la transplantation pulmonaire.

## **1.2 *Physiopathologie de la bronchiolite oblitérante et justification de l'étude COLT***

C'est ainsi que les recherches antérieures dans ce domaine, y compris celles de notre équipe, n'ont pu porter que sur des approches transversales (comparaison des greffés porteurs de BO aux greffés indemnes), menées sur des groupes de patients restreints (4-10).

On sait toutefois qu'il s'agit d'un processus immunologique qui se déroule en deux phases, avec une phase active constituant le processus immunitaire proprement dit, pour laquelle les épisodes de rejet aigu et d'infection pulmonaire sont les principaux facteurs de risque, suivie d'une phase de réparation aboutissant à une fibrose des voies aériennes et dans une certaine mesure du parenchyme pulmonaire (11). L'atteinte bronchiolaire est au premier plan, aboutissant à un trouble ventilatoire obstructif irréversible et à l'insuffisance respiratoire chronique. De nombreuses populations cellulaires et plusieurs groupes de médiateurs (cytokines, chimiokines, facteurs de croissance) sont impliqués dans le processus de BO, sans qu'il soit possible de dire actuellement lesquels sont mis en jeu précocement, faute d'étude prospective longitudinale (3, 11).

A titre d'exemples, notre groupe a contribué au cours des 15 dernières années à ce type de travaux. C'est ainsi que nous avons montré l'importance des macrophages alvéolaires activés, producteurs de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 ou le TNF (5), et de facteurs fibrosants comme le TGF-beta (4). De même les polynucléaires neutrophiles semblent jouer un rôle clé, retrouvés en excès dans le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) et dans l'expectoration induite (7, 8), associés à une augmentation des chimiokines pro-neutrophiliques comme l'IL-8 et RANTES (6, 8). Récemment, en nous intéressant aux interactions entre lymphocytes T et cellules dendritiques, nous avons pu montrer un profil d'activation différent entre sujets porteurs de BO (profil pro inflammatoire) par rapport aux patients indemnes de BO (profil régulateur) (10). Cependant aucun de ces travaux n'a pu démontrer si l'activation de telle ou telle cellule ou de tel ou tel gène initiait le processus de BO ou en était une conséquence. Aucun de ces travaux n'a pu montrer si ces cellules ou gènes pouvaient servir de biomarqueurs précoces du rejet chronique à même d'induire un changement de thérapeutique en étant présents avant le trouble ventilatoire obstructif. En effet celui-ci survient à un stade tardif du processus immunologique, à un stade au-delà de toute possibilité de modification du traitement immunosuppresseur. Pourtant la découverte d'une signature biologique précoce du rejet chronique permettrait d'identifier précocement les patients à fort risque et de renforcer chez ceux là l'immunosuppression. A l'inverse son absence ou l'existence d'une signature prédictive de la tolérance pourrait

permettre d'utiliser des doses moindres d'immunosuppression, évitant ainsi certains effets secondaires. De telles approches sont déjà à l'essai en transplantation rénale, un domaine où les cohortes multicentriques sont développées, où les patients sont nombreux, et où le greffon est facilement accessible (12).

L'évolution du nombre de greffes pulmonaires en France nous offre aujourd'hui l'opportunité de considérer une approche longitudinale de l'étude de la physiopathologie de la BO avec un nombre suffisant de patients pour obtenir la puissance requise pour la recherche de biomarqueurs précoces. Une telle approche implique la mise en commun par plusieurs centres de transplantation des données cliniques, biologiques, fonctionnelles et radiologiques des malades, recueillies de façon homogène et standardisée dans une base de données commune, associée à la réalisation d'une biocollection pouvant servir les laboratoires de recherche capables de découvrir les biomarqueurs attendus. Cette mise en commun est l'objet de la cohorte COLT (COhort of Lung Transplantation). Coordonnée par le Centre National de Référence Mucoviscidose de Nantes, dont c'est la vocation, cette cohorte implique l'ensemble des centres de transplantation pulmonaire français, 2 centres suisses (Lausanne-Genève et Zurich) et un centre belge (Bruxelles).

### **1.3 Justification des approches expérimentales mises en œuvre**

Compte tenu de la très grande diversité des molécules impliquées dans le processus de BO et susceptibles de devenir un biomarqueur validé, plusieurs approches complémentaires seront développées. Les deux premières approches, immunologique et génétique, consistent à tester la pertinence de marqueurs bien identifiés lors de travaux antérieurs, mais jamais évalués à priori comme tels. Les deux autres, l'étude du transcriptome et celle du protéome, visent à identifier des signatures spécifiques et précoces du rejet chronique, au niveau de l'ARN messager (mRNA) et de la production de protéines.

#### **1.3.1 Etude des lymphocytes T en transplantation pulmonaire**

Les lymphocytes T CD4+ sont les cellules clé de la réaction allogénique menant au rejet de greffe, et sont largement impliqués dans les mécanismes de rejet chronique, en induisant l'activation de cellules effectrices telles que les lymphocytes T cytotoxiques, les macrophages ou les polynucléaires (11).

Plusieurs populations de lymphocytes T CD4+ sont désormais identifiées, et chacune semble jouer un rôle en transplantation pulmonaire, que ce soit dans le rejet aigu ou la BO, ou au contraire dans l'induction de tolérance. Les lymphocytes Th1, producteurs d'IFN- $\gamma$ , sont centraux dans les mécanismes du rejet aigu en induisant l'activation des lymphocytes T cytotoxiques. Au cours de la BO, nous avons mis en évidence une activation des lymphocytes Th1, mais aussi des lymphocytes

Th2, producteurs d'IL-4, d'IL-13 et d'IL-5 (9). La population Th17 a plus récemment été mise en évidence. Sous la dépendance de l'IL-6 et du TGF-beta, dont nous avons antérieurement montré l'importance au cours de la BO (4, 5), elle produit les cytokines de la famille de l'IL-17 et serait impliquée dans la pathologie bronchique inflammatoire à neutrophiles (13). En transplantation pulmonaire, deux études dont l'une est transversale (14) et l'autre porte sur un nombre réduit de patients (15) ont montré des résultats contradictoires, avec un rôle suggéré pour l'IL-17 dans la BO pour la première mais pas dans la seconde.

A l'inverse des trois autres populations, les lymphocytes T régulateurs correspondent à plusieurs petites populations de lymphocytes T capables d'induire les mécanismes de tolérance (16) en produisant notamment des cytokines immunorégulatrices telles que le TGF- $\beta$  et/ou l'Il-10. Les lymphocytes CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>high, désignés dans le reste du texte comme les Treg, représentent la population T régulatrice la plus étudiée (17). Ils représentent environ 10 % des cellules T CD4<sup>+</sup>, produisent de l'Il-10 et leur activation est régulée par les cellules dendritiques. Ils expriment le facteur de transcription Foxp3, impliqué dans leur développement et leur fonction anti-inflammatoire (18-20). Enfin leur expression du récepteur de l'Il-7, CD127, intermédiaire par rapport à ceux des lymphocytes T conventionnels, facilite leur identification en cytométrie, leur purification et l'étude de leur fonction (21-23).

C'est ainsi que l'identification des Treg repose principalement sur l'expression d'antigènes de surface (CD4<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup>, CD127<sup>+</sup>), sur l'expression du facteur de transcription intracellulaire Foxp3 ainsi que sur leur production d'Il-10 et/ou de TGF- $\beta$ .

Les Treg ont été largement étudiés en transplantation d'organes et représentent en eux-même une voie thérapeutique majeure (24). Dans une série italienne de 21 transplantés pulmonaires, une diminution de la quantité de cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> circulantes chez les patients porteurs de BO par rapport aux sujets transplantés sans complication et à un groupe de volontaires sains, a été récemment démontrée (25). Dans notre expérience, des résultats plus contrastés ont été obtenus (9), avec une augmentation des Treg chez les patients porteurs de BO stabilisée. Ces résultats ont cependant été obtenus sur un petit nombre de malades et de façon transversale.

L'activation des lymphocytes T (LT) dépend largement des signaux délivrés par les cellules dendritiques (DC) lors de la présentation antigénique. Les DC sont en effet les cellules présentatrices de l'antigène professionnelles qui, en fonction des cytokines et des médiateurs qu'elles produisent, en fonction aussi des récepteurs qu'elles expriment, vont déterminer l'orientation des LT dans un sens pro-inflammatoire ou régulateur. Les DC jouent ainsi un rôle à la fois dans le développement des épisodes de rejets aigus et dans la BO. Lors des premiers, ce sont les DC du donneur qui entrent en jeu (voie directe), tandis que lors de la seconde, ce sont les DC du receveur qui sont impliquées dans la présentation antigénique (voie indirecte) (26). Récemment, nous avons obtenu des résultats importants concernant l'interaction entre lymphocytes T (LT) et cellules dendritiques dérivées des monocytes sanguins (DC) au cours de la BO (10). En effet nous avons pu montrer que l'interaction LT-DC du receveur induisait une augmentation de la proportion de Treg et de la proportion de cellules T exprimant CTLA-4, un corécepteur impliqué dans l'induction de tolérance (27), uniquement chez les

patients indemnes de rejet chronique, et de façon indépendante du traitement immunosuppresseur. Inversement chez les patients porteurs de BO, cette interaction LT-DC induisait un phénotype pro-inflammatoire des LT avec expression du corécepteur ICOS. Dans ces expériences, les DC produisaient significativement plus d'indoleamine 2,3 dioxygénase (IDO) chez les receveurs tolérants par rapport à ceux porteurs de BO. IDO est une enzyme intervenant dans le métabolisme du tryptophane, et est impliquée dans l'induction des Treg par les DC (28). Il est évidemment important de savoir si ces résultats seraient obtenus chez les mêmes patients avant la survenue du BOS, permettant un diagnostic précoce de la complication.

C'est ainsi que nous proposons un monitoring des populations Th1, Th2, Th17, Treg et de l'interaction DC – LT avec des DC dérivées à la fois des patients transplantés pulmonaire et des donneurs.

### **1.3.2 Recherche de polymorphismes des gènes d'intérêt**

L'interaction LT-DC induit chez le transplanté indemne de complication une augmentation de la proportion de LT exprimant le corécepteur CTLA-4. Le rôle de CTLA-4 est essentiel dans l'induction du phénotype régulateur des LT comme l'ont montré les expériences d'inhibition de l'activation de ce corécepteur (10). L'expression de CTLA-4 a largement été étudiée en transplantation d'organes, et constitue une cible importante pour des traitements agonistes potentiels, du fait de son rôle dans l'induction de tolérance (29, 30). Plusieurs polymorphismes du gène de CTLA-4 ont été identifiés, dont certains ont pu être corrélés au devenir de transplantations hépatiques (31). De même, des polymorphismes des gènes de cytokines ou de chimiokines dont nous avons montré l'intérêt dans la BO, telles que le TGF-beta, le TNF, l'IL-6, l'IL-10 ou RANTES ont été identifiés et corrélés à la survenue de rejet chronique rénal (32-34). Si ces polymorphismes sont prédictifs de la survenue de la BO, ils pourront constituer des facteurs de risques identifiables, susceptibles de modifier la prise en charge des transplantés à risque.

### **1.3.3 Analyse du transcriptome**

La stratégie de criblage de gènes par analyse du transcriptome est désormais classique. Elle permet de déterminer des signatures spécifiques de telle ou telle situation pathologique et de détecter sans à priori la sur- ou la sous-expression de gènes impliqués dans la physiopathologie de la maladie considérée, au niveau du mRNA. Cette stratégie a été mise en œuvre largement en transplantation rénale. C'est ainsi qu'au cours du rejet aigu plusieurs profils d'expression des gènes ont été mis en évidence, avec la détection d'un rôle important des plasmocytes (35). De même, différents gènes codants pour des chimiokines, des protéines impliquées dans l'apoptose ou des facteurs de croissance ont été montrés comme étant surexprimés dans le rejet chronique (36). Plus récemment, en transplantation rénale et hépatique, l'analyse du transcriptome a permis de différencier les patients nécessitant une immunosuppression au long cours de ceux dit « opérationnellement

tolérants » chez lesquels l'immunosuppression peut être arrêtée (37-39). Chez ces derniers, des gènes en rapports avec l'activation des lymphocytes T régulateurs ont ainsi pu être mis en évidence (37). Récemment, le groupe de S Brouard à Nantes a ainsi démontré la pertinence d'une signature de 33 gènes permettant de discriminer les patients tolérants des patients en rejet chronique (39). Parmi les gènes en cause, plusieurs impliqués dans les mécanismes de tolérance immunitaire tels que le TGF-beta, fox p 3 ou GITR étaient associés à la tolérance opérationnelle tandis que d'autres impliqués dans l'activation des lymphocytes T cytotoxiques étaient retrouvés associés au rejet chronique.

En transplantation pulmonaire, l'étude du transcriptome a été réalisée dans plusieurs travaux, mais toujours sur un nombre limité de patients, à l'aide de puces comprenant parfois un nombre limité de gènes (40-42). COLT va rendre possible l'étude du transcriptome à l'aide de puces pangénomiques sur des prélèvements pulmonaires obtenus chez un grand nombre de patients de façon prospective.

### **1.3.4 Analyse du protéome**

De façon complémentaire à l'analyse du transcriptome, l'étude du protéome permet de déterminer sans à priori les protéines sur- ou sous-exprimées dans les liquides biologiques d'intérêt.

Actuellement, dans le cadre des pathologies pulmonaires, l'analyse du protéome est principalement réalisée sur le lavage broncho-alvéolaire car c'est un prélèvement simple et modérément invasif permettant d'obtenir un reflet exact des différents composants solubles et cellulaires du liquide qui tapisse les alvéoles. Ainsi depuis quelques années, plusieurs études analysant le protéome du LBA ont permis d'approfondir nos connaissances fondamentales sur l'inflammation pulmonaire dans diverses pathologies respiratoires, en particulier la sarcoïdose, les fibroses pulmonaires, l'asthme et le syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA) (43-48).

L'expectoration induite et le condensat de l'air exhalé sont d'autres prélèvements obtenus de manière peu invasive qui ont été largement étudiés dans les pathologies pulmonaires chroniques tel que l'asthme ou la bronchite pulmonaire chronique obstructive (BPCO) pour l'évaluation indirecte de l'inflammation des voies aériennes et l'identification de nouveaux biomarqueurs de suivi de l'activité de la maladie ou prédictifs de la réponse à un traitement (49-53). L'analyse du protéome de ces liquides biologiques non invasifs s'est révélée prometteuse dans d'autres pathologies (54-56). En transplantation pulmonaire, notre équipe a comparé la formule cytologique et les chimiokines de l'expectoration induite et du LBA (8). Ce travail nous a permis de montrer l'existence d'une compartimentalisation de la réponse immunitaire lors du rejet chronique avec une prédominance de polynucléaires neutrophiles et d'IL-8 dans le LBA contrastant avec la présence de polynucléaires éosinophiles et de RANTES dans l'expectoration induite.

Contrairement à la transplantation rénale où plusieurs articles analysant le protéome urinaire ont été publiés (57-59), l'expérience de l'analyse protéomique appliquée à l'étude du rejet chronique en transplantation pulmonaire est très limitée. Elle concerne principalement la description des variations de la composition

protéique du LBA et des profils protéiques par la technique protéomique MALDI-TOF (60, 61). Comme pour l'étude du transcriptome, ces études portent sur des cohortes rétrospectives de faibles effectifs et ne permettent pas d'établir la valeur prédictive des biomarqueurs identifiés. De plus, l'analyse protéomique de l'expectoration induite et du condensat de l'air exhalé n'a jamais été réalisée chez le sujet transplanté pulmonaire.

Dans ce travail, nous proposons une analyse protéomique combinée du LBA, du condensat de l'air exhalé, de l'expectoration induite et du plasma avec l'utilisation de la technique de protéomique SELDI-TOF (Surface-Enhanced Laser Desorption-Ionisation – Time Of Flight). Cette technique permet l'étude du protéome, c'est-à-dire l'ensemble des protéines d'un échantillon donné entre 2 et 300 kDa (kiloDalton). Elle offre l'avantage d'être extrêmement sensible (de l'ordre du femtomole) et surtout permet une analyse rapide (par rapport à l'électrophorèse bidimensionnelle) de nombreux échantillons. Les résultats sont exprimés sous forme de spectres, chaque pic représentant une protéine de masse donnée dont la hauteur est proportionnelle à la quantité de protéines retenues sur la surface chromatographique. L'analyse par SELDI-TOF rend compte des diverses modifications protéiques (phosphorylation, acétylation ...) tout en permettant leur identification (62).

## **1.4 Faisabilité de l'étude**

### CHU de Nantes et Institut du thorax

Le CHU de Nantes est classé dans les CHU « fort chercheur », du fait notamment de son expertise en recherche clinique et en suivi de cohorte. L'Institut de thérapeutique et de recherches en transplantation (ITERT) de Nantes est internationalement reconnu pour ses travaux multicentriques dans le domaine de la transplantation rénale, grâce au développement de la base de données DIVAT (39). COLT est une adaptation de DIVAT à la transplantation pulmonaire et sera développée par les inventeurs de DIVAT grâce à la technologie Integralis d'IDBC.

Le CHU de Nantes est labellisé « Centre de Référence National Mucoviscidose », notamment du fait de son expertise dans le domaine de la recherche en transplantation. Cette labellisation nous a permis le recrutement d'un chef de projet « pneumologie », Karine Botturi, à même de mettre en place et de coordonner l'étude COLT en attendant les moyens en infirmières de recherche clinique nécessaires à son développement sous forme de cohorte.

En parallèle l'institut du thorax est bien connu sur le plan international pour son expertise concernant le suivi de cohortes dans le domaine cardiovasculaire (Kindt F, circulation 2007), et dans celui des biocollections d'origine multicentrique. En particulier la plate-forme transcriptome de l'institut du thorax, dirigée par Rémi Houlgatte, et celle de génétique, dirigée par Jean-Jacques Schott, sont des références.

La transplantation pulmonaire existe à Nantes depuis le début des transplantations pulmonaires en France (1989), sous l'impulsion de Alain Haloun et Philippe Despins, et représente une des activités phares de l'institut du thorax.

Enfin, l'équipe INSERM labellisée AVENIR de l'institut du thorax dirigée par Antoine Magnan, est spécialisée dans le domaine de l'activation des lymphocytes T en pathologie respiratoire et a développé une recherche régulière dans le domaine de la transplantation pulmonaire par le passé (4, 5, 8-10).

Ainsi l'institut du thorax est à même de constituer la biocollection, coordonner le projet, développer les projets génomique, transcriptomique et étude des lymphocytes T activés.

L'équipe de recherche GREPI (Groupe de Recherche et d'Etude du Processus Inflammatoire - TIMC-Imag UMR-CNRS 5525) dirigée par le Pr F. Morel, est localisée dans le laboratoire d'Enzymologie du CHU de Grenoble. Cette équipe travaille depuis plusieurs années avec le Pr C. Pison et possède une connaissance spécialisée ainsi qu'une forte expertise dans l'analyse protéomique. Cette expertise sera utilisée pour l'analyse centralisée par SELDI-TOF des échantillons collectés.

Le projet sera mené dans le respect des lois de bioéthique, notamment en ce qui concerne la constitution de la bio-collection d'échantillons, réalisée à l'Institut du Thorax dans le cadre du Centre de Ressources Biologiques (CRB) Biobanque Ouest Atlantique, qui comprend les biocollections de l'Institut du thorax et qui vient d'obtenir la labellisation IBIZA.

## **2. OBJECTIFS DE LA RECHERCHE :**

### **2.1 Objectif et critère d'évaluation principal**

#### **2.1.1. Objectif principal**

Rechercher si l'évolution longitudinale des populations lymphocytaires Th1, Th2, Th17 et Treg dans le sang sont des marqueurs prédictifs de la Bronchiolite Oblitérante (BO).

Le diagnostic de Bronchiolite Oblitérante sera porté devant l'existence d'un trouble ventilatoire obstructif non réversible selon les critères actuellement en vigueur (J Heart Lung transplant 2002, 21 : 297-310).

### **2.1.2. Critère d'évaluation principal**

Le critère principal de jugement est défini par la variation des proportions de lymphocytes Th1 (CD4+ IFN- $\gamma$ +), Th2 (CD4+ IL-13+), Th17 (CD3+IL-17+) et Treg (CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>) dans le sang au cours du temps.

## **2.2. Objectifs et critères d'évaluation secondaires**

### **2.2.1. Objectifs secondaires**

1. Rechercher si l'évolution du phénotype des cellules dendritiques dérivées du sang du donneur ou du transplanté et des lymphocytes T après co-culture sont des marqueurs prédictifs de la BO.
2. Rechercher si la présence d'IL-17 dans le LBA, le surnageant de l'expectoration induite, le condensat d'air exhalé ou le plasma constitue un facteur prédictif de survenue de la BO.
3. Rechercher si la présence de polymorphismes au niveau de CTLA4, du TGF-beta, de l'IL-6, du TNF, de l'IL-10 et de RANTES constitue un facteur prédictif de la survenue de la BO.
4. Identifier et valider des marqueurs prédictifs de la BO par analyse longitudinale du transcriptome dans les biopsies transbronchiques des transplantés pulmonaires.
5. Identifier et valider des marqueurs prédictifs de la BO par analyse par SELDI-TOF du profil protéomique du plasma, du LBA, de l'expectoration induite et du condensat d'air exhalé des transplantés pulmonaires.

### **2.2.2. Critères de jugement secondaires**

1. Variation des proportions de cellules T CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>, CTLA4+, de cellules ICOS+ et de cellules exprimant l'indoleamine 2, 3 dioxygénase après coculture avec les DC du transplanté ou du donneur, comparées entre transplantés développant une bronchiolite oblitérante et transplantés sans complication, mesurées par cytométrie en flux.
2. Proportions de cellules T CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>, CTLA4+, de cellules T ICOS+ et de DC exprimant l'indoleamine 2, 3 dioxygénase après cocultures de DC du donneur et de lymphocytes T du transplanté, comparées entre transplantés développant une bronchiolite oblitérante et transplantés sans complication, mesurées par cytométrie en flux.
3. Variation des concentrations d'IL-17 dans les surnageants de LBA et d'expectoration induite, le CAE et dans le plasma, mesurées par ELISA.
4. Présence de polymorphismes génétiques retrouvés dans l'ADN du receveur par analyse des gènes d'intérêt (CTLA-4, TGF-beta, IL-6, TNF-alpha, IL-10, RANTES) par PCR.
5. Variation du niveau d'expression des gènes dans les biopsies mesuré par hybridation des cDNA avec une puce à DNA pangénomique comparé entre

transplantés développant une bronchiolite oblitérante et transplantés sans complication. Comparaison des résultats aux données du poumon natif. Comparaison des données chez les transplantés développant une bronchiolite oblitérante, avant et pendant l'épisode de rejet.

6. Variation du niveau d'expression protéique mesuré par SELDI-TOF dans le plasma, le LBA, l'ExI, et le CAE comparé entre transplantés développant une bronchiolite oblitérante et transplantés sans complication.

### **3. DESCRIPTION DE LA POPULATION ETUDIEE**

#### **3.1 Description de la population**

L'inclusion dans cette cohorte et biocollection se fera à partir des patients nouvellement inscrits sur liste d'attente de transplantation pulmonaire ou cardiopulmonaire des CHU de Nantes, Marseille, Lyon, Strasbourg, Grenoble, Bordeaux, Centre Chirurgical Marie Lannelongue (Le Plessis Robinson), Hôpital Bichat (Paris), Hôpital Européen Georges Pompidou (Paris), Hôpital Foch (Suresnes), Toulouse, Bruxelles, Lausanne et Zurich.

Au moment de leur bilan pré-greffe ou dès la consultation au cours de laquelle l'intention d'inscription sur liste est prise par le médecin, les patients seront informés de la cohorte. Les patients ne seront inclus dans l'étude qu'après information et recueil de leur consentement écrit pour la participation à la biocollection.

En fonction de l'activité prévisionnelle de transplantation de chaque centre, un recrutement d'environ 150 à 200 patients nouvellement transplantés est attendu par an. Parmi ces patients, il est attendu que les prélèvements issus d'environ 150 patients porteurs de bronchiolite oblitérante pourront être étudiés, compte tenu du délai de survenue de cette complication et de son incidence.

En revanche, pour les patients inclus en urgence, le consentement « Biocollection » d'une personne de confiance (ou d'un membre de la famille) sera recueilli, après que celle-ci ait été informée de la cohorte et de la biocollection. Le consentement « Biocollection » du patient sera recueilli à posteriori après sa greffe. En cas de refus de poursuivre l'étude, il sera sorti de la cohorte et ses prélèvements seront détruits.

La durée de suivi de chaque patient transplanté sera de 10 ans.

Au-delà des 5 ans post-transplantation, le patient continuera à être suivi dans la cohorte mais les prélèvements destinés à la biocollection ne seront plus recueillis.

#### **3.2 Critères d'inclusion**

Les patients inclus:

- seront de sexe indifférent

- seront affiliés à un régime de sécurité sociale
- auront donné leur consentement éclairé et écrit pour la biocollection (recueilli à postériori pour les patients inclus en urgence, après recueil du consentement d'une personne de confiance).
- seront des patients allant bénéficier d'une transplantation pulmonaire (mono- ou bi-pulmonaire) ou cardio-pulmonaire.

### **3.3 Critères d'exclusion**

Ne seront pas inclus

- les femmes enceintes ou en période d'allaitement
- les patients incapables de suivre le protocole ou de donner leur consentement pour la biocollection (recueilli à postériori pour les patients inclus en urgence, après recueil du consentement d'une personne de confiance ou d'un membre de la famille).

Patients porteurs de pathologies inflammatoires concomitantes, indépendamment de tout rejet aigu, chronique ou infection.

### **3.3.1 DEROULEMENT DE L'ETUDE**

### **3.4 Méthodologie générale de la recherche**

La recherche présente les caractéristiques suivantes :

- ❖ Etude de physio(patho)logie et génétique
- ❖ Etude multicentrique internationale
- ❖ Etude non contrôlée
- ❖ Etude prospective,

### **3.5 Techniques d'études et d'analyses**

#### **3.5.1 Description détaillée des paramètres d'évaluation**

Les paramètres qui seront mesurés pour l'objectif principal seront les proportions sanguines des populations de lymphocytes Th1 (CD4+ IFN- $\gamma$ +), Th2 (CD4+ IL-13+), Th17 (CD3+IL-17+) et Treg (CD4+CD25+highCD127low) au cours du temps.

Les paramètres mesurés pour les objectifs secondaires seront :

1. Variation des proportions de cellules T CD4+CD25+highCD127low, CTLA4+, de cellules ICOS+ et de cellules exprimant l'indoleamine 2, 3 dioxygénase après coculture avec les DC du transplanté ou du donneur, comparées entre transplantés développant une bronchiolite oblitérante et transplantés sans complication, mesurées par cytométrie en flux.

2. Proportions de cellules T CD4+CD25+highCD127low, CTLA4+, de cellules T ICOS+ et de DC exprimant l'indoleamine 2, 3 dioxygénase après cocultures de DC du donneur et de lymphocytes T du transplanté, comparées entre transplantés développant une bronchiolite oblitérante et transplantés sans complication, mesurées par cytométrie en flux.
3. Variation des concentrations d'IL-17 dans les surnageants de LBA et d'expectoration induite, le CAE et dans le plasma, mesurées par ELISA.
4. Présence de polymorphismes génétiques retrouvés dans l'ADN du receveur par analyse des gènes d'intérêt (CTLA-4, TGF-beta, IL-6, TNF-alpha, IL-10, RANTES) par PCR.
5. Variation du niveau d'expression des gènes dans les biopsies mesuré par hybridation des cDNA avec une puce à DNA pangénomique comparé entre transplantés développant une bronchiolite oblitérante et transplantés sans complication. Comparaison des résultats aux données du poumon natif. Comparaison des données chez les transplantés développant une bronchiolite oblitérante, avant et pendant l'épisode de rejet.
6. Variation du niveau d'expression protéique mesuré par SELDI-TOF dans le plasma, le LBA, l'Exl, et le CAE comparé entre transplantés développant une bronchiolite oblitérante et transplantés sans complication.

### **3.6 Calendrier de l'étude**

Les patients seront inclus dans la cohorte COLT avec recueil des données cliniques, radiologiques, biologiques et fonctionnelles de routine et constitution d'une biocollection.

Les patients seront informés au moment du bilan pré-greffe (ou dès la consultation au cours de laquelle l'intention d'inscription sur liste est prise par le médecin), puis seront inclus après recueil de leur consentement signé pour la biocollection.

En revanche, pour les patients inclus en urgence, le consentement « Biocollection » d'une personne de confiance (ou d'un membre de la famille) sera recueilli, après que celle-ci ait été informée de l'étude. Le consentement « Biocollection » du patient sera recueilli à posteriori après sa greffe. En cas de refus de poursuivre l'étude, il sera sorti de la cohorte et ses prélèvements seront détruits.

Les patients transplantés seront suivis pendant 10 ans. Les visites consisteront en une visite lors de la greffe puis aux mois (M) M1, M6, puis tous les ans pendant 10 ans.

La visite d'Inclusion (V0) se déroulera de la manière suivante :

- Recueil du consentement écrit pour la biocollection
- Examen clinique
- Prélèvement sanguin de 41 ml, pour l'analyse des populations lymphocytaires, du transcriptome et à visée génétique, consistant en :
  - 2 tubes EDTA de 5 ml
  - 2 tubes Li-Hep de 9 ml

- 1 tube Paxgene® de 3 ml
- 1 tube sec de 10 ml
- Spirométrie
- Les informations concernant la pathologie initiale, les épisodes d'infections, les antécédents et les traitements en cours seront recueillies

Pour les patients inclus en urgence, après recueil du consentement d'une tierce personne, seule la prise de sang sera réalisée avant la transplantation, compte tenu de l'état du patient.

Lors de la transplantation (V1) :

- Une biopsie sur le poumon natif explanté du sujet transplanté sera réalisée en vue d'une analyse transcriptomique
- Un prélèvement sanguin du sujet transplanté (receveur) de 31 ml sera réalisé avant la transplantation (même répartition qu'à V0, excepté les 2 tubes EDTA de 5 ml qui ne seront pas prélevés)
- Un prélèvement sanguin du donneur décédé (16 ml) sera aussi réalisé pour l'étude des populations lymphocytaires. Il consistera en :
  - 1 tube Paxgene de 3 ml,
  - 1 tube sec de 9 ml,
  - 1 tube EDTA de 4 ml.
- A cet effet, une déclaration auprès de l'Agence de Biomédecine a été effectuée (dossier recevable en date du 17/04/2009). Un accord de la famille sera recueilli avant tout prélèvement.

Les visites de suivi (V2-V12) se dérouleront de la manière suivante :

- Les informations concernant notamment les épisodes d'infections, de rejet, les changements dans les traitements en cours apparus depuis la dernière visite seront recueillis
- Une prise de sang veineux de 31 ml pour l'analyse des populations lymphocytaires et du transcriptome sera systématiquement réalisée à chaque visite (même répartition qu'à V0, excepté les 2 tubes EDTA de 5ml qui ne seront pas prélevés)
- Un surnageant d'expectoration induite de condensat d'air exhalé, ainsi qu'un surnageant et cellules de lavage broncho-alvéolaire (LBA), seront obtenus selon les habitudes des équipes dans le cadre du suivi systématique des transplantés pulmonaires en post-greffe, ou en cas de suspicion de rejet, d'infection pulmonaire ou de bronchiolite oblitérante. Le diagnostic de BO sera porté devant l'existence d'un trouble ventilatoire obstructif non réversible selon les critères actuellement en vigueur (J Heart Lung transplant 2002, 21 : 297-310).
- Une spirométrie sera réalisée selon la méthode habituelle si le patient ne présente aucune contre indication, selon la méthode habituelle au cours d'une manœuvre d'expiration lente puis d'expiration forcée répétée trois fois. Les

meilleures valeurs seront prises en compte. Le volume expiratoire maximal par seconde (VEMS) et les capacités vitales lentes (CVL) et forcées (CVF) seront déterminés.

Au-delà des 5 ans post-transplantation, le patient continuera à être suivi dans la cohorte mais les prélèvements destinés à la biocollection ne seront plus recueillis.

## CALENDRIER DE L'ETUDE COLT

Actions	Bilan pré-greffe	V0 Inclusion	V1 le jour de la transplantation	V2	V3	V4	V6	Puis tous les ans pendant 5 ans (V8- V12)	Puis tous les ans pendant 5 ans (V13- V17)
Jour/Mois			M0	M1	M6± 1 mois	M12± 1mois	M24 ± 1 mois	M60 ± 1 mois	M120 ± 1 mois
		Intention d'inscription liste transplantation	Jour de la greffe	M1 après la greffe					
Information claire du patient **	X								
Consentement « Biocollection »**		X							
Antécédents		X							
Examen clinique		X		X	X	X	X	X	X
Traitements en cours (posologies)		X		X	X	X	X	X	X
Spirométrie		X		X	X	X	X	X	X
Prise de sang ***		X	X	X	X	X	X	X	
Lavage Broncho-alvéolaire*				X	X	X	X	X	
Expectoration induite*				X	X	X	X	X	
Condensat de l'air exhalé*				X	X	X	X	X	
Evénements indésirables				X	X	X	X	X	X
Fiche de fin d'étude								X	X
Prélèvement de poumon natif			X						
Prélèvement sanguin donneur			X						

\* = Selon les centres, dans le cadre du suivi systématique, ou de suspicion de rejet, d'infection pulmonaire ou de BO, \*\* pour les patients inclus en urgence, le consentement « Biocollection » d'une personne de confiance sera recueilli après l'avoir informée de l'étude. Le consentement « Biocollection » du patient sera recueilli juste après sa greffe. Pour ces patients inclus en urgence, à V0, seule la prise de sang sera réalisée avant la transplantation.

\*\*\* Le prélèvement sanguin sera de 41 ml à l'inclusion puis 31 ml aux visites de suivi. Un prélèvement de 16 ml de sang du donneur sera aussi réalisé le jour de la transplantation.

## **3.7 Description des techniques et analyses**

### **3.7.1 Récupération et prise en charge des échantillons**

#### **3.7.1.1 Prélèvements systématiques**

##### **3.7.1.1.1 Echantillons sanguins**

En ce qui concerne le donneur :

Un prélèvement sanguin de 16 ml de sang sera réalisé systématiquement chez le donneur avant transplantation puis envoyé à Nantes. Ce prélèvement consistera en :

- 1 tube Paxgene de 3 ml,
- 1 tube sec de 9 ml,
- 1 tube EDTA de 4 ml.

Les PBMC seront isolées des autres populations cellulaires par gradient de ficoll, puis comptées. Une partie des cellules récupérées sera mise en culture pour l'analyse des populations lymphocytaires et co-culture avec les lymphocytes T du receveur ; l'autre partie sera conservée à -80°C sous forme de 2 à 10 aliquots, en fonction du nombre total de cellules recueillies, dans la biocollection de Nantes.

Pour l'ensemble des patients :

- Les 2 tubes EDTA de 5 ml seront envoyés immédiatement à Nantes pour l'extraction d'ADN. L'extraction se fera de façon groupée, par la plateforme génomique de l'inserm U1087 à Nantes L'ADN sera ensuite conservé au centre de Ressources biologique de Nantes pour analyse des polymorphismes génétiques.

- Les 2 tubes Li-Hep de 9 ml seront prélevés puis centrifugés (1800g – 10min – 4°C) par l'équipe de chaque centre.

Le surnageant ainsi obtenu (plasma) sera récupéré puis traité avec un inhibiteur de protéases (Complete Protease Inhibitor cocktail tablets-Roche), pour prévenir la dégradation des protéines. L'échantillon sera ensuite aliquoté en 6 cryotubes puis congelé à -80°C. 1 cryotube sera envoyé en carboglace à Grenoble à Mme Candice Trocme à l'adresse ci-dessous où il sera utilisé pour les expériences de SELDI-TOF.

GREPI TIMC-Imag UMR-CNRS 5525  
Laboratoire d'Enzymologie  
6<sup>ème</sup> étage unité E  
CHU de Grenoble  
38043 Grenoble cedex 09

Les 5 cryotubes de plasma restant seront envoyés en carboglace à l'institut du thorax de Nantes, pour la constitution de la biocollection.

L'institut du thorax, INSERM UMR 1087  
IRT-UN  
8 Quai Moncousu  
BP 70721  
44007 Nantes Cedex

- Le 1 tube Paxgene® de 3 ml sera prélevé pour l'extraction d'ARN. Après 12h minimum à température ambiante, puis 24h à -20°C, le tube Paxgene® sera conservé à -80°C dans chaque centre, avant envoi en carboglace à Nantes pour la constitution de la Bio-collection.

- Le tube sec de 10 ml sera prélevé puis centrifugé (1800g – 10min – 4°C) par l'équipe de chaque centre. Le surnageant ainsi obtenu (sérum) sera récupéré puis traité avec un inhibiteur de protéases (Complete Protease Inhibitor cocktail tablets-Roche), pour prévenir la dégradation des protéines. L'échantillon sera ensuite aliquoté en 4 cryotubes puis congelé à -80°C. Les 4 cryotubes seront envoyés en carboglace à l'institut du thorax de Nantes, pour la constitution de la biocollection.

L'institut du thorax, INSERM U1087  
IRT-UN  
8 Quai Moncousu  
BP 70721  
44007 Nantes Cedex 1

### **3.7.1.1.2 Biopsies de poumon natif**

Une biopsie de poumon natif sera réalisée lors de la transplantation. Elle sera congelée immédiatement et conservée à -80°C puis envoyées en carboglace à Nantes pour la constitution de la biocollection. A la fin de l'étude, une extraction d'ARN ainsi qu'une analyse d'hybridation par puce pangénomique seront réalisées.

### **3.7.1.2 Prélèvements réalisés en fonction de la prise en charge classique du patient**

Les prélèvements suivant seront réalisés selon les habitudes de chaque centre, uniquement s'ils sont indiqués dans la prise en charge ou le suivi classique du patient transplanté pulmonaire.

### **3.7.1.3 Lavages Broncho-alvéolaires (LBA)**

Les LBA seront réalisés selon les modalités habituelles de suivi de la population transplantée dans chaque centre. Brièvement, un échantillon de 5ml de LBA sera prélevé au cours d'une fibroscopie bronchique souple. Après une étape de centrifugation pour éliminer les cellules (2000g – 10min – 4°C), le surnageant récupéré sera traité avec des inhibiteurs de protéases (Complete Protease Inhibitor cocktail

tablets-Roche), aliquoté dans 6 cryotubes et conservé à -80°C. Un aliquot sera envoyé chaque mois au centre de Grenoble pour analyse et les 5 restants seront envoyés à Nantes pour la biocollection.

A partir des LBA qui seront récupérés au cours des visites V3 (suivi à 6 mois) et V4 (suivi à 1 an) 2 étapes supplémentaires seront ajoutés :

- transfert de 1,3ml de suspension de LBA de départ dans un cryotube, qui sera passé, rapidement dans l'azote liquide, puis congelé à -80°C avant envoi groupé à Nantes. Il sera ensuite transféré par Nantes au laboratoire de Lausanne à l'adresse ci-dessous, pour analyse du microbiome

Eric Bernasconi, PhD  
Service de Pneumologie - BH19-105  
Centre Hospitalier Universitaire Vaudois  
Bugnon 46  
CH-1011 Lausanne

- récupération du culot cellulaire de la première étape et ajout de 350µl de tampon RLT. L'échantillon sera ensuite vortexé, passé rapidement dans l'azote liquide, puis congelé à -80°C avant envoi groupé à Nantes. Il sera ensuite transféré par Nantes au laboratoire de Lausanne pour analyse de l'ARN cellulaire.

#### **3.7.1.3.1 Condensat de l'air exhalé**

Les condensats d'air exhalé seront collectés dans un système RTube®, conformément aux habitudes de suivi des patients transplantés pulmonaires de chaque centre

Le récipient en aluminium refroidissant sera conservé à -20°C. Avant analyse, le récipient en aluminium est placé sur l'extérieur d'une chambre de collection. Au cours de la respiration dans le tube, les valves unidirectionnelles dirigent l'air exhalé dans le récipient réfrigéré où l'échantillon est récupéré. Une collection de 10 minutes est nécessaire pour obtenir approximativement 2 ml de condensats d'air exhalé. Les échantillons de condensats d'air exhalé seront traités comme décrit précédemment pour les échantillons de LBA, aliquotés dans 4 cryotubes et conservés à -80°C avant envoi d'1 aliquot à Grenoble pour analyse et de 3 à Nantes pour la biocollection.

#### **3.7.1.3.2 Expectoration Induite**

L'expectoration induite sera obtenue selon la méthode de référence (63). Chaque sujet sera soumis à une spirométrie avant le recueil de l'expectoration induite. 3 aérosols de sérum salé hypertonique à 4.5% seront administrés après mouchage et rinçage de la bouche avec de l'eau en trois périodes de 7 mn séparées d'une période de 5 min (équivalent au temps de la spirométrie). Les aérosols de sérum hypertonique seront administrés grâce à un nébuliseur ultrasonique (Ultraneb 2000; DeVilbiss, Somerset, PA, USA), par un embout buccal, le

nez étant bouché. L'expectoration sera recueillie dans un récipient stérile et sera traitée dans l'heure qui suit la procédure.

Le VEMS sera mesuré avant puis après chaque période de nébulisation. En cas de chute de plus de 20 %, un traitement de 2 bouffées de Salbutamol (200µg) sera administré. Le patient sera ensuite libéré avec la possibilité de joindre un médecin investigateur au téléphone dans les 24h suivant la sortie.

Après sélection et pesage, les « plugs » seront dilués au demi dans une solution de dithiothreitol 0.1% (Poids/volume), agent réducteur qui détruit les glycoprotéines du mucus. L'échantillon est ensuite agité puis incubé 15 min à 37°C pour assurer une complète homogénéisation. Il est ensuite filtré sur une membrane de 70µm, puis centrifugé 10min à 2000g et 4°C pour séparer le surnageant des cellules.

Le surnageant est récupéré, aliquoté et conservé à -80°C pour une analyse protéomique ultérieure.

Pour l'analyse cytologique, le comptage, la viabilité cellulaire ainsi que l'analyse de la contamination par des cellules salivaires seront effectués au laboratoire d'Anatomo-Pathologie de chaque centre investigateur, selon la procédure habituelle de prise en charge de ces prélèvements. Dans le cas où la viabilité cellulaire et/ou la contamination par des cellules squameuses serait supérieure à 20%, l'échantillon ne serait pas utilisé.

Les échantillons ainsi obtenus seront enfin aliquotés dans 6 cryotubes et conservés à -80°C avant envoi d'1 aliquot à Grenoble pour analyse et de 5 à Nantes pour la biocollection.

### **3.7.2 Conservation des échantillons avant entrée dans la biocollection**

Comme indiqué ci-dessus, les aliquots de plasma ainsi que les surnageants d'expectoration induite, de LBA et de condensat d'air exhalé seront conservés à -80°C sur chaque site de prélèvement avant envoi groupé vers la biocollection de Nantes.

### **3.7.3 Transport des échantillons**

Les prélèvements sanguins destinés à l'analyse des populations lymphocytaires et dendritiques seront récupérés par transporteur le jour même du prélèvement et expédiés à température ambiante, pour une livraison le lendemain dans le laboratoire de Nantes.

Les prélèvements conservés à -80°C seront envoyés de manière groupée tous les mois à Nantes (Biocollection) et à Grenoble (étude du protéome). Le transport des échantillons se fera par un transporteur habilité à transporter des échantillons biologiques, dans des emballages homologués, conformes à la réglementation UN3373 en vigueur, qui seront fournis à chaque centre investigateur par le centre coordonnateur de Nantes.

La traçabilité des prélèvements sera effectuée à l'aide de fiches de traçabilité spécifiques de chaque visite et fournies par le centre coordonnateur.

### 3.7.4 Rattachement à la biocollection COLT

La cohorte COLT est rattachée à la collection COLT déclarée sous le programme cadre de l'institut du thorax du CHU de Nantes intitulé « Pathologies cardiaques, vasculaires, respiratoires, leurs facteurs de risque et leurs traitements ».

Ce programme déclaré sous le n° DC-2011-1399 a été validé par le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche le 20/01/2012.

La collection COLT est conservée au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Nantes.

Au-delà des 5 ans post-transplantation, le patient continuera à être suivi dans la cohorte mais les prélèvements destinés à la biocollection ne seront plus recueillis.

### 3.7.5 Analyse des prélèvements

#### 3.7.5.1 Phénotypage des LT et des DC dans le sang par cytométrie de flux

Le phénotypage des populations lymphocytaires présentes dans le sang circulant (Th1, Th2, Th17 et Treg) sera effectué par notre équipe (AVENIR, INSERM U1087) à Nantes.

La population de lymphocytes T régulateurs sera identifiée par l'expression conjointe des marqueurs de surface CD4+CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>. La production de cytokines par les lymphocytes sera aussi évaluée après marquage intracellulaire avec des anticorps anti-INF- $\gamma$ , IL-13 et IL-17 permettant ainsi de d'évaluer respectivement la proportion de lymphocytes Th1, Th2 et Th17.

L'intensité d'expression des co-récepteurs ICOS et CTLA4 par les lymphocytes sera étudiée spécifiquement.

Afin d'étudier les interactions DC-Lymphocytes T, des cellules dendritiques (DC) seront différenciées *in vitro* au laboratoire INSERM U915 à partir des monocytes sanguins du receveur (à M0 du donneur), selon la méthode couramment utilisée par notre équipe (Botturi K, ERJ, 2008). Brièvement, les monocytes sont séparés des lymphocytes par adhérence puis cultivés 24h en présence de facteurs de différenciation (GM-CSF, IL-4). Pendant ce temps, les lymphocytes sont gardés en culture. Après 24 heures de culture, un milieu contenant des médiateurs pro-inflammatoires (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, PGE2) est ajouté aux monocytes afin d'obtenir des cellules dendritiques matures. Les cellules dendritiques ainsi obtenues sont alors mises en contact avec les lymphocytes pendant 5 jours.

Le phénotype des lymphocytes (population Th1, Th2, Th17, Treg, expression d'ICOS, de CTLA-4) ainsi que leur production de cytokines suppressives et pro-inflammatoires sera évaluée par cytométrie de flux en présence et en l'absence de cellules dendritiques du transplanté ou du donneur. Le phénotype des cellules dendritiques du transplanté et du donneur sera lui aussi étudié par la même technique (expression d'IDO, HLA-DR, CD80, CD83, CD86, CD11c, IL-12p70, IL-10).

L'ensemble des résultats obtenus seront comparés entre transplantés développant une bronchiolite oblitérante et transplantés sans complication.

### **3.7.5.2 Mesure de l'IL-17 par ELISA**

Les surnageants de LBA, d'expectoration induite, de CAE ainsi que le plasma de patients conservés à -80°C seront décongelés afin de mesurer leur concentration en IL-17. Cette mesure sera réalisée par technique DuoSet ELISA (R&D System) selon les recommandations du fournisseur. Comme pour les paramètres précédents, les résultats obtenus seront comparés entre transplantés développant une bronchiolite oblitérante et transplantés sans complication.

### **3.7.5.3 Etude des polymorphismes génétiques**

La présence de polymorphismes génétiques sur les gènes d'intérêt : CTLA-4, TGF-beta, IL-6, TNF-alpha, IL-10, RANTES sera analysée par PCR. Pour chaque patient transplanté, l'ADN est extrait du sang total à l'aide d'un kit Nucleospin XL qui permet de récupérer environ 50 à 100 ng d'ADN pour 5ml de sang. L'ADN obtenu sera conservé à -20°C à Nantes dans le cadre de la bio-collection, afin d'être analysé ultérieurement. Le génotype des cytokines sera obtenu par technique de PCR-SSP en utilisant les kits commercialisés. Ces kits contiennent les primers spécifiques pour la détection des polymorphismes suivants : TNF- $\alpha$  (-308 G/A), TGF- $\beta$ 1 (+869, C/T codon 10, +915 C/G codon 25), IL-10 (-1082 G/A, -819 T/C, -592 A/C), IL-6 (-174 G/C), RANTES (-403 G/A, -109 T/C, -28 C/G) et CTLA-4 (-1147 T/C, -318 C/T, +49 A/C). Les fragments d'ADN codant pour chaque cytokine seront amplifiés selon les recommandations du fournisseur. Chaque génotype est ensuite associé à un phénotype : faible producteur de la cytokine d'intérêt, producteur intermédiaire, fort producteur, permettant ensuite de comparer la fréquence de ces phénotypes entre transplantés développant une bronchiolite oblitérante et transplantés sans complication.

### **3.7.5.4 Etude du niveau d'expression des transcrits**

Pour chaque patient, l'ARN sera extrait des cellules sanguines, des biopsies transbronchiques ou de la biopsie de poumon natif à l'aide d'un kit d'extraction d'ARN Leucolock. L'ARN ainsi obtenu sera conservé à -80°C à Nantes dans le cadre de la bio-collection, afin d'être analysé ultérieurement. La vérification de la qualité des ARN sera réalisée au moyen du Bioanalyzer d'Agilent Technologies, et la concentration des ARN sera obtenue par dosage par spectrométrie au moyen du Nanodrop (Nyxor). L'ARN sera ensuite rétrotranscrit, amplifié, marqué et hybridé sur des puces pan-génomiques 44k d'Agilent Technologies selon les recommandations du fabricant (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol). Les protocoles développés au laboratoire permettent de mesurer le transcriptome à partir de 100 ng d'ARN total.

Après lecture des puces à ADN, Le logiciel « Feature Extraction » développé par Agilent® pour l'analyse des puces sera utilisé afin de valider les hybridations. Une puce sera déclarée comme valide si le logiciel « Feature Extraction » la déclare valide (sur la base de la détection des « spikes » et des contrôles positifs et négatifs) et que le signal moyen n'est pas inférieur à 5 fois le signal moyen des autres puces.

### **3.7.5.5 Analyse du niveau d'expression protéique par SELDI-TOF**

Le niveau d'expression protéique sera mesuré dans les échantillons de plasma, LBA, Exl, et CAE puis comparé entre transplantés développant une bronchiolite oblitérante et transplantés sans complication.

Les échantillons stockés à -80°C seront décongelés et utilisés en une seule fois. Brièvement, les différents types d'échantillons (Plasma, surnageant d'Exl, de LBA, CAE) sont incubés sur des spots pendant 30 à 60 min. Les protéines non fixées sont enlevées par lavage, puis après séchage, la matrice SPA (sinapinique Acid) est appliquée sur chaque spot afin de permettre l'ionisation des protéines. Les puces sont ensuite placées dans un analyseur SELDI-TOF et les protéines retenues sur la matrice sont détachées par un laser. Les protéines vont alors voler dans un champ électrique avec une vitesse proportionnelle à leur masse et seront détectées par un analyseur de temps de vol. La quantité relative de chaque protéine est enfin déterminée par la hauteur de chaque pic obtenu.

## **3.8 Critères d'arrêt prématuré de la participation d'une personne à la recherche**

L'arrêt de participation à l'étude est défini par la volonté du patient de se retirer de la cohorte ou par le décès du patient. Lorsqu'un patient sera sorti d'étude, les données le concernant ne seront plus recueillies.

Les patients perdus de vue n'existent pas dans ce type de population, car leur survie nécessite un suivi et un traitement régulier.

## **4. DATA MANAGEMENT ET STATISTIQUES**

### **4.1 Recueil et traitement des données de l'étude**

#### **4.1.1 Recueil des données**

Une base de données COLT, servant de CRF électronique et regroupant toutes les informations nécessaires à l'étude sera créé à partir du portail de gestion « INTEGRALIS », actuellement en place à Nantes, en ajoutant les rubriques et items spécifiques à la cohorte COLT et en disséminant cette base sur les autres centres participants. Chaque patient pourra y être entré comme dans un cahier d'observation (CRF) classique. Toutes les informations requises par le protocole seront présentes dans la base COLT. Elle comprendra les données nécessaires pour confirmer le respect du protocole et toutes les données nécessaires aux analyses statistiques, ainsi que les données pour déceler les écarts majeurs au protocole.

Concernant les données cliniques, fonctionnelles et biologiques, ainsi que les résultats obtenus, ils seront entrés en temps réel par des attachés de recherche clinique (ARC) dans la base de données COLT.

Les paramètres biologiques d'intérêt (utilisés pour l'analyse des objectifs primaire et secondaires) seront recueillis dans chaque laboratoire de recherche impliqué dans l'étude COLT sans que les scientifiques en charge de ce recueil n'aient accès aux données cliniques au moment du technicage des échantillons.

Les paramètres qui nécessitent une interprétation médicale seront recueillis sur support papier par les médecins investigateurs au cours du suivi régulier des patients. Ces données seront ensuite entrées, contrôlées puis validées sur COLT par les ARC habilités à implémenter la base de données.

En ce qui concerne l'infrastructure technique de la base COLT, un serveur dédié à COLT sera mis en place, afin de garantir un maximum d'accessibilité et de performance sur l'utilisation de la base de données, compte tenu du fait qu'il sera accessible par tous les centres investigateurs du projet COLT. Ce serveur sera hébergé dans un DataCenter qui apporte toutes les garanties en termes de sécurité et de vitesse d'accès. Des comptes d'accès verrouillés seront délivrés à chaque personne participant à COLT et chargée de rentrer ou de monitorer les données. Des profils utilisateurs spécifiques seront créés pour les médecins investigateurs, les ARC chargés de saisir les données scientifiques et les ARC de la promotion (lecture seule des données, sans possibilité de saisie).

La qualité des données recueillies sera soumise à un audit externe croisé annuel dans chaque centre participant, ce qui permettra de contrôler la qualité des données collectées par rapport au dossier source de chaque patient. Le seuil d'erreur toléré sera fixé à 1 % sur tous les dossiers soumis à l'audit afin de valider la base de données.

Les résultats biologiques (analyses des critères de jugement principal et secondaires) ne seront pas communiqués aux pneumologues en charge du suivi des patients de sorte que la prise en charge ne sera pas modifiée.

#### **4.1.2 Codage des données**

En signant ce protocole l'investigateur principal et l'ensemble des co-investigateurs s'engagent à maintenir confidentielles les identités des patients ou patientes qui ont participé à l'étude.

La transmission des données d'une personne à des fins de recherche ne sera dès lors possible que sous réserve de l'apposition d'un système de codage ; la présentation des résultats de la recherche doit exclure toute identification directe ou indirecte.

Le codage des patients se fera de la manière suivante La première lettre du nom, la première lettre du prénom, et la date de naissance seront les seules informations qui figureront dans la base de données et qui permettront de rattacher à posteriori le CRF au patient.

Le responsable de la recherche est également tenu de rendre anonyme tous les documents qu'il pourrait avoir en sa possession (compte-rendus d'examen d'imagerie, de biologie, ...) qui seraient joints au CRF.

Conformément aux dispositions concernant la confidentialité des données auxquelles ont accès les personnes chargées du contrôle de qualité d'une recherche biomédicale (article L.1121-3 du code de la santé publique), conformément aux dispositions relatives à la confidentialité des informations concernant notamment la nature des médicaments expérimentaux, les essais, les personnes qui s'y prêtent et les résultats obtenus (article R. 5121-13 du code de la santé publique), les personnes ayant un accès direct prendront toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives aux médicaments expérimentaux, aux essais, aux personnes qui s'y prêtent et notamment en ce qui concerne leur identité ainsi qu'aux résultats obtenus.

Ces personnes, au même titre que les investigateurs eux-mêmes, sont soumises au secret professionnel (selon les conditions définies par les articles 226-13 et 226-14 du code pénal).

Les adresses postales des patients inclus dans la cohorte seront recueillies à des fins de géocodage. Cependant, celles-ci seront collectées dans un fichier séparé des données cliniques, associées à un identifiant spécifique, et adressées à l'équipe du laboratoire INSERM U823 à Grenoble, chargée du géocodage. Une fois les adresses géocodées à partir des données du cadastre et associées à l'estimation des niveaux d'exposition aux polluants atmosphériques, le laboratoire transmettra le fichier comprenant les identifiants spécifiques et les niveaux d'exposition associés au CHU de Nantes qui sera seul en mesure de croiser ces informations avec les identifiants des patients. Au terme de cette procédure, les adresses seront détruites. L'autorisation de la CNIL pour le recueil des adresses postales des patients a été obtenue en date du 11/10/2013.

#### **4.1.3 Traitement des données**

La collecte des données cliniques reposera sur la mise en place d'une base de données clinique COLT et la création de masques de saisie en conformité avec le protocole et les réglementations actuellement en vigueur.

L'implémentation de la base de données se fera avec l'aide de l'attaché de recherche clinique

La structure de la base de données et des écrans de saisie seront approuvés par le promoteur de l'essai.

#### **4.1.4 Statistiques**

Les responsables des analyses statistiques seront Véronique Sébille (Plateforme Biostatistique - Département Promotion de la Recherche Clinique, CHU de Nantes et EA 4275), Emmanuel Nowak (Centre d'Investigation Clinique de Brest INSERM CIC 0502, Hôpital de la Cavale Blanche) et Rémi Houlgatte (Plateforme Pucés à ADN de Nantes, et INSERM U915).

## **4.2 Description des méthodes statistiques prévues, y compris du calendrier des analyses intermédiaires prévues**

Des analyses descriptives seront réalisées pour l'ensemble des variables recueillies et des estimations ponctuelles et par intervalles de confiance à 95% seront fournies pour les variables qualitatives et quantitatives. En cas de non normalité des distributions (attestée par un test de Kolmogorov-Smirnov), les médianes et intervalles interquartiles des variables correspondantes seront fournis. La distribution de survenue d'une BO au cours du suivi sera estimée à l'aide de la méthode de Kaplan-Meier.

### **4.2.1 Tests statistiques utilisés**

#### Analyse statistique portant sur les populations lymphocytaires :

Dans un premier temps, l'association entre la cinétique d'évolution des populations lymphocytaires Th1, Th2, Th17 et Treg dans le sang et la probabilité de survenue d'une BO au cours du suivi sera évaluée à l'aide d'un modèle à risques proportionnels de Cox incluant des covariables dépendant du temps (populations lymphocytaires).

Dans un deuxième temps, la valeur pronostique des populations lymphocytaires précédemment identifiées comme étant associées à la survenue d'une BO sera appréciée à l'aide de courbes de ROC dépendantes du temps (Heagerty PJ, Lumley T, and Pepe SP. Time-Dependent ROC Curves for Censored Survival Data and a Diagnostic Marker. *Biometrics* 2000;56:337-344.) adaptées au plan expérimental longitudinal et temps-dépendant. Cette approche méthodologique permettra d'estimer les sensibilités et spécificités des marqueurs d'intérêt dépendants du temps et de calculer l'aire sous les courbes de ROC permettant d'évaluer le pouvoir prédictif de ces marqueurs (l'aire sous la courbe étant d'autant plus grande que leur valeur pronostique est élevée).

L'association, avec la probabilité de survenue de BO au cours du suivi, et l'évaluation de la valeur pronostique de la cinétique d'évolution des critères suivants seront appréciées selon la même stratégie que celle décrite précédemment :

- proportions de cellules T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>, CTLA4<sup>+</sup>, de cellules ICOS<sup>+</sup> et de cellules exprimant l'indoleamine 2, 3 dioxygénase après co-cultures en présence :
  - o de DC-TC du transplanté
  - o de DC du donneur et TC du transplanté
- concentrations d'IL-17 dans les surnageants de LBA et d'expectoration induite, de CAE et dans le plasma, mesurées par ELISA

#### Analyse statistique des données génétiques :

L'analyse des données génétiques relatives aux gènes codant pour des cytokines vise à comparer la fréquence des phénotypes : faible producteur de cytokines, producteur intermédiaire de cytokines et fort producteur de cytokines chez les patients indemne de BO et les patients ayant développé une BO lors de l'étude. A cet effet, un score global de production de cytokines sera tout d'abord calculé pour chaque patient en additionnant les scores (faible=0, intermédiaire=1, fort=2) propres à chacun des gènes TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1, IL-10 et IL-6 et RANTES (64). L'influence de ce score composite sur la survenue de la BO sera alors évaluée par régression logistique. La contribution individuelle de chaque gène sera aussi testée séparément.

Concernant CTLA4, pour lequel on ne dispose pas de phénotype établi comme pour les cytokines, le test de tendance de Cochran-Armitage sera appliqué à chacun des 3 polymorphismes génotypés. L'influence potentielle des haplotypes formés par ces 3 loci sera aussi testée par une méthode prenant correctement en compte l'incertitude qui leur est associée (65).

Une analyse du délai de survenue de la BO analogue à celle décrite ci-dessus mais par modèle de régression de Cox pourra être envisagée. Celle-ci permettra d'affiner la première analyse où la survenue de la BO est traitée comme un événement binaire.

#### Analyse statistique des données du transcriptome :

En ce qui concerne spécifiquement les données du transcriptome, après normalisation et filtrage des données, celles-ci seront visualisées au moyen de classifications hiérarchiques (Eisen et al. 1998). Les gènes différemment exprimés entre les prélèvements issus de patients porteurs de bronchiolite oblitérante ou sans complication de la transplantation, seront recherchés par test t de Student ou par la méthode SAM (Tusher, Tibshirani, and Chu 2001)

#### Analyse statistique des données du protéome :

Les profils protéiques seront analysés avec le logiciel Ciphergen Express Client 3.0. Les pics protéiques (en Da) seront estimés présents ou absents, selon si leur rapport signal/bruit est respectivement  $>5$  ou  $<5$ . Un test-U de Mann et Whitney sera appliqué pour comparer les intensités (le rapport signal/bruit des pics) au sein des 2 populations. Les protéines dont la valeur de p est inférieure à 0.05 (après correction des tests multiples) seront considérées comme statistiquement significatives.

La performance des pics d'intérêts identifiés sera aussi évaluée par l'analyse des courbes ROC (logiciel SPSS version 12).

Dans un second temps, un algorithme diagnostique associant plusieurs marqueurs (discriminants seuls ou non) sera construit (test de régression) pour augmenter la performance des pics d'intérêts pris individuellement (logiciel Biomarker Pattern®).

### **4.2.2 Analyses en sous groupes prévues**

Des analyses en sous-groupes seront effectuées chez les sujets porteurs de mucoviscidose et ceux porteurs d'une autre pathologie. L'identification des facteurs de risque de survenue d'une BO sera réalisée selon la stratégie décrite dans le paragraphe 10.1.2. (Tests statistiques utilisés).

#### **4.2.3 Degré de signification statistique prévu**

Pour l'ensemble des données, le degré de signification statistique sera de 5%.

#### **4.2.4 Critères statistiques d'arrêt de la recherche**

Non applicable

#### **4.2.5 Méthode de prise en compte des données manquantes, inutilisées ou non valides**

Les données manquantes seront décrites en termes d'effectifs et pourcentages correspondants par temps et par groupe (BO ou absence de BO à la fin du suivi). Les données manquantes ne seront pas remplacées.

#### **4.2.6 Gestion des modifications apportées au plan d'analyse de la stratégie initiale**

Non applicable

#### **4.2.7 Choix des personnes à inclure dans les analyses**

Tous les patients inclus et transplantés dans l'étude seront pris en compte dans les analyses.

## **5. SECURITE / EFFET INDESIRABLE**

La survenue d'un Effet Indésirable lié à la prise en charge du patient au cours du présent protocole donnera lieu à une déclaration dans le système de vigilance adéquat (pharmacovigilance, biovigilance, hémovigilance, matériovigilance, etc...).

## **6. ASPECTS ADMINISTRATIFS ET REGLEMENTAIRES**

### **6.1 *Droit d'accès aux données et documents source***

Les données médicales de chaque patient ne seront transmises qu'à l'organisme de rattachement de la personne responsable de la recherche ou toute personne dûment habilitée par celui-ci, et, le cas échéant, aux autorités sanitaires habilitées, dans les conditions garantissant leur confidentialité.

Le cas échéant, l'organisme de rattachement de la personne responsable de la recherche pourra demander un accès direct au dossier médical pour vérification des procédures et/ou des données de l'essai clinique, sans violer la confidentialité et dans les limites autorisées par les lois et régulations.

### **6.2 *Données informatisées et soumission à la CNIL***

Les données recueillies au cours de l'étude seront conservées dans un fichier informatique respectant la loi « informatique et libertés » du 6 janvier 1978 modifiée en 2004 ainsi que la méthodologie de référence pour le traitement des données personnelles, opérés dans le cadre des recherches biomédicales (MR 001).

Le protocole a été soumis à l'avis du CCTIRS, et le traitement informatisé a reçu l'autorisation de la CNIL.

### **6.3 *Amendements au protocole***

Le protocole modifié devra faire l'objet d'une version actualisée datée.  
La note d'information devra faire l'objet de modification si nécessaire.

### **6.4 *Règles relatives à la publication***

Une copie de la publication sera remise au CHU de Nantes, responsable de la recherche de l'étude, qui sera nécessairement cité. Les auteurs seront déterminés au prorata du nombre de patients inclus. L'investigateur coordonnateur établit la liste des auteurs.

En cas de soutien financier par la DGOS :

Toute publication mentionnera le soutien financier par la DGOS par la mention suivante : « This study is funded by the "Département général de l'offre de soins" (DGOS, French Ministry of Health) »

## **7. CONSIDERATIONS ETHIQUES**

### ***7.1 Information et recueil du consentement écrit du patient***

#### Consentement des sujets transplantés :

L'investigateur s'engage à informer le patient de façon claire et juste du protocole et à lui demander un consentement éclairé et écrit pour la biocollection (notice d'information et formulaire de recueil de consentement en annexe). Il remettra au patient un exemplaire de la notice d'information ainsi qu'un formulaire de recueil de consentement pour la biocollection pathologies pulmonaires (décrivant le but de la biocollection). Le patient ne pourra être inclus dans l'étude qu'après avoir pris connaissance de la notice d'information ainsi que signé et daté le formulaire de recueil de consentement pour la biocollection. L'investigateur doit également signer et dater le formulaire de recueil de consentement pour la biocollection. Ces deux documents seront délivrés sur papier en 3 exemplaires afin que le patient et l'investigateur puissent chacun en garder un exemplaire. L'original de l'investigateur sera classé dans le classeur investigateur.

L'information du patient et le recueil du consentement de la biocollection auront lieu au moment de l'intention d'inscription du patient sur liste de transplantation pulmonaire ou du bilan pré-greffe. L'investigateur notera dans le dossier du patient que celui-ci a bien été informé oralement, a reçu la note d'information et a donné son accord pour participer à la cohorte.

#### Cas du prélèvement sur donneur décédé

En ce qui concerne le prélèvement sur donneur décédé, le praticien doit s'assurer que la personne n'a pas fait connaître de son vivant son refus au prélèvement à des fins scientifiques, en consultant le registre national des refus tenu auprès de l'agence de la biomédecine. Dans le cas où le praticien n'a pas directement connaissance de la volonté du défunt, il s'efforce de recueillir auprès de ses proches, l'opposition au don que celui-ci aurait pu éventuellement exprimer de son vivant. Il remettra aussi aux proches une notice d'information présentant la finalité du prélèvement (recherches scientifiques).

## ***LISTE DES ANNEXES***

- Annexe 1 : Bibliographie
- Annexe 2 : Thésaurus COLT (liste des items à recueillir dans la base de données)
- Annexe 3 : Listing des centres participants
- Annexe 4 : Notice d'information patients majeurs
- Annexe 5 : Notice d'information patients mineurs ou inclus en situation d'urgence
- Annexe 6 : Formulaire de recueil de consentement biocollection
- Annexe 7 : Flow chart
- Annexe 8 : critères de diagnostic de BO

## **ANNEXE 1 : REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Biomédecine Ad. 2007.
2. Trulock EP, Christie JD, Edwards LB, Boucek MM, Aurora P, Taylor DO, et al. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult lung and heart-lung transplantation report-2007. *J Heart Lung Transplant* 2007;26(8):782-95.
3. Wilkes DS, Egan TM, Reynolds HY. Lung transplantation: opportunities for research and clinical advancement. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172(8):944-55.
4. Magnan A, Mege JL, Escallier JC, Brisse J, Capo C, Reynaud M, et al. Balance between alveolar macrophage IL-6 and TGF-beta in lung-transplant recipients. Marseille and Montreal Lung Transplantation Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153(4 Pt 1):1431-6.
5. Magnan A, Mege JL, Reynaud M, Thomas P, Capo C, Garbe L, et al. Monitoring of alveolar macrophage production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in lung transplant recipients. Marseille and Montreal Lung Transplantation Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150(3):684-9.
6. Reynaud-Gaubert M, Thomas P, Badier M, Cau P, Giudicelli R, Fuentes P. Early detection of airway involvement in obliterative bronchiolitis after lung transplantation. Functional and bronchoalveolar lavage cell findings. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161(6):1924-9.
7. Reynaud-Gaubert M, Marin V, Thirion X, Farnarier C, Thomas P, Badier M, et al. Upregulation of chemokines in bronchoalveolar lavage fluid as a predictive marker of post-transplant airway obliteration. *J Heart Lung Transplant* 2002;21(7):721-30.
8. Mamessier E, Milhe F, Badier M, Thomas P, Magnan A, Reynaud-Gaubert M. Comparison of induced sputum and bronchoalveolar lavage in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2006;25(5):523-32.
9. Mamessier E, Lorec AM, Thomas P, Badier M, Magnan A, Reynaud-Gaubert M. T regulatory cells in stable posttransplant bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation* 2007;84(7):908-16.
10. Botturi K, Lacoëuille Y, Thomas P, Boniface S, Reynaud-Gaubert M, Magnan A. CTLA-4-mediated regulatory phenotype of T-cells in tolerant lung recipients. *Eur Respir J* 2008;31(6):1167-76.
11. Sato M, Keshavjee S. Bronchiolitis obliterans syndrome: alloimmune-dependent and -independent injury with aberrant tissue remodeling. *Semin Thorac Cardiovasc Surg* 2008;20(2):173-82.
12. Ashton-Chess J, Giral M, Soullillou JP, Brouard S. Can immune monitoring help to minimize immunosuppression in kidney transplantation? *Transpl Int* 2008.
13. Bullens DM, Truyen E, Coteur L, Dilissen E, Hellings PW, Dupont LJ, et al. IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir Res* 2006;7:135.
14. Vanaudenaerde BM, De Vleeschauwer SI, Vos R, Meyts I, Bullens DM, Reynders V, et al. The role of the IL23/IL17 axis in bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *Am J Transplant* 2008;8(9):1911-20.

15. Snell GI, Levvey BJ, Zheng L, Bailey M, Orsida B, Williams TJ, et al. Interleukin-17 and airway inflammation: a longitudinal airway biopsy study after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2007;26(7):669-74.
16. Cottrez F, Groux H. Specialization in tolerance: innate CD(4+)CD(25+) versus acquired TR1 and TH3 regulatory T cells. *Transplantation* 2004;77(1 Suppl):S12-5.
17. Stassen M, Schmitt E, Jonuleit H. Human CD(4+)CD(25+) regulatory T cells and infectious tolerance. *Transplantation* 2004;77(1 Suppl):S23-5.
18. Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004;16(11):1643-56.
19. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198(12):1875-86.
20. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4(4):330-6.
21. Banham AH. Cell-surface IL-7 receptor expression facilitates the purification of FOXP3(+) regulatory T cells. *Trends Immunol* 2006;27(12):541-4.
22. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006;203(7):1693-700.
23. Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006;203(7):1701-11.
24. Joffre O, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P, et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat Med* 2008;14(1):88-92.
25. Meloni F, Vitulo P, Bianco AM, Paschetto E, Morosini M, Cascina A, et al. Regulatory CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome. *Transplantation* 2004;77(5):762-6.
26. Rogers NJ, Lechler RI. Allorecognition. *Am J Transplant* 2001;1(2):97-102.
27. Eagar TN, Karandikar NJ, Bluestone JA, Miller SD. The role of CTLA-4 in induction and maintenance of peripheral T cell tolerance. *Eur J Immunol* 2002;32(4):972-81.
28. Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 2000;164(7):3596-9.
29. Boasso A, Herbeuval JP, Hardy AW, Winkler C, Shearer GM. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4+ T cells. *Blood* 2005;105(4):1574-81.
30. Schmitz V, Neumann UP, Fischer U, Langrehr J, Neuhaus P. Induction of long-term graft acceptance by a combination treatment of donor splenocytes and CTLA4Ig in a high responder rat liver transplantation model. *Transpl Int* 2005;18(10):1187-96.
31. Perkins JD. The influence of CTLA-4 gene polymorphisms on liver transplant outcomes. *Liver Transpl* 2006;12(10):1552-3.

32. Pawlik A, Domanski L, Rozanski J, Czerny B, Juzyszyn Z, Dutkiewicz G, et al. The association between cytokine gene polymorphisms and kidney allograft survival. *Ann Transplant* 2008;13(2):54-8.
33. Awad MR, Webber S, Boyle G, Sturchi C, Ahmed M, Martell J, et al. The effect of cytokine gene polymorphisms on pediatric heart allograft outcome. *J Heart Lung Transplant* 2001;20(6):625-30.
34. Sankaran D, Asderakis A, Ashraf S, Roberts IS, Short CD, Dyer PA, et al. Cytokine gene polymorphisms predict acute graft rejection following renal transplantation. *Kidney Int* 1999;56(1):281-8.
35. Sarwal M, Chua MS, Kambham N, Hsieh SC, Satterwhite T, Masek M, et al. Molecular heterogeneity in acute renal allograft rejection identified by DNA microarray profiling. *N Engl J Med* 2003;349(2):125-38.
36. Maluf DG, Mas VR, Archer KJ, Yanek K, Gibney EM, King AL, et al. Molecular pathways involved in loss of kidney graft function with tubular atrophy and interstitial fibrosis. *Mol Med* 2008;14(5-6):276-85.
37. Martinez-Llordella M, Puig-Pey I, Orlando G, Ramoni M, Tisone G, Rimola A, et al. Multiparameter immune profiling of operational tolerance in liver transplantation. *Am J Transplant* 2007;7(2):309-19.
38. Braud C, Baeten D, Giral M, Pallier A, Ashton-Chess J, Braudeau C, et al. Immunosuppressive drug-free operational immune tolerance in human kidney transplant recipients: Part I. Blood gene expression statistical analysis. *J Cell Biochem* 2008;103(6):1681-92.
39. Brouard S, Mansfield E, Braud C, Li L, Giral M, Hsieh SC, et al. Identification of a peripheral blood transcriptional biomarker panel associated with operational renal allograft tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104(39):15448-53.
40. Xu X, Golden JA, Dolganov G, Jones KD, Donnelly S, Weaver T, et al. Transcript signatures of lymphocytic bronchitis in lung allograft biopsy specimens. *J Heart Lung Transplant* 2005;24(8):1055-66.
41. Lu BS, Yu AD, Zhu X, Garrity ER, Jr., Vigneswaran WT, Bhorade SM. Sequential gene expression profiling in lung transplant recipients with chronic rejection. *Chest* 2006;130(3):847-54.
42. Lande JD, Patil J, Li N, Berryman TR, King RA, Hertz MI. Novel insights into lung transplant rejection by microarray analysis. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4(1):44-51.
43. Magi B, Bargagli E, Bini L, Rottoli P. Proteome analysis of bronchoalveolar lavage in lung diseases. *Proteomics* 2006;6(23):6354-69.
44. de Torre C, Ying SX, Munson PJ, Meduri GU, Suffredini AF. Proteomic analysis of inflammatory biomarkers in bronchoalveolar lavage. *Proteomics* 2006;6(13):3949-57.
45. Plymoth A, Yang Z, Lofdahl CG, Ekberg-Jansson A, Dahlback M, Fehniger TE, et al. Rapid proteome analysis of bronchoalveolar lavage samples of lifelong smokers and never-smokers by micro-scale liquid chromatography and mass spectrometry. *Clin Chem* 2006;52(4):671-9.
46. Wattiez R, Falmagne P. Proteomics of bronchoalveolar lavage fluid. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;815(1-2):169-78.
47. Merkel D, Rist W, Seither P, Weith A, Lenter MC. Proteomic study of human bronchoalveolar lavage fluids from smokers with chronic obstructive pulmonary disease by combining surface-enhanced laser desorption/ionization-mass

spectrometry profiling with mass spectrometric protein identification. *Proteomics* 2005;5(11):2972-80.

48. Bowler RP, Duda B, Chan ED, Enghild JJ, Ware LB, Matthay MA, et al. Proteomic analysis of pulmonary edema fluid and plasma in patients with acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2004;286(6):L1095-104.

49. Corradi M, Pignatti P, Manini P, Andreoli R, Goldoni M, Poppa M, et al. Comparison between exhaled and sputum oxidative stress biomarkers in chronic airway inflammation. *Eur Respir J* 2004;24(6):1011-7.

50. Tsoumakidou M, Tzanakis N, Siafakas NM. Induced sputum in the investigation of airway inflammation of COPD. *Respir Med* 2003;97(8):863-71.

51. Gessner C, Scheibe R, Wotzel M, Hammerschmidt S, Kuhn H, Engelmann L, et al. Exhaled breath condensate cytokine patterns in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med* 2005;99(10):1229-40.

52. Brightling CE. Clinical applications of induced sputum. *Chest* 2006;129(5):1344-8.

53. Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled biomarkers. *Chest* 2006;130(5):1541-6.

54. Gianazza E, Allegra L, Bucchioni E, Eberini I, Puglisi L, Blasi F, et al. Increased keratin content detected by proteomic analysis of exhaled breath condensate from healthy persons who smoke. *Am J Med* 2004;117(1):51-4.

55. Nicholas B, Skipp P, Mould R, Rennard S, Davies DE, O'Connor CD, et al. Shotgun proteomic analysis of human-induced sputum. *Proteomics* 2006;6(15):4390-401.

56. Sloane AJ, Lindner RA, Prasad SS, Sebastian LT, Pedersen SK, Robinson M, et al. Proteomic analysis of sputum from adults and children with cystic fibrosis and from control subjects. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172(11):1416-26.

57. Schaub S, Rush D, Wilkins J, Gibson IW, Weiler T, Sangster K, et al. Proteomic-based detection of urine proteins associated with acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(1):219-27.

58. El Essawy B, Otu HH, Choy B, Zheng XX, Libermann TA, Strom TB. Proteomic analysis of the allograft response. *Transplantation* 2006;82(2):267-74.

59. Wittke S, Haubitz M, Walden M, Rohde F, Schwarz A, Mengel M, et al. Detection of acute tubulointerstitial rejection by proteomic analysis of urinary samples in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2005;5(10):2479-88.

60. Nelsestuen GL, Martinez MB, Hertz MI, Savik K, Wendt CH. Proteomic identification of human neutrophil alpha-defensins in chronic lung allograft rejection. *Proteomics* 2005;5(6):1705-13.

61. Zhang Y, Wroblewski M, Hertz MI, Wendt CH, Cervenka TM, Nelsestuen GL. Analysis of chronic lung transplant rejection by MALDI-TOF profiles of bronchoalveolar lavage fluid. *Proteomics* 2006;6(3):1001-10.

62. Merchant M, Weinberger SR. Recent advancements in surface-enhanced laser desorption/ionization-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis* 2000;21(6):1164-77.

63. Iredale MJ, Wanklyn SA, Phillips IP, Krausz T, Ind PW. Non-invasive assessment of bronchial inflammation in asthma: no correlation between eosinophilia of induced sputum and bronchial responsiveness to inhaled hypertonic saline. *Clin Exp Allergy* 1994;24(10):940-5.

64. Perrey C, Pravica V, Sinnott PJ, Hutchinson IV. Genotyping for polymorphisms in interferon-gamma, interleukin-10, transforming growth factor-beta 1 and tumour necrosis factor-alpha genes: a technical report. *Transpl Immunol* 1998;6(3):193-7.
65. Schaid DJ, Rowland CM, Tines DE, Jacobson RM, Poland GA. Score tests for association between traits and haplotypes when linkage phase is ambiguous. *Am J Hum Genet* 2002;70(2):425-34.
66. Nam JM. A simple approximation for calculating sample sizes for detecting linear trend in proportions. *Biometrics* 1987;43(3):701-5.