



Année universitaire 2015-2016

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

DES de Médecine Générale
DESC d'Allergologie et d'Immunologie Clinique

par

Luc COLAS
né le 8 mai 1987 à Montpellier

Présentée et soutenue publiquement le 26 septembre 2016

Protocole PREVALL DP, étude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T doubles positifs CD4⁺ CD8 α induits par une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans l'asthme allergique, la dermatite atopique et la rhinite allergique : conception et mise en place.

Président : Monsieur le Professeur Antoine MAGNAN

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Antoine MAGNAN

REMERCIEMENTS

A Nicholas, mon amour et futur mari,

Je ne te dédie pas cette thèse car pour ne pas te citer « J'ai perdu le fil après lymphocytes » !

Je te remercie de ta patience, ton écoute (parfois malgré toi !) et ton amour que tu sais me prodiguer au quotidien (à ta façon !) malgré des moments difficiles depuis le début de ce « fâcheux internat ».

En tout cas, que de chemin parcouru à tes côtés (...) pour le meilleur et pour le pire. « The best is yet to come » for us two !

Tout simplement MERCI

Avec tout mon amour

Ton Kinder

A ma famille (mon mère, mon père et ma soeur),

Je ne vous dédie pas non plus cette thèse...tout simplement car c'est un peu trop conventionnel !

Je préfère vous remercier pour votre soutien indéfectible depuis que j'ai choisis d'être médecin dont le plus beau retour en ce jour important est la fierté que je peux lire dans vos yeux !

Pour conclure, Papa et Maman vous pouvez enfin vous reposer...vos enfants ont enfin fini leur études ! Et ce n'est pas peu dire :-)

Avec tout mon amour

Votre fils et ton petit frère

Au Pr Antoine Magnan,

Je profite de cette page moins formelle pour non seulement remercier le Professeur mais également l'homme qui me connaît depuis la quatrième année de médecine !

Merci de votre confiance.

Merci de m'avoir permis de m'épanouir dans l'allergologie et l'immunologie.

Au Pr Francine Jotereau,

qui est à l'initiative de PREVALL DP.

Merci de m'avoir embarqué dans le monde fascinant du microbiote intestinal et des DP8αα.

Merci pour ta disponibilité et de tes conseils. Je suis impatient de continuer l'aventure à tes côtés.

En quelque sorte, cette thèse est ton idée !

Au Dr Claire Bernier,

Tout d'abord merci d'être présente aujourd'hui !

Merci de m'avoir prêté ton nom pour ce que tu appelles avec modestie ta « grande imposture ».

Sans toi, PREVALL DP n'aurait jamais vu le jour !

Merci de ton implication dans PREVALL DP mais également dans ma formation d'allergologue en devenir !

Je me réjouis d'avance de pouvoir travailler à tes côtés.

Au Dr Anaïs Pipet,

Merci pour tes qualités de formatrice si complémentaires à celles de Claire.

Merci pour tes qualités humaines !

Merci pour nos discussions parfois lointaines de l'allergologie mais si enrichissantes :-)

Je me réjouis également d'avance de pouvoir travailler à tes côtés.

Aux Prs Hamidou et Blanco,

Merci d'accepter de participer à ce jury de thèse...sans quoi, je ne pourrai être « Docteur » !

A Aurélie dit « Paupiette »,

Vive l'Allergologie !

Non seulement parce que c'est la meilleure spécialité médicale (sans aucun parti pris...croyez moi !) mais aussi parce qu'elle nous a permis de nous rencontrer au détour d'un séminaire de médecine générale.

Merci pour cette belle amitié tant professionnelle et personnelle !

A toute l'équipe 6 de l'UMR 1087,

Merci à Carole, Gregory, Laure, Maxim, Eugénie, Jennifer, Kelly et Martin qui se cachent derrière cet acronyme barbare pour des oreilles non averties !

Merci pour cette année supplémentaire passée en grande partie à vos côtés.

Merci pour votre accueil, votre bonne humeur permanente, votre soutien, votre professionnalisme. On se retrouve pour les réunions d'équipe...Ben oui, je ne compte pas partir comme ça !

Aux médecins allergologues de l'AMAAN,

Merci de m'avoir accueillis !

Merci de permettre à PREVALL DP d'exister.

A toutes les personnes que je n'ai pas encore nommées qui partagent de près ou de loin ma vie,
MERCI !

SOMMAIRE

INTRODUCTION

PREMIERE PARTIE : Paysage de la recherche clinique en France

LISTE DES ABBREVIATIONS (p.2)

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX (p.3)

DEFINITION ET REGLEMENTATION DE LA RECHERCHE CLINIQUE (p.4)

1. Définition de la recherche clinique (p.4)
2. De l'utilité de la recherche clinique (...) (p.6)
3. (...) à sa typologie (p.8)

PRINCIPAUX INTERVENANTS ET STRUCTURES IMPLIQUÉES DANS LE RECHERCHE CLINIQUE (p.10)

1. Le promoteur (p.10)
2. Les investigateurs (p.10)
3. Les patients (p.10)
4. Le CPP (p.10)
5. Le CCTIRS/CNIL (p.12)
6. L'ANSM (p.12)
7. La DRCI (p.12)

LA VIE D'UNE ETUDE DE RECHERCHE CLINIQUE (p.13)

CONCLUSION (p.14)

ANNEXES (p.15)

BIBLIOGRAPHIE (p.21)

SECONDE PARTIE : De l'idée initiale à la conception de l'étude (...) en passant par le rationnel

LISTE DES ABBREVIATIONS (p.23)

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX (p.25)

DE L'IDEE INITIALE (...)

(...) AUX LES LYMPHOCYTES T DOUBLES POSITIFS CD4+ CD8 $\alpha\alpha$ (...)

(...) EN PASSANT PAR LE MICROBIOTE ET SON IMPACT SUR LES MALADIES ALLERGIQUES (...)

1. Généralités sur les microbiotes.
2. Le microbiote bactérien intestinal
3. Le microbiote intestinal et le système immunitaire
4. Les dysbioses intestinales et les maladies allergiques

(...) PUIS PAR FAECALIBACTERIUM PRAUSNITZII (...)

(...) JUSQU'A LA CONCEPTION DU PROTOCOLE

1. Présentation du protocole PREVALL DP
2. Les patients allergiques
3. Les volontaires sains
4. La méthodologie
5. La stratégie initiale d'analyse des DP8 $\alpha\alpha$ totaux et spécifiques de F.prau
6. Le budget
7. Soumissions aux autorités compétentes

ANNEXES (p.44)

BIBLIOGRAPHIE (p.187)

TROISIEME PARTIE : Mise en place du protocole PREVALL DP

LISTE DES ABBREVIATIONS (p.192)

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX (p.193)

LA STRATEGIE INITIALE DE MISE EN PLACE DU PROTOCOLE PREVALL DP (p.194)

1. Définitions des acteurs et de leurs rôles respectifs (p.194)
2. Les échantillons sanguins provenant de Biofortis (p.195)
3. Concernant l'inclusion des patients allergiques (p.196)
4. Concernant les échantillons sanguins provenant de la PFTA (p.196)
5. Concernant le stockage de la bio-collection des PBMC GOMMS et PREVALL DP (p. 197)
6. Concernant le budget de l'étude (p.198)
7. Concernant les e-CRF (p.198)

EVALUATION ET RECTIFICATION DE LA STRATEGIE INITIALE DE MISE EN PLACE A 6 MOIS (p. 200)

BILAN ACTUEL ET PERSPECTIVES (p.205)

ANNEXES (p.209)

BIBLIOGRAPHIE (p.245)

QUATRIEME PARTIE : Mise en place des stratégies d'analyse des lymphocytes T doubles positifs CD4+ CD8αα spécifiques de *F.prau*

LISTE DES ABBREVIATIONS (p.246)

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX (p.248)

INTRODUCTION (p.249)

MATERIELS ET METHODES (p.250)

1. Patients (p.250)
2. Extraction des PBMC à partir du sang total (p.250)
3. Enrichissement en monocytes CD14+ par tri magnétique (p.250)
4. Tri et clonage des DP8 $\alpha\alpha$ (p.250)
5. Obtention et préparation des symbions (*F.prau* et *B.thet*) (p.251)
6. Détection des DP8 $\alpha\alpha$ spécifiques de *F.prau* via le CD40L (CD154) (p.252)
7. Cytométrie de flux (CMF) (p.252)
8. Les analyses statistiques (p.254)

RESULTATS (p.257)

1. Taux de DP8 $\alpha\alpha$ sur sang total chez les échantillons contrôles issus du protocole GOMMS (p.257)
2. Dosage des DP8 $\alpha\alpha$ à partir de PBMC décongelés (p.258)
3. Détection des DP8 $\alpha\alpha$ spécifiques de *F.prau* (p.259)
4. Analyse de la prolifération des DP8 $\alpha\alpha$ spécifiques de *F.prau* (p.261)
5. CCR6 et $\beta 7$: vers une meilleure identification des DP8 $\alpha\alpha$ spécifiques de *F.prau* ? (p.262)

DISCUSSION ET CONCLUSIONS (p.264)

ANNEXES (p.270)

BIBLIOGRAPHIE (p.285)

INTRODUCTION

Le protocole de recherche clinique PREVALL DP est une étude translationnelle, monocentrique, en simple aveugle et contrôlée. L'hypothèse de travail repose sur la mise en évidence récente d'une sous population de lymphocytes T régulateurs induits après contact avec une bactérie commensale du tube digestif *Faecalibacterium prausnitzii* (*F.prau*) dont la caractéristique phénotypique majeure est la co-expression des marqueurs CD4 et CD8 $\alpha\alpha$ (DP8 $\alpha\alpha$). L'idée initiale ayant abouti à la création de ce protocole est née du Pr Francine JOTEREAU dont l'équipe a découvert les DP8 $\alpha\alpha$ spécifiques de *F.prau*.

Tout le défi de la recherche clinique translationnelle réside dans la transposition des connaissances scientifiques récemment découvertes à une population ciblée de patients. De plus, la recherche clinique est une entité particulière dont la réglementation est inscrite dans la loi et le Code de Santé Publique. La conception et la gestion d'un protocole de recherche clinique est un processus dynamique nécessitant un travail en équipe afin d'en valoriser les résultats *in fine*. Le Pr Antoine MAGNAN m'a proposé de relever ce défi que j'ai bien sur accepté avec la plus grande joie et la fougue d'un jeune interne !

Mon travail de thèse aura pour parti pris de vous présenter les étapes les plus importantes qui ont émaillé la conception, la mise en place et la gestion du protocole PREVALL DP qui m'accompagna durant mon internat, mon année supplémentaire d'internat. En vous souhaitant une lecture la plus agréable possible !

PREMIERE PARTIE : Paysage de la recherche clinique en France

SOMMAIRE

LISTE DES ABBREVIATIONS (p.2)

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX (p.3)

DEFINITION ET REGLEMENTATION DE LA RECHERCHE CLINIQUE (p.4)

1. Définition de la recherche clinique (p.4)
2. De l'utilité de la recherche clinique (...) (p.6)
3. (...) à sa typologie (p.8)

PRINCIPAUX INTERVENANTS ET STRUCTURES IMPLIQUÉES DANS LE RECHERCHE CLINIQUE (p.10)

1. Le promoteur (p.10)
2. Les investigateurs (p.10)
3. Les patients (p.10)
4. Le CPP (p.10)
5. Le CCTIRS/CNIL (p.12)
6. L'ANSM (p.12)
7. La DRCI (p.12)

LA VIE D'UNE ETUDE DE RECHERCHE CLINIQUE (p.13)

CONCLUSION (p.14)

ANNEXES (p.15)

BIBLIOGRAPHIE (p.21)

Liste des abréviations

AFSSAPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
CCTIRS	Comité Consultatif Traitement de l'Information en Recherche dans le domaine de la Santé
CIC ou CRC	Centre d'Investigations Cliniques ou Centre de Recherche Clinique
CNIL	Commission National de l'Information et des Libertés
CPP	Comité de Protection des Personnes
CPRC	Cellule de Promotion de la Recherche Clinique
CSP	Code de Santé Publique
DRCI	Délégation de la Recherche Clinique et de l'Innovation
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PREVALL DP	PREvalence des DP8αα dans les maladies ALLergiques
PSL	Produits Sanguins Labiles
RI	Recherche Interventionnelle
RNI	Recherche Non Interventionnelle

Liste des figures et tableaux

Figures :

Figure 1	Diagramme résumant les typologies d'étude en recherche clinique non interventionnelle et leurs contraintes réglementaires.
Figure 2	Diagramme résumant les typologies d'étude en recherche clinique interventionnelle et leurs contraintes réglementaires.
Figure 3	Diagramme résumant la vie d'un projet de recherche clinique

DEFINITION ET REGLEMENTATION DE LA RECHERCHE CLINIQUE

1. Définition de la recherche clinique (F. Lemaire et M. Matei, 2012)

Il n'y a pas de définition simple et unanime de la recherche clinique. On entend le plus souvent par recherche clinique des études menées sur l'être humain dans le domaine de la santé dont il existe plusieurs typologies impliquant à des degrés diverses la « personne humaine ».

La définition de la recherche clinique présente également une définition législative et réglementaire colligée dans le code santé publique (CSP) (www.legifrance.gouv.fr) :

- Nouvelle partie législative, Première partie, Livre premier, Titre II : Recherches impliquant la personne humaine, Articles L.1121, L.1122, L.1123, L.1124, L.1125, L.1126 (Annexe 1).
- Nouvelle partie réglementaire, Première partie, Livre premier, Titre II : Recherches biomédicales, Articles R.1121, R.1123, R.1125 (Annexe 1).

On dénombre cinq textes fondateurs :

- **La Loi Huriet-Sérusclat** (Loi n° 88-138 du 20 décembre 1988) qui définit les modalités de participation et de protection des personnes aux études cliniques portant sur les médicaments : le consentement à la recherche et aux prélèvements de tissus biologiques, un bénéfice à visée thérapeutique, l'autorisation du Comité de Protection des Personnes (CPP) qui a un droit de regard et d'inspection lors du déroulement, la définition du promoteur de l'étude ainsi que ses responsabilités, le ou les investigateurs doivent être titulaires d'un doctorat ès Médecine et/ou Pharmacie, les sanctions pénales encourues, les modalités d'indemnisation pour les personnes se prêtant à la recherche.

Cette loi a permis la légalisation des études cliniques sur les médicaments (notamment les phases 1) qui étaient jusqu'alors interdites en France. Cependant, les études de recherche clinique autres (physiopathologie, génétique, diagnostic et protocole de soins courants, dispositif médicaux, tests biologiques, thérapeutiques non médicamenteuses) que les essais thérapeutiques n'étaient pas définies par cette loi. Malgré l'extension des dispositions de la loi Huriet-Sérusclat à ces études de recherche cliniques, le cadre légal ne leur était pas adapté notamment pour le consentement, les bénéfices attendus qui n'étaient jamais à visée thérapeutique ou de prélèvement de tissus biologiques et leurs conservations.

Initialement isolée, elle s'est progressivement étendue aux pays européens qui a débouché en 2001 sur la directive européenne 2001/20/CE.

- [La directive européenne 2001/20/CE](#) du Parlement européen et du Conseil de l'Union européenne du 4 avril 2001 relative aux essais cliniques de médicaments à usage humain a permis d'uniformiser les pratiques entre les pays européens.

Outre les dispositions réglementaires déjà présentes dans la Loi Huriet-Sérusclat, cette directive émet des **recommandations de bonnes pratiques** détaillées relatives à la conduite d'un essai clinique de médicaments à usage humain. On y retrouve la définition exacte de chaque intervenant et les autorités compétentes impliquées (dont le CPP) dans la recherche clinique, les modalités de dialogue entre le promoteur de l'étude et les autorités compétentes ainsi que les délais légalement admis pour ses dialogues. Il y est également écrit pour la première fois le **déroulement détaillé d'une étude de recherche clinique**.

- [La Loi de Santé publique 2004](#) (Loi n° 2004-806 du 9 août 2004) relative à la politique de santé publique fixant les conditions des recherches biomédicales pratiquées et organisées en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales est une transposition en droit français de la directive européenne 2001/20/CE.

De plus, elle a permis de palier aux insuffisances de la loi Huriet-Sérusclat en matière de recherche interventionnelle. En effet, elle individualise trois typologies de recherche et en définit également les contraintes réglementaires : **les recherches sur les produits de santé** définies par l'article [L.5311-1 du CSP](#), **les recherches biomédicales hors produits de santé** (physiopathologie, test diagnostic, génétique ...etc) et **les recherches en soins courants soumis** à un allègement des procédures administratives. Dans les faits, les contraintes réglementaires ne sont que peu modifiées par rapport à la Loi Huriet-Sérusclat en restant calquées sur le principe de bénéfice direct ou indirect de la recherche.

- [La Loi Jardé](#) (Loi n° 2012-300 du 5 mars 2012) relative aux recherches impliquant la personne humaine. Cette loi vient radicalement modifier le socle de la recherche clinique tel que défini par les deux précédentes. En effet, le champ de la recherche non interventionnelle restait hors champs législatif et réglementaire exposant les investigateurs à des sanctions pénales mais également restreignait les possibilités

de publications et d'avancées des connaissances. La constitution de bio-collection à visée de recherche ultérieure était impossible. L'allègement des procédures administratives des recherches en soins courants était devenu insuffisant notamment sur le recueil du consentement.

La loi Jardé a unifié les différentes typologies de recherche clinique existantes autour d'un socle commun : « la recherche impliquant la personne humaine » en stratifiant le risque encouru par le patient qui introduit le concept de « procédures à risque ajusté ». Cela a pour conséquence la création d'un socle commun réglementaire dont l'autorité compétente est le CPP. Le niveau de contrainte réglementaire et les modalités de recueil du consentement sont modulés en fonction du niveau de risque encouru pour les personnes qui se prêtent à la recherche.

- [La déclaration d'Helsinki](#) de 1964 posant les principes éthiques applicables à la recherche médicale impliquant des êtres humains. La dernière réactualisation date de 2008.
- [Les Lois de Bioéthique](#) ([Loi n° 2004-800 du 6 août 2004](#) et la [loi n°2011-814 du 7 juillet 2011](#)) relatives aux droits de la personne, dons et utilisations des éléments et produits du corps humain ainsi que le traitement des données nominatives sensibles. Les fondements de ces lois prennent racine à partir des quatre principes de l'éthique médicale : le principe d'autonomie, le principe de bienveillance, le principe de non malfaisance et le principe de justice. Chaque article de ces lois s'y réfère. Elle transpose en droit français la déclaration d'Helsinki.

Il y est précisé les modalités de recherche sur les caractéristiques génétiques, l'utilisation des données sensibles et personnelles en écho à la Loi informatique et libertés, aux prélèvements de tissus et d'organes humains, à la procréation et la manipulation des embryons humains à visée thérapeutique ou de recherche ainsi que la protection juridique des découvertes faites en accord avec le code de la propriété intellectuelle.

2. De l'utilité de la recherche clinique (...)

On le voit, la recherche clinique est une entité dynamique dont l'évolution rapide oblige les instances législatives et réglementaires à réviser régulièrement les lois qui l'encadrent. Mais pourquoi une telle évolution ? un tel dynamisme ?

Une amorce de réponse est : « Quelles en sont les spécificités ? Quels en sont les buts ? Quelles sont les attentes ? Quels en sont les enjeux ? »

Les spécificités de la recherche clinique sont bien réelles. En effet, la connaissance des pathologies humaines est initialement tirée des modèles *in vitro* et animaux (majoritairement murins) qui permettent de poser les fondements physiopathologiques. Cependant, les modèles *in vitro* ne reflètent pas toute la complexité des interactions entre les différents organes et systèmes qui existent et composent un être vivant d'où le recours aux modèles animaux. Ces derniers sont par définition imparfaits à cause de la divergence d'espèce (James Millers, 1978). D'autres aspects de la médecine ne sont pas abordables par le côté fondamental et pré-clinique : les aspects épidémiologiques, les études médico-économique de coût/efficacité et enfin l'aspect qualitatif lié à l'être humain apporté par les sciences humaines.

Les buts de la recherche clinique sont variables en fonction du prisme au travers duquel on la conçoit. Le premier venant à l'esprit est l'amélioration de la santé car la maladie fait peur. Elle stigmatise. Elle sort du cadre de la normalité. Au plan sociétal, il est le but plus communément admis, acceptable, altruiste et glorieux puisqu'il permet de « redevenir normal » et donc garantir son intégration dans la société (Canguilhem G, 1943) ! Les autres buts restent à un niveau plus confidentiel.

Par exemple, du point de vue d'une structure sociale tel qu'un établissement de santé ou une industrie pharmaceutique, la recherche clinique revêt un aspect d'excellence et de rayonnement d'un savoir-faire y associant un aspect économique important pour la pérennité de cet établissement mais également un aspect de légitimation et de protection par le biais des publications et/ou brevets.

Du point de vue d'un chercheur et/ou d'un médecin, la recherche clinique peut représenter une opportunité de carrière, de reconnaissance et une légitimation auprès de ses pairs, l'opportunité de mieux soigner les patients, d'appréhender différemment la pathologie concernée ou simplement faire progresser les/ses connaissances.

Enfin du point de vue d'un patient, la recherche clinique peut-être considérée comme une opportunité de bénéficier des derniers traitements à la pointe du progrès pour échapper à la maladie. A l'inverse, elle peut-être rejetée par peur d'être dépersonnalisé tel un animal de laboratoire !

Enfin, tout progrès biologique ou bio-technologique en science fondamentale ou pré-clinique ne trouve pas systématiquement une application dans la pratique clinique quotidienne. Une étude parue en 2003 a colligé les cent unes publications de 1979 à 1983 présentant une avancée majeure en science fondamentale. Seulement dix-neuf ont abouti à un essai clinique randomisé. A dix ans, une a été adoptée dans la pratique quotidienne (Contopoulos-Ioannidis et al,

2003). Dans la même veine, tout progrès biologique ou bio-technologique en science fondamentale ou pré-clinique n'est pas synonyme de bénéfice en terme de santé. La recherche clinique permet donc d'en évaluer les retombées selon les différents aspects évoqués ci-dessus.

3. (...) à sa typologie

De manière plus pragmatique, comment le pouvoir législatif s'est adapté tant bien que mal pour répondre aux enjeux de la recherche clinique ? L'évolution dans les différents textes de loi cités ci-dessus l'expose bien. Depuis le paradigme établi de 1988 d'une recherche définie comme l'atteinte du corps des personnes qui s'y prêtent à des fins thérapeutiques à la création d'une ensemble impliquant « la recherche sur la personne humaine », il y a eu bien des évolutions à la fois sociétales et législatives.

L'organisation actuelle de la recherche clinique en France est définie par les articles L.1121-1 à L.1121-17, L.1122-1 à L.1122-2 (Annexe 5) et R.1121-1 à R.1121-3 du CSP (Annexe 6) en accord avec les lois ci-dessus citées.

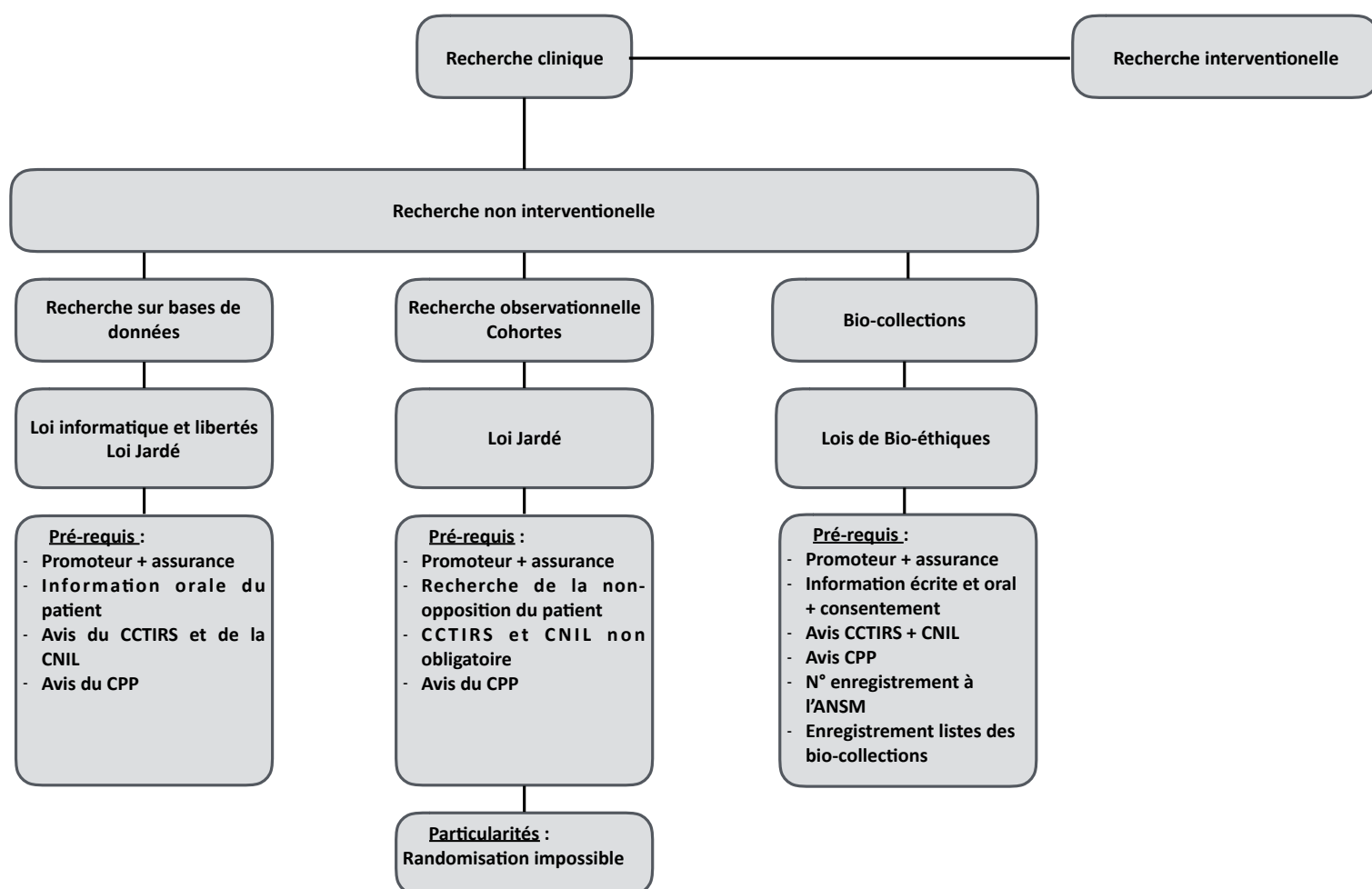


Figure 1 : Diagramme résumant les typologies d'étude en recherche clinique non interventionnelle et leurs contraintes réglementaires.

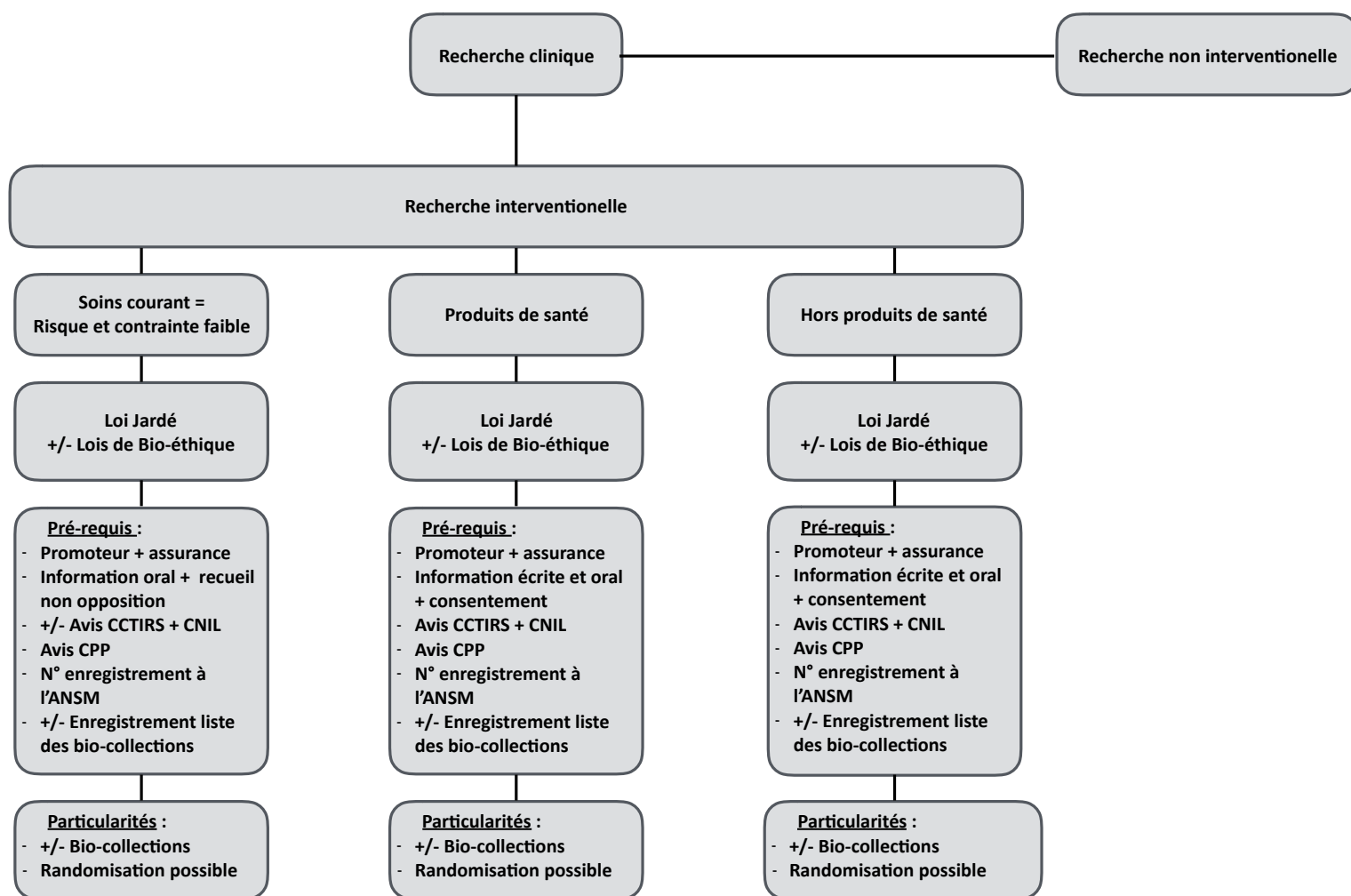


Figure 2 : Diagramme résumant les typologies d'étude en recherche clinique interventionnelle et leurs contraintes réglementaires.

PRINCIPAUX INTERVENANTS ET STRUCTURES IMPLIQUES DANS LE RECHERCHE CLINIQUE

1. Le promoteur

Selon la loi Huriet-Sérusclat révisée par le loi Jardé et le CSP article L.1121-1 le promoteur est "la personne physique ou morale qui prend l'initiative d'une recherche biomédicale sur l'être humain, qui en assure la gestion et vérifie que le financement de la recherche est prévu".

En pratique, le promoteur doit choisir le ou les investigateurs, recruter des ARC contrôleurs de qualité, soumettre le protocole de la recherche à l'avis du CPP et à l'autorisation des autres autorités compétentes si nécessaire, contracter une assurance couvrant les conséquences éventuelles de cette recherche, et déclarer au Ministère ou à l'ANSM les éventuels événements indésirables survenus au cours de la recherche.

De plus, il est habituel que le promoteur prenne en charge les coûts de la recherche mais ce n'est pas obligatoire puisqu'un tiers peut financer la recherche sans se porter obligatoirement promoteur.

A la fin de la recherche, le promoteur avise l'autorité compétente et le CPP que la recherche est terminée ou indique les raisons qui motivent l'arrêt de la recherche lorsqu'il est anticipé.

2. Les investigateurs

Ce sont obligatoirement des médecins ou pharmaciens titulaires d'un diplôme de doctorat ès Médecine ou Pharmacie. Ils doivent avoir des compétences reconnues dans le domaine de l'étude de recherche clinique.

3. Les patients et l'information

Elle est obligatoire et ce quelque soit la typologie de la recherche clinique. Elle doit être orale ou écrite. Le recueil du consentement ou de la non-opposition est fonction de la typologie de l'étude (Cf. figures 1 & 2 et articles L.1122-1 et L.1122-2).

4. Le CPP

Les missions des Comités de Protection des Personnes sont définies par les articles L.1123-1 à L.1123-14 et R.1123-1 à R.1123-64 du CPS.

Avant d'autoriser la mise en œuvre des projets de recherche clinique, le comité évalue les projets de recherche clinique au regard de la balance bénéfices/risques et de la protection des personnes susceptibles de participer à des recherches menées sur la personne humaine.

Depuis la Loi Jardé, toute recherche clinique impliquant la personne humaine doit être soumise au CPP sous l'égide d'un promoteur.

Sont également soumises pour **examen et avis** toutes modifications substantielles en cours d'essai ne remettant pas en cause l'objectif principal. Elles portent le plus souvent sur le déroulement scientifique de l'essai, les modifications de la lettre d'information avec recueil d'un nouveau consentement, la prolongation d'étude, l'ouverture ou fermeture de centre(s).

Le CPP est réparti en 2 collèges : scientifique et société civile. Chaque collège est composé pour moitié de membres titulaires et suppléants. Le collège scientifique comprend 8 médecins qualifiés en recherche biomédicale, 2 médecins généralistes, 2 pharmacien(ne)s hospitaliers, 2 infirmier(e)s. Le collège de la société civile comprend 2 personnes qualifiées en éthique, 2 psychologues, 2 travailleurs sociaux, 4 juristes, 4 représentants des usagers de la santé.

Pour chaque dossier soumis en bonne et due forme, deux rapports sont établis, l'un par un membre du collège scientifique, l'autre par un membre de la société civile sur désignation du président en fonction de leurs compétences scientifiques ou sociales. Les rapports écrits sont présentés oralement lors des séances plénières et non publiques et servent de base aux délibérations sur lesquelles le nom des rapporteurs demeure confidentiel. Le dossier est discuté par l'assemblée et soumis au vote. A l'issue, le comité rend un avis sous 35 jours :

- **avis favorable** : si le CPP a donné son avis favorable et l'ANSM son autorisation, l'essai peut débuter. Il est enregistré au sein du fichier national des recherches impliquant la personne humaine sous la charge du ministère de la Santé.
- **avis réservé** : demande de complément d'informations. Un délai de 3 mois est accordé au promoteur pour apporter une réponse. A la réception du complément d'informations, le comité délibère et donne un avis définitif après avis des deux rapporteurs.
- **avis défavorable** : cet avis peut faire l'objet d'un recours sur la base des articles L. 1123-6-al.2 et R.1123-7 du Code de la Santé Publique.

5. Le CCTIRS/CNIL

Ce sont deux organismes qui fonctionnent de concert selon les modalités de « poupées gigognes ». Historiquement, le CCTIRS a été créé pour faciliter le travail de la CNIL devant le nombre croissant de dossiers soumis et le retard accumulé ! Son objectif permet d'éclairer la CNIL sur les dossiers soumis. Ces deux organismes sont centrés sur les données à caractère personnelles et sensibles (= qui permettent d'identifier directement ou indirectement les personnes (date de naissances, n° de sécurité sociale, n° de téléphone...etc)

Le CCTIRS émet un avis sur la méthodologie, la nécessité du recours à des données à caractère personnelles et sensibles ainsi que la pertinence de ces données par rapport à l'objectif de l'étude. Il émet un avis selon les mêmes modalités que le CPP.

La CNIL, quant à elle, encadre la mise en oeuvre des traitements de données à caractère personnelles qu'ils soient automatisés ou manuels. Elle émet une autorisation nécessaire à la poursuite de l'étude.

6. L'ANSM (www.ansm.sante.fr)

Créée en 2012, cette agence reprend les missions de l'AFSSAPS qui sont le rapport bénéfice/ risque liés à l'utilisation, la sécurité d'emploi, l'efficacité et la qualité des produits de santé tout au long de leur cycle de vie. Elle est également responsable de mener en coordination avec les centres régionaux de pharmacovigilance les phases IV avec le recueil des effets indésirables. Son champs d'action s'applique à tous les produits de santé (PSL, dispositifs médicaux, produits d'origine humaine...etc)

A sa création, elle s'est vue élargir ses champs de compétence avec le contrôle de la publicité autour des produits de santé faite aux particuliers mais également aux praticiens.

Concernant la recherche clinique, elle délivre un numéro d'enregistrement pour toutes les RI et les RNI de type bio-collections (Cf. figures 1 & 2).

7. La DRCI et les CICs

Au sein des établissements de santé, la DRCI est chargée des trois missions essentielles en matière d'appui à la recherche clinique que sont la promotion, l'appui méthodologique et bio-statistique, l'aide à la gestion et l'acquisition des des données de l'étude de recherche clinique. Pour cela la DRCI s'appuie sur des structures physiques telles que les CIC ou la CPRC.

LA VIE D'UNE ETUDE DE RECHERCHE CLINIQUE

Le diagramme ci-dessous résume les étapes développées précédemment, les acteurs et le temps nécessaire à la mise en place et la poursuite d'un protocole de recherche clinique.

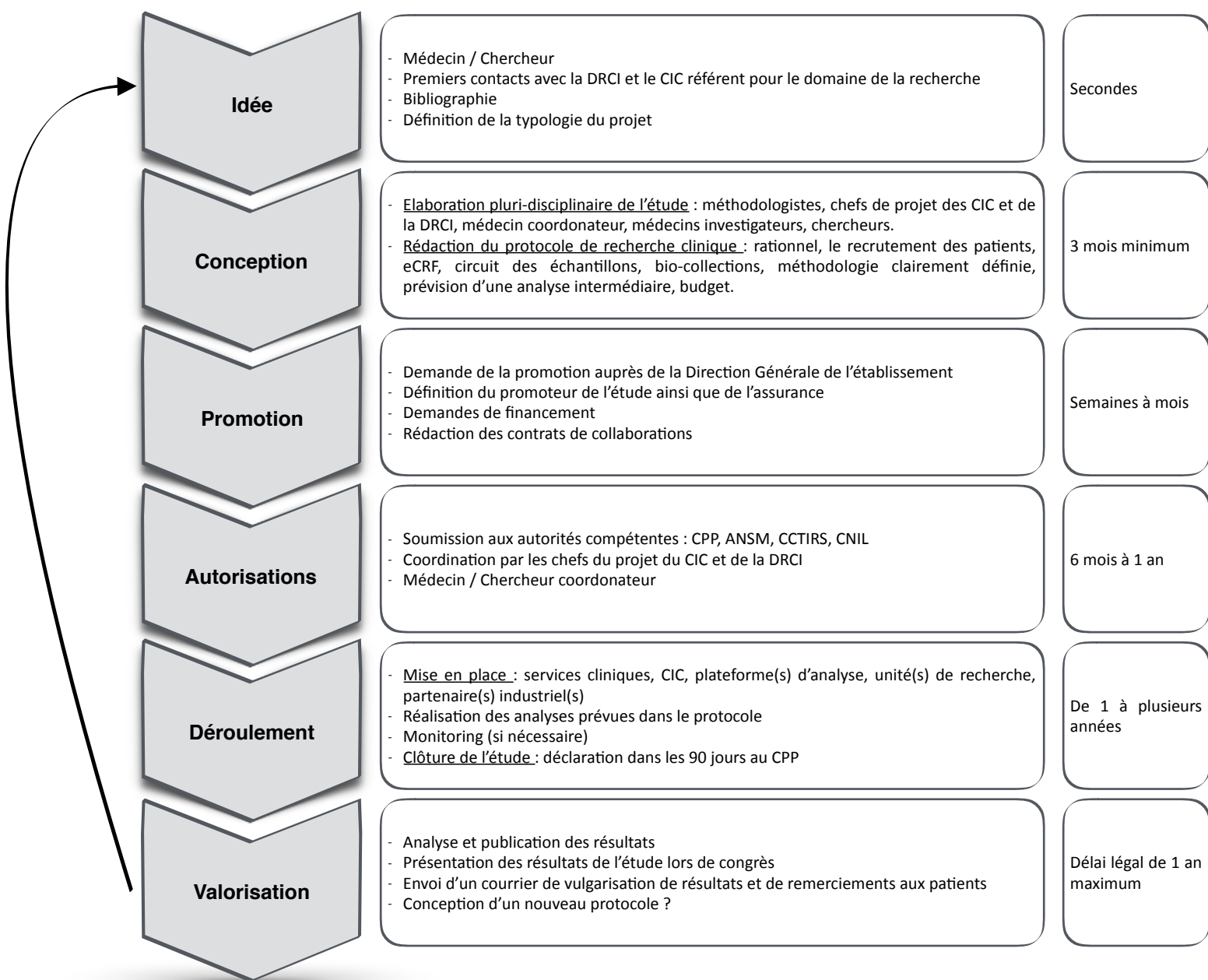


Figure 3 : Diagramme résumant la vie d'un projet de recherche clinique

CONCLUSION

PREVALL DP en sa qualité d'étude de recherche clinique translationnelle est soumise à ces directives réglementaires et législatives.

Nous (*Maxime LEBEAUPIN, Aurore FOUREAU, Dr Claire BERNIER et moi-même*) l'avons conçue selon les directives d'une étude de recherche clinique interventionnelle en soins courants avec constitution d'une bio-collection de PBMC humains.

Ce travail de thèse aura pour objet de vous présenter les différentes étapes de la conception de PREVALL DP depuis l'idée initiale jusqu'à son aboutissement le plus actuel à savoir la phase « d'inclusion et de poursuite de l'étude » mais également les perspectives attendues de cette étude.

ANNEXES

Liste des annexes

Annexe 1	Glossaire des principaux termes en recherche clinique
----------	---

Approche fondée sur le risque (Risk-based approach)

Méthode générale de gestion des recherches biomédicales en quatre étapes : 1) Identification, analyse et hiérarchisation des risques 2) Mise en place de mesures d'atténuation (prévention, réduction, ou élimination) des risques ; 3) Conduite de la recherche et évaluation continue des risques; 4) Mise à jour des mesures d'atténuation des risques.

Attaché de recherche clinique, moniteur ou assistant

Personne mandatée par le promoteur, chargée d'assurer pour ce dernier le suivi de la recherche biomédicale et le contrôle de sa qualité (mise en place sur site des essais cliniques, réalisation du suivi et du contrôle de la qualité scientifique, technique et réglementaire des projets de recherche clinique).

Audit d'une recherche biomédicale

Examen indépendant et méthodique des activités et des documents relatifs à la recherche, en vue de déterminer si les activités liées à la mise en place et au suivi de cette recherche ont été réalisées, et si les données ont été recueillies, analysées et rapportées dans le respect du protocole, des procédures opératoires standardisées préétablies, des bonnes pratiques cliniques et des dispositions législatives et réglementaires en vigueur.

Biostatisticien

Personne diplômée en statistique ou bio-statistique qui conçoit les méthodologies statistiques et réalise les analyses statistiques des données des études de recherche préclinique et clinique.

Cahier d'observation

Document, quelque soit son support (par exemple : support papier, optique, magnétique ou électronique), destiné à recueillir par écrit toutes les informations requises par le protocole concernant chaque personne qui se prête à la recherche, et qui doivent être transmises au promoteur.

Cahier d'observation électronique (eCRF- Electronic Case Report Form)

1) Cahier d'observation électronique permettant le recueil, le contrôle et l'exploitation des données d'une étude clinique sur chaque sujet de recherche. 2) CRF dans lequel les données et leurs commentaires, notes et signatures sont reliés électroniquement.

Centre de Recherche Clinique (CRC) ou Centre d'Investigation Clinique (CIC)

Infrastructure consacré à la recherche clinique à but non lucratif, financée par l'état, et placée aux niveau des hôpitaux, équipée de lits et de personnel. C'est une plateforme de services méthodologiques et techniques à disposition des équipes de soins engagées dans un projet de recherche.

Chef de projet

Personne qui gère un portefeuille de projets en recherche clinique (dont l'établissement est promoteur) sur les aspects réglementaires, financiers, logistiques, administratifs, organisationnels et humains.

Coordinateur d'étude clinique

Personne qui guide les investigateurs dans les démarches réglementaires et dans la mise en place des études.

Recherche biomédicale

Le Code français de la santé publique définit la recherche biomédicale comme une "recherche organisée et pratiquée sur l'être humain en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales". Ce type de recherche est autorisé en France, sous réserve du respect notamment des dispositions des articles L.1121-1 et suivants du Code de la santé publique.

Gestionnaire des données (Data Manager)

Personne qui traite les données des études cliniques. Elle est responsable du contrôle de la cohérence et de la qualité des données cliniques. Elle travaille avec ou a une formation de biostatistiques.

Gestion des requêtes (Query Management)

Processus d'examen en continu des données, des divergences, de la production et de la résolution des erreurs et des incohérences qui se posent dans la saisie et la transcription des données des essais cliniques.

Groupe coopérateur

Ensemble de médecins des hôpitaux de type CHU ou non qui travaillent ensemble sur la même maladie de manière à appliquer des protocoles et essayer de faire avancer la science ou le traitement sur telle ou telle maladie. Par définition, un groupe coopérateur est multicentrique, c'est à dire au minimum va s'adresser à plusieurs types de structures hospitalières, des centres anti-cancéreux, des hôpitaux régionaux et dans différentes parties de la France.

Investigateur

Selon la loi Huriel, l'investigateur d'un essai clinique est forcément un médecin qui dirige et surveille la réalisation de la recherche biomédicale (article L1121-3 du Code de la Santé publique). Ce médecin doit justifier d'une expérience appropriée. "Dans les sciences du comportement humain, une personne qualifiée conjointement avec l'investigateur peut exercer la direction de la recherche. Les recherches biomédicales concernant le domaine de l'odontologie ne peuvent être effectuées que sous la direction et la surveillance d'un chirurgien-dentiste et d'un médecin justifiant d'une expérience appropriée".

Méthodologiste

Personne le plus souvent l'épidémiologiste, le pharmacologue ou le biostatisticien qui aide à la conception des projets, et supervise le déroulement des études à toute les étapes. Méthodologiste assure aussi la rédaction des protocoles en maîtrisant les divers schémas d'études, le calcul de la taille d'échantillon, le plan et le rapport d'étude, l'analyse statistique, la programmation et rédaction de publications, etc.

Monitoring

Fait d'exercer au cours d'une recherche biomédicale une activité de contrôle de qualité auprès des sites investigateurs. Ces activités peuvent s'exercer sur site, ou à distance (depuis l'unité d'essai clinique), ou de façon combinée.

Promoteur

Selon la loi Huriel-Sérusclat (CSP, art. L1121-1, révisée le 9 août 2004) le promoteur est "la personne physique ou morale qui prend l'initiative d'une recherche biomédicale sur l'être humain, qui en assure la gestion et vérifie que le financement de la recherche est prévu".

En pratique, le promoteur doit choisir l'investigateur, recruter des ARC contrôleurs de qualité,

soumettre le protocole de la recherche à l'avis du CPP et à l'autorisation de l'autorité compétente, contracter une assurance couvrant les conséquences éventuelles de cette recherche, et déclarer au Ministère ou à l'ANSM les éventuels événements indésirables survenus au cours de la recherche. De plus, il est habituel que le promoteur prenne en charge les coûts de la recherche mais ce n'est pas obligatoire puisqu'un tiers peut financer la recherche sans se porter obligatoirement promoteur. A la fin de la recherche, le promoteur avise l'autorité compétente et le CPP que la recherche est terminée ou indique les raisons qui motivent l'arrêt de la recherche lorsqu'il est anticipé.

Technicien d'étude clinique

Exerçant à l'hôpital, le technicien d'études cliniques (TEC) réalise la saisie des données cliniques recueillies auprès des patients, afin de mettre en place le déroulé de l'étude de recherche. Dans ce cadre, il gère ces données et traite les informations qu'il peut en tirer, les analyse, les diffuse au médecin investigateur de l'équipe de recherche, les suit puis les classe.

Valorisation

Valorisation hospitalière consiste à transférer les résultats obtenus par les équipes de recherche clinique vers les acteurs susceptibles de les développer, de les transformer en produits et activités au bénéfice des patients, du système de soins et de la population.

C'est aussi une démarche de protection des inventeurs, ainsi que des hôpitaux qui assurent la promotion ou la validation clinique de ces inventions, avant la publication des résultats. La valorisation vise le monde socio- économique, dans un but d'associer les établissements de santé au développement économique de leur territoire, grâce à des partenariats industriels. La valorisation de la recherche permet que les résultats tangibles, scientifiques ou commerciaux de la recherche clinique puissent bénéficier en retour aussi bien aux inventeurs qu'à leurs « hôpitaux – employeurs ».

BIBLIOGRAPHIE

ANSM :

[http://ansm.sante.fr/Activites/Essais-cliniques/Les-essais-cliniques/\(offset\)/0](http://ansm.sante.fr/Activites/Essais-cliniques/Les-essais-cliniques/(offset)/0). (Consulté le 1 août 2016).

Article L.5311-1 du CSP :

<http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000006690344> (Consultée le 1 août 2016)

Articles L.1121-1 à 1121-17 du CSP:

http://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do;jsessionid=42E529CFC810426FB00DDC24E4DCC01A.tpdila18v_1?idSectionTA=LEGISCTA000006170998&cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20080129. (consulté le 1 août 2016)

Articles L.1123-1 à 1123-14 du CSP :

http://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do;jsessionid=42E529CFC810426FB00DDC24E4DCC01A.tpdila18v_1?idSectionTA=LEGISCTA000006171003&cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20080129. (Consulté le 1 août 2106)

Articles L1122-1 à 1122-2 du CSP :

http://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do;jsessionid=42E529CFC810426FB00DDC24E4DCC01A.tpdila18v_1?idSectionTA=LEGISCTA000006171000&cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20080129. (Consulté le 1 aout 2016)

Articles R.1121-1 à 1121-3 du CSP :

http://www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do;jsessionid=42E529CFC810426FB00DDC24E4DCC01A.tpdila18v_1?idSectionTA=LEGISCTA000006190943&cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20080129. (Consulté le 1 aout 2016)

Articles R.1123-1 à R.1123-64 du CSP :

www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do;jsessionid=80C5D381806D28093BDA0EB9DE52C8AA.tpdila17v_3?cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20160804..(Consulté le 1 août 2016)

Canguihlem G (1943). *Le normal et le pathologique*. Thèse de médecine.

Code de Santé publique (révision consolidée le 01/08/2016) :

www.legifrance.gouv.fr/affichCode.do;jsessionid=80C5D381806D28093BDA0EB9DE52C8AA.tpdila17v_3?cidTexte=LEGITEXT000006072665&dateTexte=20160804. (Consulté le 1 août 2016)

Contopoulos-Ioannidis DG, Ntzani E, Ioannidis JP (2003). *Translation of highly promising basic science research into clinical applications*. Am J Med. Apr 15;114(6):477-84.

Déclaration d'Helsinki :

<http://www.wma.net/fr/30publications/10policies/b3/>. (Consultée le 1 aout 2016)

Directive européenne 2001/20/CE :

<http://www.eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2001:121:0034:0044:fr:PDF> (Consulté le 1 août 2016).

F.Lemaire and M.Matei (2012). *De la loi Huriet à la loi Jardé*. Revue des maladies respiratoires. 30, 4-5.

Loi n° 2004-800 du 6 août 2004 :

<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000441469>. (Consulté le 1 août 2016).

Loi n° 2004-806 du 9 août 2004 :

<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000441469>. (Consulté le 1 août 2016)

Loi n° 2012-300 du 5 mars 2012 :

<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000025441587>. (Consulté le 1 août 2016).

Loi n° 88-138 du 20 décembre 1988 :

<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000508831>. (Consulté le 1 août 2016)

Loi n°2011-814 du 7 juillet 2011 :

<https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000024323102>. (Consulté le 1 août 2016)

Miller, J. G. (1978). *Living systems*. New York : McGraw-Hill.

**SECONDE PARTIE : De l'idée initiale à la conception de l'étude (...)
(...) en passant par le rationnel**

SOMMAIRE

LISTE DES ABBREVIATIONS (p.23)

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX (p.25)

DE L'IDEE INITIALE (...)

(...) AUX LES LYMPHOCYTES T DOUBLES POSITIFS CD4+ CD8 $\alpha\alpha$ (...)

(...) EN PASSANT PAR LE MICROBIOTE ET SON IMPACT SUR LES MALADIES ALLERGIQUES (...)

1. Généralités sur les microbiotes.
2. Le microbiote bactérien intestinal
3. Le microbiote intestinal et le système immunitaire
4. Les dysbioses intestinales et les maladies allergiques

(...) PUIS PAR FAECALIBACTERIUM PRAUSNITZII (...)

(...) JUSQU'À LA CONCEPTION DU PROTOCOLE

1. Présentation du protocole PREVALL DP
2. Les patients allergiques
3. Les volontaires sains
4. La méthodologie
5. La stratégie initiale d'analyse des DP8 $\alpha\alpha$ totaux et spécifiques de F.prau
6. Le budget
7. Soumissions aux autorités compétentes

ANNEXES (p.44)

BIBLIOGRAPHIE (p.187)

Liste des abréviations

AMAAN	Association des Médecins Allergologues de l'Agglomération Nantaise.
AOI	Appel d'Offre Interne
CCTIRS	Comité Consultatif de Traitement de l'Information de la Recherche en Santé
CDx	Cluster of Differentiation n°x
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
CIC	Centre d'Investigation Clinique
CIMNA	Centre d'Immuno-Motnitorage Nantes Atlantique
CPP	Comité de Protection des Personnes
CSP	Code de Santé Publique
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte Associated protein 4
DHU 2020	Département hospitalo-universitaire 2020
DP8αα	Lymphocytes T doubles positifs CD4+ CD8αα
DR1	Directeur de Recherche grade 1
DRCI	Délégation de la Recherche Clinique et de l'Innovation
DSS	Dextran Sodium Sulfate
<i>F.prau</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
Foxp3	Forkhead bOX P3
GALT	Gastro-entercial Associated Lymphoid Tissue
GITR	Glucocorticoid Induced TNFR Related protein
GOMMS	Gut and Oral Microbiota Mapping and Sugartypes
IL-x	InterLeukine n°x
kD	Kilo Dalton
LAG3	Leucocyte Activation Gene 3
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales
PFTA	PlateForme Transversale d'Allergologie
PREVALL DP	PREvalence des DP8αα dans les maladies ALLergiques
PRR	Pattern Recognition Receptor
PSA	PolySaccarhide A
SCFA	Short Chain Fatty Acids

T reg	Lymphocytes T régulateurs
TEC	Technicien d'Etude Clinique
UMR	Unité Mixte de Recherche

Liste des figures et tableaux

Figures :

Figure 1	Carré de White et Greenberg.
-----------------	------------------------------

Tableaux :

Tableau 1	Diagramme de Gantt concernant la stratégie d'analyse initiale de DP8αα.
Tableau 2	Résumé des stratégies d'analyse des données du protocole PREVALL DP

DE L'IDEE INITIALE (...)

La prévalence des **maladies allergiques** (dermatite atopique, asthme, rhinite, conjonctivite et allergie alimentaire) a considérablement augmenté dans les pays industrialisés au cours des 20-30 dernières années. Les maladies allergiques sont présentes surtout chez l'enfant et l'adulte jeune, mais toutes les tranches d'âge sont concernées, avec des variations selon les pays et l'âge. Afin de proposer de nouvelles thérapeutiques, il faut avant tout comprendre la physiopathologie (Magnan A, Vervloet D ; 2003).

Depuis leur découverte les lymphocytes T régulateurs (T reg) n'ont cessé de faire l'objet de travaux visant à comprendre leur rôle dans le maintien de l'homéostasie immunitaire du corps humain mais également leur implication dans les maladies auto-immunes, les maladies inflammatoires, les transplantations d'organes solides ou liquides et les maladies allergiques.

Il a été identifié deux grandes classes de lymphocytes T régulateurs :

- les lymphocytes T régulateurs naturels = acquisition d'un phénotype et d'une fonction régulatrice dès la sortie du thymus (CD25+/CD127+low/FoxP3+).
- les lymphocytes T régulateurs induits = acquisition d'un phénotype et d'une fonction régulatrice en périphérie en fonction du micro-environnement cytokinique.

La caractérisation phénotypique de ces derniers est moins évidente et ce d'autant plus que durant les dix dernières années plusieurs populations de lymphocytes T régulateurs induits ont été décrites (Tr1 par exemple) (O'Shea et al, 2010 ; Zhu et al, 2010).

Récemment, l'équipe du Pr Francine JOTEREAU a identifié une nouvelle sous-population de lymphocytes T régulateurs induits chez les sujets atteints de maladies inflammatoires du tube digestif (MICI). Ces derniers ont un phénotype particulier car portant le double marquage CD4 et CD8. De plus, ils sont induits et spécifiques d'une bactérie intestinale commensale, *Faecalibacterium prausnitzii*.

En ce qui concerne les allergies, il a été largement démontré un lien entre les altérations du microbiote intestinal et la survenue de maladies allergiques.

Nous souhaitons donc proposer une étude translationnelle, transversale, monocentrique, contrôlée, en simple insu pour étudier le rôle de ces lymphocytes T régulateurs induits doubles positifs dits DP8αα afin de comparer la fréquence et la fonction

régulatrice des DP8 $\alpha\alpha$ spécifiques de *Faecalibacterium prausnitzii* dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique par rapport à des échantillons contrôles.

Le critère de jugement principal sera la mise en évidence d'une diminution quantitative et/ou qualitative des lymphocytes T doubles positifs (CD4+/CD8 $\alpha\alpha$) du sang périphérique spécifiques de *F prausnitzii* chez les patients atteints d'asthme allergique, de rhinite allergique et de dermatite atopique par rapport à des échantillons contrôle issus d'une collection témoin mise à disposition par le laboratoire BIOFORTIS®.

(...) AU LES LYMPHOCYTES T DOUBLES POSITIFS CD4+ CD8 $\alpha\alpha$ (...)

L'intestin humain est l'hôte d'une grande diversité bactérienne tant en nombre qu'en espèces que l'on réfère sous le terme de « microbiote intestinal ». Sa composition semblerait fortement influencer l'homéostasie immunitaire et l'état de santé en général. Outre sa contribution au métabolisme, plusieurs modèles animaux ont permis de démontrer que le microbiote intestinal joue un rôle dans la formation et la composition du système immunitaire local et notamment l'induction de lymphocytes T régulateurs. Ces derniers sont essentiels dans le maintien de l'homéostasie immunitaire et notamment au niveaux des muqueuses (zone d'interface) (Hill et al , 2010 ; Atarashi et al, 2011).

De récentes études avec des modèles murins germ-free ou axéniques ont identifié une bactérie sporulée appartenant aux clusters IV et XIVa du genre des *Clostridia* comme l'inducteur majoritaire de T reg coliques FoxP3 positifs et IL-10 positifs. Cette étude a également montré que ces T reg coliques induits avaient un rôle clé dans l'homéostasie et la prévention de l'allergie (Atarashi et al, 2011).

On sait également que chez l'Homme, les altérations du microbiote intestinal appelées dysbiose sont associées à des maladies auto-immunes ou inflammatoires telles que les MICI, le diabète de type 1 ou encore les maladies allergiques (Kamada et al, 2013).

Récemment, il a été identifié une nouvelle sous-population de T reg chez l'homme induits par une bactérie intestinale commensale, *Faecalibacterium prausnitzii*, appartenant au cluster IV des *Clostridia*. Cependant, contrairement aux T reg coliques identifiés chez la souris, les T reg induits par *F prau* chez l'homme sont doubles positifs pour le CD4 et CD8 $\alpha\alpha$ (DP8 $\alpha\alpha$) et n'expriment pas le FoxP3 ce qui explique pourquoi ils n'avaient pas été découverts jusqu'à présents. De plus, les DP8 $\alpha\alpha$ expriment des marqueurs régulateurs tels

que GITR, LAG3, CD25, CTLA4 et sécrètent de l'IL-10. Ces lymphocytes DP8αα spécifiques de *F prau* semblent donc les équivalents des FoxP3 induits chez la souris et ce d'autant plus que les DP8αα n'ont jamais été mis en évidence dans la muqueuse colique de souris (Sarrabayrousse et al, 2014 et 2015).

De manière intéressante chez les patients atteints de MICI, on observe une diminution de la proportion de *F prau* dans les matières fécales. L'équipe du Pr JOTEREAU a démontré qu'il existait une corrélation entre la diminution de *F prau* dans les matières fécales et le taux de DP8αα spécifiques de cette dernière dans le colon et le sang périphérique en comparaison aux sujets sains. L'équipe a également démontré que chez les sujets sains les DP8αα spécifiques de *F prau* représentaient en moyenne 2,5% des CD4+ circulants. Fait intéressant, seulement 20 à 40% des DP8αα circulants étaient spécifiques de *F prausnitzii* ce qui laisse supposer que les autres DP8αα non spécifiques de *F prau* pourraient être induits par une ou plusieurs autres bactéries du microbiote intestinal (Sarrabayrousse et al, 2014).

Enfin dans des modèles murins axéniques avec reconstitution contrôlée du microbiote intestinal, il a été démontré que les T reg induits par les *Clostridium* re-circulaient et avaient un rôle dans la prévention de l'allergie. De plus, l'inoculation par voie orale de *Clostridium* tolérogènes chez ces souris induisait une résistance à l'apparition d'une colite allergique expérimentale ainsi que l'apparition d'une réponse IgE systémique (Atarashi et al, 2011 ; 2013).

(...) EN PASSANT PAR LE MICROBIOTE ET SON IMPACT SUR LES MALADIES ALLERGIQUES (...)

1. Généralités sur les microbiotes.

Le microbiote désigne l'ensemble des micro-organismes (bactériens, fongiques et viraux) qui co-existent en symbiose avec l'hôte. Il succède au terme « microflore » ou « flore ». On les retrouve principalement au niveau des organes ou tissus qui s'interfacent avec le milieu extérieur.

Les différents tissus et organes du corps humain ont longtemps été perçus comme stériles (hormis le vagin et le colon) grâce aux barrières épithéliales. Les rares microbiotes connus du colon et du vagin n'avaient que peu de fonction physiologiques connues telles que

la fermentation des fibres non digestibles essentielles à la physiologie de la cellule épithéliale colique ou encore une fonction de renforcement de barrière en acidifiant le pH vaginal. Parus en 2012, les résultats du « Human Microbiome Project » ont mis en évidence que chaque interface épithéliale (cavité buccale, vagin, colon, peau, des bronches au bronchioles, le tractus urinaire...etc) était colonisée par un microbiote bactérien qui lui est propre tant au plan taxonomique que fonctionnelle (The Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Les résultats ont bouleversés la vision de l'être humain ! Il est à l'heure actuelle considéré comme une symbiose où 90% des cellules qui le composent sont d'origine bactérienne (soit environs 1 à 2Kg de notre poids corporel total). Jusqu'à l'utilisation des techniques récentes comme le séquençage à haut débit, 90% des bactéries étaient inconnues car non cultivables par les techniques courantes (The Human Microbiome Project Consortium, 2012).

Les compositions taxonomiques et fonctionnelles présentent une variabilité intra et inter-individuelle sous l'inter-dépendance de facteurs tels que : le site d'habitat (bouche, colon, peau...etc), la position géographique, l'âge, l'alimentation, l'état de santé (obésité par exemple), le tabac et d'autres facteurs environnementaux. Cette liste n'est probablement pas exhaustive et la question est de savoir si cette diversité en est la cause ou la conséquence ? (Ottman et al 2012 ; Cleasson et al 2012 ; Yatsunenko et al, 2012 ; Morgan et al, 2012)

Tous différents certes ! Cependant, la taxonomie et les gènes de fonctions présentent une certaine unicité. En effet, la présence d'un coeur commun de gènes de fonction indispensables à la symbiose avec l'être humain tels que la synthèse d'ATP, la glycolyse ou encore une machinerie ribosomale sont présents pour chaque espèce découverte à ce jour. Il en va de même avec coeur phylogénétique notamment au sein du microbiote intestinal commun à tous les êtres humains et ce indépendamment des facteurs ci-dessus (Tap et al, 2009 ; Morgan et al, 2012).

2. Le microbiote bactérien intestinale

Il reste le microbiote le plus étudié actuellement de part la diversité (plus de 3000 espèces identifiées à ce jour) et la richesse (10^{11} bactéries dans le colon) de sa bio-masse ainsi que sa facilité d'accès (prélèvement de selles).

Il est composé de quatre phyla principaux : les *Firmicutes*, les *Bacteroïdetes*, les *Actinobactéries* et les *Protéobactéries*. Les deux premiers sont les plus abondants au sein du microbiote intestinal bactérien d'un être humain dit sain et les plus difficilement cultivables par les techniques classiques de microbiologie à cause de leur extrêmes sensibilité à l'oxygène, des substrats énergétiques particuliers et un pH de vie dépendant du genre voire

de l'espèce. Les nouvelles techniques de séquençage ont permis grâce à l'identification des gènes de fonction spécifiques de chaque genre et/ou espèce le développement de méthodes de culture en chambre d'anaérobiose. Chaque phyla comprend des genres dont les principaux sont les suivants (Eckburg et al, 2005 ; Morgan et al, 2012) :

- Firmicutes : **Clostridia** (*F.prau*), *Rhuminococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* et des *Lactobacilles*.
- Bacteroidetes : **Bacteroides**, *Prevotella*
- Actinobacteries : *Bifidobacterie*
- Proteobacteries : *Nesseiria*, *Campylobacter*, *Haemophilus*, *Acinetobacter*, *Echerichia*

Il existe une organisation au sein de cet écosystème particulier. Les genres bactériens sont classés suivant leur fréquence en terme de bio-masse (densité) et constance dans le temps. On individualise trois catégories. La première dite dominante présente perpétuellement et dont la bio-masse est de l'ordre de 10^9 à 10^{12} . Ils sont souvent qualifiés de **symbions** car non pathogènes. La deuxième dite sous dominante présente également perpétuellement dont la bio-masse est de l'ordre de 10^6 à 10^9 . On y retrouve la plupart des bactéries pathogènes connues pour l'Homme dites **pathobions** lorsque ces dernières comblent une niche écologique habituellement occupée par les symbions. Enfin une catégorie dite transitoire dont la bio-masse est de 10^5 à 10^8 . Ce sont pour la plupart les probiotiques actuellement disponibles (Furet et al, 2009) .

Leurs compositions sont fortement dépendante de l'âge de l'individu, du statut nutritionnel, de l'état de santé.

L'âge a été l'un des premier facteurs de variation identifié. On peut discerner trois grandes périodes de la vie d'un être humain où le microbiote varie. Dès la naissance, le nourrisson est colonisé par le microbiote de sa mère dont la composition est dépendante du mode d'accouchement. Une césarienne aura pour conséquence la colonisation du tube digestif considéré comme axénique par un microbiote reflétant la flore cutanée de la mère alors qu'un accouchement par voie basse colonisera l'enfant avec un microbiote vaginale et intestinal adulte (Dominguez-Bello et al, 2010). Ce microbiote primitif évolue très rapidement et se compose majoritairement de genre *Bifidobactérie* et *Bacteroides* (phylum *Actinobacterie* et *Bacteroidetes* respectivement) tant que le nourrisson est allaité. Par la suite, il évoluera à l'âge de 2-3 ans vers un microbiote plus diversifié et ressemblant à l'adulte (Schwartz et al, 2012 ; Yastunen et al, 2012). Il est intéressant de remarquer un gradient nord/sud (Europe) sur la richesse en *Bifidobacteries* du microbiote d'un enfant âgé de 6

semaines de vie. Cela peut s'expliquer par la fréquence plus élevée et la durée plus longue de l'allaitement maternel plus important dans les pays scandinaves (Fallani et al, 2010). De même, il existe une différence notable dans la composition des microbiotes de nourrissons allaités et nourris par formule adaptée à l'âge chez lesquels on observe une augmentation du phylum *Firmicutes* (*Lactobacillus*) qui permettent une meilleure digestion des protéines et sucres complexes du lait vache (Schwartz et al, 2012).

Après cette période où le microbiote se diversifie en parallèle de l'alimentation (facteur géographique) qui se diversifie, il se stabilisera avec une spécificité individuelle tant au plan taxonomique que fonctionnelle (De Filippo et al, 2010 ; Yastunen et al, 2012 ; Schloissnig et al, 2013) qui est en parallèle d'un « état de santé » stable. Le microbiote d'un adulte sain est composé en majorité des phyla *Firmicutes* (*Clostridium* +++, *Rhuminococcus*), (*Bacteroidetes* (*Bacteroides* +++, *Prevotella*)) et dans une moindre mesure et de manière inconstante d'*Actinobacterie* (*Bifidobacterie*) (Qin et al, 2010 ; Tap et al, 2009 ; Yastunen et al, 2012).

L'entrée dans l'entrée dans « la vieillesse » (> 65-70 ans) est à nouveau marquée par un changement du microbiote intestinal avec une inversion du rapport Firmicutes/Bacteroidetes ainsi qu'une réduction de la diversité (Mariat et al, 2009). De manière plus précise et ce malgré une grande variabilité inter-individuelle au sein des personnes âgées, on observe une augmentation des genres *Bacteroides*, *Clostridia*, *Parabacteroides* et une diminution des *Rhuminococcus* en comparant avec un cœur commun décrit chez l'adulte jeune (Cf. ci-dessus). Plus intéressant, on observe au sein du genre des *Clostridia* une augmentation de la classe IV (dont *F.prausnitzii*) et une diminution de la classe XIVa (Cleasson et al, 2011). Cet équilibre est perturbé lors de conditions pathologiques courantes dans cette tranche d'âge (par exemple : l'hypertension artérielle idiopathique, la maladie athéromateuse) (Cleasson et al, 2012).

Enfin le microbiote intestinal dominant est le siège d'un **cœur phylogénétique** présent chez tous les individus définis comme sains (Tap et al, 2009 ; Ottman et al, 2012). En cas d'altération (par exemple avec l'utilisation d'antibiotiques), ce cœur retrouve en 15 à 30 jours sa composition taxonomique et probablement fonctionnelle initiale. On le qualifie de **résilient** (de la Cochetière et al, 2005). On y retrouve les genres bactériens autour desquels se concentre la recherche médicale car leur dysbiose est souvent associée à des pathologies inflammatoires telles que les MICI, auto-immunes comme le diabète type 1, allergiques comme l'asthme, la dermatite atopique ou encore métabolique pour l'obésité (Kamada et al, 2013).

A côté de ce cœur phylogénétique, les **entérotypes** ont été découverts en 2011. Il en existe 3 reconnus internationalement : le groupe de *Prevotella* (phylum *Bacteroidetes*) , le groupe de *Bacteroides* (phylum *Bacteroidetes*) et le groupe de *Rhuminococcus* (phylum *Firmicutes*). Il s'agit en fait d'une classification basée sur la présence d'un genre majoritaire dans le microbiote d'individus (Arumugam et al, 2011 ; Ding et al, 2014). A ce jour, il n'y a pas de lien tangible entre un ensemble de fonction et les entérotypes.

Quelque soit la classification utilisée à ce jour, plusieurs questions restent en suspend : Quelles est la physiologie de cet écosystème particulier et les interactions avec son hôte ? Quels en sont les facteurs qui les déterminent et selon quels mécanismes ?

3. Le microbiote intestinale et le système immunitaire

Le microbiote intestinal est indispensable au développement du système immunitaire muqueux intestinal (GALT). En effet, l'étude des souris axéniques a montré que le GALT était atrophique notamment au niveau des îlots lymphoïdes. Les mécanismes qui régissent l'influence du microbiote sur le développement du GALT sont mal connus bien qu'il semble que la stimulation antigénique par les PRR soit impliquée (Kamada et al, 2013).

L'existence d'un lien entre le microbiote intestinal et l'induction de T reg est de découverte récente suite à l'utilisation des modèles murins axéniques ou traités par antibiotiques ne traversant pas la barrière intestinale. En 2011, l'induction de T reg au niveau de la muqueuse colique suite à la reconstitution par voie orale du microbiote des souris axéniques ou traitées par antibiotique est démontrée dans un modèle de colite inflammatoire induite par le DSS. La seule présence de ce microbiote suffit à réduire de moitié les symptômes clinique de colite via l'induction de T reg in-situ (Atarashi et al, 2011). Deux années plus tard, la même équipe démontre que ces T reg sont spécifiquement induits par une classe bactérienne abondamment présente dans l'intestin murin (et également humain) : les Clostridia appartenant au phylum de Firmicutes (Atarashi et al, 2013).

Les Clostridia ont été décrits comme les principaux producteurs d'acides gras à chaînes courtes (SCFA) et notamment de butyrate au sein du microbiote intestinal humain adulte. On compte trois genres bactériens majeurs reliés à cette fonction : *Faecalibacterium*, *Eubacterium* et *Roseburia* qui colonisent les couches mucineuses du colon permettant un biodisponibilité accrue de leurs produits de fermentation aux cellules épithéliales mais également au système immunitaire muqueux sous-jacent (Van Den Abbeele et al, 2013 ; Louis and Flint, 2009). Ces SCFA (surtout le butyrate) ont montré des aptitudes à induire des

T reg coliques notamment via induction du gène maitre de la lignée des T reg : le FoxP3 et ce d'autant plus que le taux colique de SCFA est élevé (Furusawa et al, 2013).

Un autre mécanisme intéressant des SCFA (et notamment le propionate) dans le maintien de l'homéostasie immunitaire systémique a été montré en 2014. Une alimentation enrichie en fibres solubles non digestibles a permis de réduire l'inflammation pulmonaire allergique dans un modèle murin d'asthme allergique à l'ovalbumine sans altération préalable du microbiote intestinal. Le mécanisme sous-jacent d'après les auteurs est la polarisation de cellules dendritiques tolérogènes durant leur hématopoïèse par les SCFA qui migrent dans le tissu pulmonaire enflammé (Trompette et al, 2014). La polarisation des cellules dendritiques tolérogènes a également été montrée avec les produits de fermentation de *Bifidobacterium breve* sans précisément expliciter le rôle des SCFA (Hoarau et al, 2006 ; 2008).

D'autres bactéries commensales ont montré une aptitude à induire des T reg. *Bacteroides fragilis* produit le polysaccharide A (PSA) qui, dans un modèle de souris axéniques reconstituées avec cette bactérie, augmente la résistance à l'induction d'une colite aigüe par le DSS via l'augmentation des T reg FoxP3+ producteurs d'IL-10 nécessitant une stimulation antigénique de l'immunité innée via les PRR (notamment le TLR-2) (Round et al, 2010). La souche A2-165 de *F.prausnitzii* est également capable d'induire un changement de polarisation des T CD4+ présents dans le GALT et les ganglions mésentériques vers le phénotype T reg (Rossi et al, 2016).

Hormis ces mécanismes précis, les autres publications ne décrivent que bien souvent une augmentation de T reg FoxP3+ dans les muqueuses inflammées (colique, pulmonaire, dermiques).

4. Les dysbioses intestinales et les maladies allergiques

Depuis environ une dizaine d'années, plusieurs articles de recherche clinique ont mis en évidence un lien statistique entre une dysbiose et la survenue de pathologies allergiques telles que la dermatite atopique, la rhinite allergique ou l'asthme allergique (West et al, 2014 ; Huffnagle, 2010).

En effet, deux études ont montré que la réduction de la diversité phylotypique du microbiote intestinal durant l'enfance exposait au développement de différentes maladies allergiques et mettait en évidence la présence d'une inflammation allergique dans le sérum (Bisgaard et al 2011, Abrahamsson et al, 2014). Deux études récentes ont également montré un lien entre l'acquisition du microbiote durant la période néonatale fortement dépendant

du mode d'accouchement (voie basse ou césarienne) et la survenue de pathologies allergiques comme la dermatite atopique ou l'asthme (Van Nimwegen et al, 2011 ; Dominguez-Bello et al, 2010).

De manière plus précise dans l'asthme, plusieurs études de recherche clinique démontrent le caractère pro-inflammatoire de l'absence ou en tout cas la diminution de certaines bactéries comme les *Clostridia* résultant de l'apparition d'une inflammation de type Th2 dans les bronches. Dans le même esprit, on retrouve l'implication de bactéries commensales du tube digestif telles que les *Clostridia* (et notamment *F.prau*) ainsi qu'une diminution de la diversité du microbiote intestinal dans le développement chez de jeunes enfants et la persistance à l'âge adulte de la dermatite atopique (Song et al, 2016 ; Mah et al, 2006 ; Penders et al, 2013 ; Abrahamsson et al, 2012).

Il faut toutefois noter que certains articles ne retrouvent pas ces résultats. Cela tient à plusieurs facteurs :

- les critères diagnostiques et la durée de période d'observation de survenue de la ou les pathologies allergiques.
- la résolution de la technique de séquençage des métagénomes bactériens (taxonomie versus fonctionnelle) et de la technique d'analyse des données métagénomiques.
- la qualité et la méthode de recueil des échantillons afin d'analyser le microbiote (mucus versus selles).

Une autre preuve de l'existence d'une relation entre maladies allergiques et dysbioses sont les modèles murins exposés à une antibiothérapie puis exposés à un allergène sur les voies aériennes basses (*Asp fumigatus*) dans lesquels on retrouve une hyperréactivité bronchique aux épreuves fonctionnelles respiratoires et un remodelage bronchique à l'histologie (Noverr et al, 2004 ; 2005). De plus, il a été montré dans un modèle murin d'asthme allergique à l'ovalbumine que la supplémentation orale en *Clostridium leptum* permettait de réduire l'hyperréactivité bronchique, diminuer l'inflammation bronchique et augmenter les T reg locaux et systémique (Li et al, 2012) Cela démontre l'importance de l'écosystème des symbioses et notamment des *Clostridia* dans le développement d'une inflammation allergique.

Enfin, aucun article n'a pour le moment fait état des mécanismes reliant dysbiose et maladies allergiques.

(...) PUIS PAR *FAECALIBACTERIUM PRAUSNITZII* (...)

F.prau est une bactérie anaérobie stricte du phyla des *Firmicutes*, genre *Clostridium* de classe IV qui avec les *Bacteroidetes* et les *Actinobacteriae* constitue les embranchements majeurs composant le microbiote intestinale adulte. Elle fait partie des environ 60 espèces de symbions qui composent le coeur phylogénétique de cet écosystème particulier qu'est le microbiote intestinal humain. Elle se situe au dans le caecum et le colon proximal dans des niches écologiques où la pression partielle en oxygène est très faible ce qui explique qu'elle n'est pas présente au moment de la colonisation primitive du colon néonatal. Elle nécessite la consommation d'oxygène par d'autres bactéries composant le microbiote néonatal (Miquel et al, 2014).

Elle fait l'objet de nombreuses recherches de part son activité immuno-modulatrice et anti-inflammatoire initialement décrite dans les MICI. Son activité anti-inflammatoire empreinte plusieurs mécanismes comme la production de SCFA (**butyrate** et/ou propionate) qui permet l'induction de T reg dans la sous-muqueuse colique sécréteur d'IL-10 (Sokol et al, 2008 ; Miquel et al 2014 ; Rossi et al, 2016). L'équipe du Pr Jotereau a découvert que *F.prau* pouvait induire de manière TCR-dépendante des lymphocytes T régulateurs atypiques, les DP8 $\alpha\alpha$, au niveau colique (Sarrabayrousse et al, 2014). Plus récemment, il a été découvert un peptide bactérien de 15kD sécrété par *F.prau* aux propriétés anti-inflammatoires sur l'épithélium digestif in vitro et in vivo dans un modèle murin de colite aiguë. Cette activité anti-inflammatoire semble indépendante des l'interaction avec le système immunitaire muqueux (Quévrain et al, 2016).

F.prau est actuellement connue sous 5 souches différentes (L2-6 ; A2-165 ; KLE-1255 ; M21/2 et SL3/3). Les propriétés anti-inflammatoires seraient attribuées à une seule souche l'A2-165 (Rossi et al, 2016). Récemment, une nouvelle souche a été identifiée dont le nom est HTF-F. Sa matrice extra-cellulaire constituant le biofilm qu'elle sécrète a également des propriétés anti-inflammatoires dont le(s) mécanisme(s) d'action reste(nt) actuellement inconnu(s) (Rossi et al, 2015).

De plus, les maladies allergiques ne se limitent pas à l'organe atteint mais présentent une inflammation chronique à bas bruit au niveau de l'épithélium et de la muqueuse digestive en rapport avec une dysbiose. Un lien intéressant a été montré entre la rupture de l'intégrité de l'épithélium digestif et une dysbiose sur les différents souche de *F.prau* chez les

patients atteints d'une dermatite atopique persistante à l'âge adulte (Song et al, 2016). Cela justifie l'étude de *F.prau* dans la physiopathologie des maladies allergiques.

(...) JUSQU'À LA CONCEPTION DU PROTOCOLE (Annexe 1).

1. Présentation du protocole PREVALL DP

PREVALL DP est l'acronyme pour PRÉvalence des DP8αα dans les maladies ALLergiques. Le titre complet du protocole est « Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4 CD8αα (DP8αα) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique ». Ce protocole de recherche clinique translationnel a été conçu sous l'impulsion des Pr JOTEREAU et Pr MAGNAN afin de proposer une preuve de concept chez l'Homme sur un des nombreux mécanismes possibles d'interaction entre le microbiote intestinale/ses dysbioses (notamment *F.prau*) et le système immunitaire (en particulier les T reg) dans les maladies allergiques.

Il s'agit d'une étude transversale, monocentrique, contrôlée, en simple insu dont l'objectif principale est la mise en évidence d'une diminution quantitative et/ou qualitative des lymphocytes T doubles positifs CD4+ CD8αα du sang périphérique spécifiques de *F prau* chez les patients atteints d'asthme allergique, de rhinite allergique et de dermatite atopique par rapport à des échantillons contrôle issus d'une collection témoin mise à disposition par le laboratoire BIOFORTIS®.

Le versant clinique du protocole visant à recruter les patients allergiques se déroule au sein de la PlateForme Transversale d'Allergologie (PFTA) au CHU de Nantes via les consultations propres du services et les cabinets de médecins allergologues libéraux.

Le versant biologique pour l'analyse de DP8αα spécifiques de *F.prau* se partage entre le CIMNA et les UMR Inserm 1087 - équipe 6 : Pathologie bronchiques et allergies (Pr MAGNAN) et UMR Inserm 892 - équipe 5 : les glycoconjugués dans les réponses immunes (F. ALTARE, DR1).

2. Les patients allergiques

Nous avons défini les critères d'inclusion et de non-inclusions de telle sorte que les patients allergiques présentent une sensibilisation aux acariens domestiques, une maladie allergique non contrôlée et/ou en exacerbation au moment de l'inclusion, l'absence d'immunodépression primitive ou acquise, l'absence de pathologie inflammatoire, auto-

immune ou néoplasique et l'absence de facteurs connus pouvant perturber le microbiote intestinal (tabac et obésité).

La PFTA est une structure transversale créée en 2008 au sein du CHU de Nantes sous l'impulsion du Pr MAGNAN dont la vocation est l'exploration multidisciplinaire des maladies allergiques complexes qui ne peut-être réalisée en ville. Son activité se concentre donc autour des anaphylaxies et toxidermies médicamenteuses, les anaphylaxies au venins d'hyménoptères, la prise en charges des urticaires et angio-oedèmes, les dermatites atopiques sévères, les allergies alimentaires compliquées, les rhinites difficiles, les asthmes sévères et les pathologies professionnelles allergiques.

Avec tout ces domaines de compétences, il y a matière à recruter les patients allergiques. Cependant, il y avait quelques bémols prévisibles pour ne faire qu'un recrutement exclusivement hospitalier. En effet, les patients atteints d'asthmes sévères présentent régulièrement des facteurs d'immunodépression de part les cures fréquentes de corticoïdes ou la nécessité d'une corticothérapie au long cours. De plus, tous ces patients ne présentent pas systématiquement de part allergique à leur maladie (Wenzel S, 2006 ; Simpson et al, 2006). Concernant les patients atteints de dermatite atopique sévère, l'obtention d'un bon contrôle de la maladie est soumis à plusieurs facteurs dont le plus fréquent est la corticophobie (Aubert-Wastiaux et al, 2011). Il est souvent nécessaire d'avoir recours aux immunosuppresseurs systémiques tels que la ciclosporine afin de contrôler la poussée inflammatoire et pouvoir et débiter l'éducation thérapeutique du patient vis à vis de la corticophobie. Concernant les rhinites allergiques aux acariens, leur évolution est souvent chronique avec peu de symptômes aigus qui définissent la rhinite allergique (unités de temps et lieu + triade). Il existe plusieurs facteurs (au même titre que l'asthme) qui influent sur l'évolution des rhinites chroniques. Il est parfois difficile de discriminer une cause allergique prépondérante (Magnan A, Vervloet D, 2003).

Enfin, il faut garder à l'esprit que les maladies allergiques recherchées sont en majorité traitées en médecine de ville dans la région nantaise, et ce de part l'orientation de la PFTA mais également liée à leur faible taux de complication (notamment l'engagement du risque vital). Cela est parfaitement illustré par le carré de White et Greenberg (White et al, 1961).

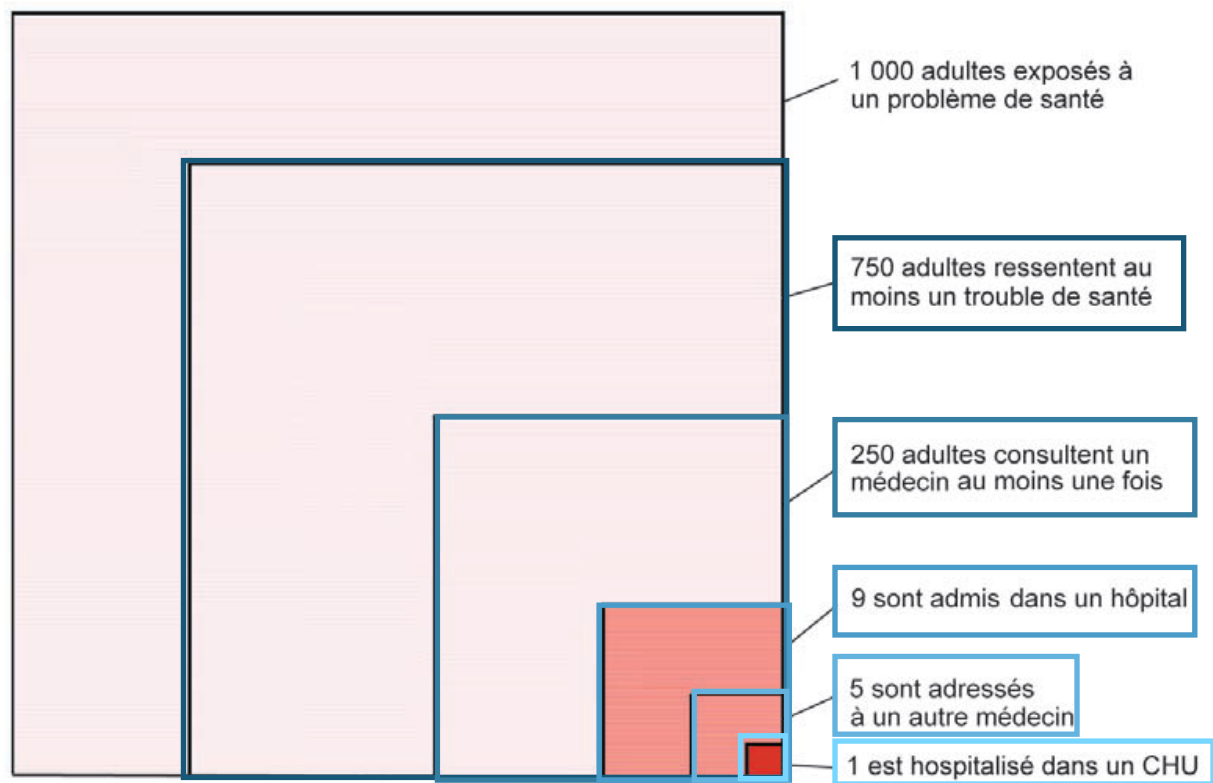


Figure 1 : Carré de White et Greenberg .

Afin que les résultats de l'étude PREVALL DP puissent être extrapolés à la population allergiques, il fallait que les échantillons de population soient le plus représentatifs possibles. Nous nous sommes donc adressés aux confrères et consoeurs allergologues de la région nantaise via leur association l'AMAAN qui sont depuis très longtemps impliqués dans la recherche clinique via des partenaires industriels. Le projet leur a été présenté lors d'une réunion de l'association et a remporté une adhésion totale des praticiens sous plusieurs conditions :

- les praticiens allergologues ne sont pas définis comme investigateurs de l'étude car cela requalifie l'étude en multicentrique et engendre une charge administrative supplémentaire.
- La méthodologie et la logistique devait être simple d'application afin de pouvoir motiver les patients à participer (Cf. Partie 3).

L'idée était donc de créer un **lien ville-hôpital via la recherche** qui donne une partie de son originalité à PREVALL DP.

3. Les volontaires sains

Le problème évident est de définir le volontaire sain parfaitement adapté à PREVALL DP. En effet, 30% de la population d'Europe occidentale est atopique c'est à dire que 30% de la population générale présente une ou plusieurs sensibilisations à des allergènes sans pour

autant qu'il n'y ait de maladie allergique déclarée (Magnan A, Vervloet D, 2003). De plus, les maladies allergiques touchent principalement des enfants, adultes (de 18 à 60 ans). Egalement, l'augmentation croissante des co-morbidité cardio-vasculaires notamment après 70 ans est associée à une altération du microbiote et notamment du genre des *Clostridia* (Cleasson et al, 2012). Cela a permis de définir les critères d'âge de l'étude.

Les volontaires sains ont donc été définis avec les mêmes critères de non-inclusions que les patients allergiques. Les critères d'inclusion spécifiaient la majorité, l'absence d'antécédent personnels de maladie allergique (actives ou en rémission) mais aussi familial qui permet de contourner en partie le problème de l'atopie. Cependant, il peut exister un terrain atopique familial sans qu'il n'y ait de maladie allergique jamais déclarée. Nous avons donc pris le parti de pratiquer un Phadiatop™ sur tous les volontaires sains parmi lesquels seuls ceux ayant un Phadiatop™ négatif seront retenus (Matricardi et al, 1990).

Nous avons obtenus les échantillons sanguins de volontaires sains définis selon les critères ci-dessus grâce à une collaboration avec le laboratoire BIOFORTIS dans le cadre de l'étude GOMMS qui avait été montée entre BIOFORTIS et l'UMR Inserm 892 et la faculté d'odontologie. L'objectif était tout d'abord la constitution d'une bio-collection d'échantillons sanguins (PBMC et plasma), de selles et de salive. L'objectif scientifique du projet GOMMS était de tester le lien entre les entérotypes du microbiote intestinal et les sugartypes liés aux polymorphismes génétiques combinés des groupes sanguins et des enzymes de fucosylation FUT2 et FUT3 (Annexe 2). Nous avons également rédigé un contrat collaboration entre le CHU de Nantes et BIOFORTIS avec une cession des échantillons qui rentrent dans le cadre du protocole PREVALL DP (Annexe 3).

4. La méthodologie (Annexe 1)

Nous avons défini les rôles de chaque personne impliquée par la suite :

- L'investigatrice principale est le Dr Claire BERNIER.
- La co-investigatrice associée au recrutement des patients est le Dr Anaïs PIPET. A ce moment de la conception du protocole, un interne ne peut prétendre au statut de co-investigateur car non titulaire d'une thèse ès Médecine.
- La méthodologiste est Béatrice GUYOMARC'H
- Les chefs de projet sont Aurore FOUREAU pour le CIC Thorax et Maxime LEBEAUPIN pour la DRCI
- Le chercheur associé est le Pr Francine JOTEREAU
- Le promoteur de l'étude est le CHU de Nantes.

La durée attendue du protocole a été fixée à 2 ans avec une période de recrutement sur 1 an et une période d'analyse des données différée attendue à 1 an. La visite d'inclusion se déroule au CHU de Nantes à la PFTA par l'un des investigateur sur 1 journée (temps maximal de consultation de 30 minutes avec l'inclusion et le prélèvement sanguin)

Les échantillons biologiques prélevés sont un volume de 40mL de sang sur EDTA par ponction veineuse directe le jour de l'inclusion.

Conformément au CSP (Cf. partie 1, figure 2), une fiche d'information au patient assortie d'un recueil de la non-opposition et d'un consentement au prélèvement sanguin sont remis aux patients. Les doubles sont conservés dans le service en cas de monitoring ou d'audit du protocole. Chaque patient inclus est assigné à un groupe (asthme allergique, rhinite allergique, dermatite atopique ou volontaires sain) connu du médecin mais inconnu des biologistes et des méthodologistes qui réaliseront les analyses permettant de conserver le simple insu dans l'analyse. Les données cliniques sont anonymisées selon un code préétabli et consigné dans un CRF papier et électronique.

Le risque α a été fixé à 0,05%, la puissance statistique $1-\beta$ à 80% et la significativité statistique inférieure à 0,05%, ce qui a permis de déterminer le nombre de sujets nécessaires à 30 par groupe afin de montrer une diminution d'au moins 40% des DP8 α . Le nombre 30 patients par groupe permet également d'analyser les données selon une approximation gaussienne via l'utilisation de tests statistiques paramétriques plus robustes.

5. La stratégie initiale d'analyse des DP8 α totaux et spécifiques de *F.prau*

Elle a été déterminée selon les mêmes modalités que décrites dans la publication de Sarabayrousse et al, 2014.

L'analyse des DP8 α sur sang total est effectuée dans les 24h après l'inclusion par le CIMNA sous la responsabilité du Pr Régis JOSIEN et du Dr Marie RIMBERT.

L'analyse des DP8 α spécifiques de *F.prau* sera différée à la fin des inclusions. Les PBMC sont extraits par gradients de FICOLL et congelés par les TEC selon les protocoles opérationnels spécifiques au sein de l'UMR Inserm 1087 - équipe 6.

Les deux tableaux ci-dessous résument respectivement les étapes clefs et les stratégies d'analyse des données du protocole PREVALL DP.

Actions	Inclusion	H24	Analyse différée	Analysée différée J+5
Examen clinique	x			
Information et consentement	x			
Prélèvement	x			
Phadiatop™	x			
Extraction PBMC		x		
Congélation PBMC		x		
Constitution de la bio-collection		x		
Tri monocytes CD14+			x	
Epreuve de prolifération en présence de différentes bactéries			x	
Epreuve de prolifération en présence d'acariens				x
Analyse de la prolifération de DP8αα				x
Analyse du phénotypes des DP8αα proliférants				x

Tableau 1 : Diagramme de Gantt concernant la stratégie d'analyse initiale de DP8αα.

Objectifs initiaux*	Hypothèses de travail	Méthodes	Résultats attendus (quantitatifs/ qualitatifs)	Indicateurs	Outils recueil de données
Mise en évidence d'une diminution quantitative des lymphocytes T doubles positifs (CD4+/CD8+αα) du sang périphérique spécifique de <i>F prausnitzii</i> chez les patients atteints d'asthme allergique, de rhinite allergique et de dermatite atopique.	Diminution des lymphocytes T doubles positifs dans le sang périphérique des allergiques par rapport aux sujets sains	Marquage par anticorps et analyse par cytométrie de flux.	Diminution statistiquement significative du taux de lymphocytes doubles positifs sur le sang périphérique chez les patients allergiques par rapport aux sujets sains.	Moyenne du nombre de lymphocytes T doubles positifs par rapport aux lymphocytes totaux du sang périphérique. Résultats exprimés en pourcentage.	Logiciel FlowJo Logiciel Prism Cytomètre de flux
Existe-t-il une corrélation entre les taux de lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique et le niveau de contrôle de la maladie allergique ?		Analyse statistique = test Pearson	Relation inverse entre le niveau de contrôle de la maladie et le taux de lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique.	Coefficient de corrélation de Pearson	Logiciel Prism
La mise en évidence d'un phénotype régulateur après prolifération avec <i>F prausnitzii</i> ?	La possibilité qu'un défaut de la fonction régulatrice des lymphocytes doubles positifs circulants soient impliqués dans les maladies allergiques	Prolifération in vitro des lymphocytes du sang périphérique en présence des bactéries commensales intestinales (<i>F prausnitzii</i>). Présence de marqueurs régulateurs tels que CTLA4, GITR, LAG3 et CD25	- Prolifération des lymphocytes T doubles positifs en présence de <i>F prausnitzii</i> . - Présence d'un phénotype régulateur uniquement chez les lymphocytes T doubles positifs ayant proliféré avec <i>F prausnitzii</i> .	- Dilution du VPD au sein des lymphocytes T doubles positifs ayant proliféré - Présence de marqueurs régulateurs à leur surface (CTLA4, CD25, LAG3 et GITR)	Logiciel FlowJo Logiciel Prism Cytomètre de flux
Existe-t-il une corrélation entre le taux de prolifération des lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique spécifiques de <i>F prausnitzii</i> et le niveau de contrôle de la maladie allergique ?	Une diminution des lymphocytes DP8a spécifiques de <i>F prausnitzii</i> dans le sang des patients comparés aux donneurs sains	Comparer le pourcentage de lymphocytes doubles positifs qui diluent le VPD après stimulation des PBMCs par <i>F prausnitzii</i> chez patients et donneurs sains	Relation inverse entre le niveau de contrôle de la maladie (<u>mesuré par des questionnaires de contrôle spécifiques</u>) et le taux de lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique.	Coefficient de corrélation de Pearson	Logiciel FlowJo Logiciel Prism Cytomètre de flux
Existe-t-il une prolifération des lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique en présence d'acariens (<i>Dermatophagoïdes pteronyssinus</i>) ?	Sert de contrôle interne	Prolifération in vitro des lymphocytes du sang périphérique en présence d'extrait total d'acarien.	Absence de prolifération des lymphocytes T doubles positifs en présence d'extrait total d'acarien.	Absence de dilution du VPD au sein des lymphocytes doubles positifs	Logiciel FlowJo Cytomètre de flux

Tableau 2 : Résumé des stratégies d'analyse des données du protocole PREVALL DP

6. Le budget

Le budget global initialement prévu comprenant les dépenses à caractère médicales, pour le personnel et les dépenses hôtelières et générales s'élevait à 33 135€.

Nous avons effectué une demande de financement auprès l'AOI 2014 du CHU de Nantes qui nous a accordé la totalité du budget pour l'originalité et son caractère novateur (Annexe 4).

Nous avons dû réviser le budget initial peu de temps après l'obtention de l'AOI 2014 à cause de plusieurs facteurs :

- la sous-estimations des dépenses induites par les analyses du côté de l'UMR Inserm 892.
- mon inexpérience à ce moment des coûts engendrés par un protocole de recherche clinique intégrant des analyses immunologiques.

Nous avons donc soumis le projet au financement du DHU 2020 dans la section allergie en axant le protocole PREVALL DP sur l'identification d'un potentiel bio-marqueur faisant le lien entre dysbiose intestinale et maladie allergique. Cela nous a valu un financement de 15 000€ à utiliser avant la fin d'année 2016 et nécessitant la présentation de l'avancée du protocole à mi-parcours. A nouveau, le caractère novateur et l'aspect transactionnel ont été souligné avec toutefois une mise en garde de la part d'un des experts concernant le temps nécessaire au recrutement des patients et volontaires sains (Annexe 5).

7. Soumissions aux autorités compétentes

Nous avons soumis le dossier aux différentes autorités compétentes selon les modalités définies par le CSP (Partie 1, figure 2).

Le CPP a d'abord émis en avis réservé avec divers demandes de précisions sur le protocole, la feuille d'information et le consentement à la bio-collection. Nous y avons répondu et obtenu un avis favorable et numéro d'enregistrement au CPP n° 15/02-964 (Annexe 6).

Un numéro d'enregistrement après de l'ANSM a également été obtenu n° 2014-A01759-38

Le CCTIRS a tout d'abord émis un avis réservé en demandant de préciser comment le simple insu serait respecté concernant l'analyse biologique et les conditions d'utilisation ultérieure des échantillons de la bio-collection au vue du nom de cette dernière. Nous y avons également répondu par un courrier circonstancié permettant d'obtenir un avis favorable (Annexe 7).

ANNEXES

Liste des annexes

Annexe 1	Protocole PREVALL DP
Annexe 2	Protocole GOMMS
Annexe 3	Contrat de collaboration entre le CHU et BIOFORTIS dans le cadre du protocole PREVALL DP.
Annexe 4	Réponse du comité d'expert de l'AOI 2014
Annexe 5	Réponse du comité d'expert du DHU 2020
Annexe 6	Avis du CPP
Annexe 7	Avis du CCTIRS

Annexe 1

RC14_0372 - Prévall DP

Protocole Prévall DP

N° d'enregistrement : n°2014-A01759-38

Ref : RC14_0372

Ref CPP : 15/02-964

« Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique. »

Investigateur Coordonnateur :

Dr Bernier Claire
Plateforme Transversale d'Allergologie
CHU Hôtel Dieu
1 place Ricordeau
44 000 NANTES
Tel : 00 33(0)2 40 08 31 41
Fax : 00 33 (0)2 40 48 21 81
E-mail : claire.bernier@chu-nantes.fr

Méthodologiste :

Béatrice Guyomarc'h
L'institut du thorax
Hôpital Laënnec
Boulevard Jacques Monod
44093 Nantes Cedex 01
Tel : 00 33 (0)2 40 16 58 59 E-mail : beatrice.guyomarch@univ-nantes.fr

Etablissement responsable de la recherche :

CHU de Nantes

Direction de la recherche - département promotion
5, allée de l'île Gloriette
44 093 Nantes cedex 01 (FRANCE)



Tel : 02 53 48 28 35
Fax : 02 53 48 28 36
rderecherche@chu-nantes.fr

RESUME

Titre de l'étude	Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique.
Mots clés	Lymphocyte T régulateur, lymphocyte T double positif, <i>F Prausnitzii</i> , sang périphérique, asthme allergique, rhinite allergique, dermatite atopique.
Promoteur de l'étude	CHU DE NANTES
Investigateur coordonnateur	Dr Bernier Claire
Nombre de centres prévus	1 : CHU de Nantes
Type d'étude	Physiologie, physiopathologie
Planning de l'étude	☐ Durée totale : 2 ans ☐ Démarches réglementaires : 4 mois ☐ Période de recrutement : 1 an ☐ Durée de suivi par patient : 1 jour ☐ Durée des analyses : 8 mois
Design de l'étude	☐ Monocentrique ☐ Transversale ☐ Contrôlée ☐ Non Randomisée ☐ Simple insu
Objectifs de l'étude	<u>Objectif principal</u> : Mise en évidence d'une diminution quantitative des lymphocytes T doubles positifs (CD4+/CD8+) du sang périphérique spécifique de <i>F prausnitzii</i> chez les patients atteints d'asthme allergique, de rhinite allergique et de dermatite atopique ainsi que par rapport aux échantillons contrôles. <u>Objectifs secondaires</u> : - existe-t-il une corrélation entre les taux de lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique et le niveau de contrôle de la maladie allergique ? - la mise en évidence d'un phénotype régulateur après prolifération avec <i>F prausnitzii</i> - existe-t-il une corrélation entre le taux de prolifération des lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique spécifiques de <i>F prausnitzii</i> et le niveau de contrôle de la maladie allergique ? - existe-t-il une prolifération des lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique en présence d'acariens (<i>Dermatophagoïdes pteronyssinus</i>) ?
Nombre de cas prévisionnel	90 (30 patients par groupes = asthme allergique, dermatite atopique, rhinite allergique)

Calendrier des visites et examens	1 journée à la plateforme transversale d'allergologie pour l'inclusion et le prélèvement, Hôtel Dieu, CHU de Nantes
Critères d'inclusion	<u>Critères d'inclusion communs :</u> • Patient âgé de 18 à 70 ans • Le patient est non-fumeur • Le patient présente un BMI inférieur à 30 kg/m² Le patient ne présente pas de contre-indication à la réalisation de prick test. • Le sujet a donné son accord pour participer à l'étude et la collection • Le sujet est affilié à un régime de sécurité sociale <u>Critères d'inclusion spécifiques des patients avec rhinite allergiques :</u> • Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique dûment diagnostiquée selon les critères ARIA (cf annexe 7) • Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique classée persistante légère ou persistante modérée à sévère selon les critères ARIA (cf annexe 7) • Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique non contrôlée selon les critères ARIA avec ou sans traitement. (cf annexe 7) • Le patient présente une rhinite et/ou une conjonctivite imputable à la présence d'acariens • Le patient présente une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif pour le laboratoire <u>Critères d'inclusion spécifiques des patients avec dermatite atopique :</u> • Le patient présente une dermatite atopique (cf grille diagnostique) classée modérée (SCORAD entre 25 et 50) ou sévère (SCORAD > 50). (cf annexe 8) • Le patient doit présenter une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif pour le laboratoire <u>Critères d'inclusion spécifiques des patients avec asthme allergique :</u> • Le patient présente un asthme allergique diagnostiqué selon les critères GINA²¹ (cf annexe 6) • Le patient présente un asthme classé persistant léger à persistant sévère selon les critères GINA²¹ (cf annexe 6) • Le patient présente un asthme partiellement contrôlé ou non contrôlé selon l'ACQ²⁴⁻²⁵ (ACQ>1) avec ou sans traitement. (cf annexe 6) • Le patient doit présenter une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif pour le laboratoire

Critères de non-inclusion	• Le patient est incapable majeur ou majeur protégé • Le patient prend un traitement antimicrobien (antibiotique, antifongique ou antiviral) au long cours pour quelque raison que ce soit • Le patient a été en contact avec une bactérie multi-résistante • Le patient a bénéficié ou bénéficie d'une immunothérapie spécifique • Antécédent de cancer du système hématopoïétique (mastocytose incluse) • Antécédent de déficit immunitaire acquis par le virus HIV. • Le patient présente un déficit immunitaire congénital • Le patient présente une maladie inflammatoire du tube digestif • Le patient présente une maladie auto-immune et/ou inflammatoire qu'elle soit traitée ou non • Le patient a bénéficié d'une transplantation d'organe solide ou d'une greffe de cellules hématopoïétiques • Le patient est toxicomane • Le patient est une femme enceinte ou en âge de procréer sans contraception efficace • Le patient présente une défaillance d'organe sévère aigue ou chronique (insuffisance cardiaque, insuffisance respiratoire, insuffisance hépatique, insuffisance rénale, malabsorption). • Le patient parle difficilement français et/ou comprend difficilement le français • Le patient est dans l'incapacité de suivre le protocole • Le patient refuse la réalisation des prick-test
Critère de jugement principal	Le critère de jugement principal est le pourcentage moyen de lymphocytes T doubles positifs CD4+/CD8+ par rapport aux pourcentages moyen des lymphocytes T totaux (CD3+), des lymphocytes CD4+ et du nombre total d'éléments figurés du sang périphérique par rapport aux échantillons contrôles.
Critères de jugement secondaires	- La présence ou non d'une prolifération en présence de <i>F prausnitzii</i>. - la mise en évidence de marqueurs régulateurs tels que CTLA4, LAG3, CD25 et GITR sur les DP8 après prolifération avec <i>F prausnitzii</i> - Le taux de prolifération moyen des lymphocytes T doubles positifs spécifiques de <i>F prausnitzii</i> en présence de différentes espèces bactériennes dont <i>F prausnitzii</i>. - Evaluation du degré de sévérité de la maladie allergique : - SCORAD pour la dermatite atopique²³ - Sévérité de l'asthme selon l'ACQ²⁴⁻²⁵ - Sévérité de la rhinite allergique selon l'ARIA²² - Le taux de prolifération moyen des lymphocytes T doubles positifs spécifiques d'acariens (<i>Dermatophagoïdes ptérynyssinus</i>).
Etude ancillaire :	Non applicable
Autres évaluations	Non applicable
Analyse statistiques	Les analyses statistiques porteront sur des analyses descriptives de chaque population de lymphocytes T double positifs CD4+/CD8+. Une comparaison des moyennes de ces populations sera effectuée entre les trois groupes de patients et les échantillons contrôles. Des t-tests et des ANOVA permettront de tester les différences entre les groupes.

PAGE DE SIGNATURE

SIGNATURE DU RESPONSABLE DE LA RECHERCHE :

Le promoteur s'engage à réaliser cette étude selon toutes les dispositions législatives et réglementaires dont pourrait relever la recherche et selon le protocole.

Nom et fonction du représentant signataire :	Date :	Signature :
---	---------------	--------------------

SIGNATURE DES INVESTIGATEURS

J'ai lu l'ensemble des pages du protocole de la recherche dont le CHU de Nantes est le promoteur. Je confirme qu'il contient toutes les informations nécessaires à la conduite de l'essai. Je m'engage à réaliser l'essai en respectant le protocole et les termes et conditions qui y sont définis. Je m'engage à réaliser l'essai en respectant :

- ☐ les principes de la "Déclaration d'Helsinki",
- ☐ les règles et recommandations de bonnes pratiques cliniques internationales (ICH-E6) et française (règles de bonnes pratiques cliniques pour les recherches biomédicales portant sur des médicaments à usage humain - décisions du 24 novembre 2006)
- ☐ la législation nationale et la réglementation relative aux essais cliniques,
- ☐ la conformité avec la Directive Essais Cliniques de l'UE [2001/20/CE]

Je m'engage également à ce que les investigateurs et les autres membres qualifiés de mon équipe aient accès aux copies de ce protocole et des documents relatifs à la conduite de l'essai pour leur permettre de travailler dans le respect des dispositions figurant dans ces documents.

Investigateur coordonnateur	Nom :	Date :	Signature :
Investigateur principal	Nom et établissement :	Date :	Signature :
Autre (si nécessaire)	Nom, fonction et coordonnées :	Date :	Signature :

LISTE DES ABREVIATIONS

ACQ	Asthma Control Questionnaire
ANSM	Agence Nationale de la Sécurité du Médicament
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ARC	Attaché de Recherche Clinique
ARIA	Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma
BPC	Bonnes Pratiques Cliniques
CDn + ou -	Cluster of Differentiation n + ou - ; marqueur de lymphocytes
CPP	Comité de Protection des Personnes
CNIL	Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés
CRCNA	Centre Recherche en Cancérologie Nantes Angers
CRF	Case Report Form (cahier d'observation)
DP8	Lymphocytes T doubles positifs CD4+ et CD8+
ELISA	Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
FoxP3	Forkhead transcriPtion factor 3.
GINA	Global INitiative for Asthma
ICH	International Conference on Harmonization (Conférence internationale pour l'harmonisation)
IDE	Infirmière Diplômée d'Etat
IL-n	InterLeukine n
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
MR	Méthodologie de Référence
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells = cellules mononucléées du sang périphérique
SCORAD	SCORing Atopic Dermatitis
TEC	Technicien d'Etude Clinique
T reg	Lymphocyte T régulateur

TABLE DES MATIERES

RESUME	2
Page de signature	5
LISTE DES ABREVIATIONS	6
Table des Matières	7
INTRODUCTION	8
1. Justification de l'étude.....	9
1.1. Positionnement de la recherche.....	9
2. Objectifs et critères de jugement	12
2.1. Objectif et critère d'évaluation principal.....	12
2.2. Objectifs et critères d'évaluation secondaires	12
3. Design de la recherche	13
3.1. Methodologie générale de la recherche	13
3.2. Schéma de l'étude	13
4. Population étudiée	15
4.1. Description de la population	15
4.2. Critères de pré-inclusion	15
4.3. Critères d'inclusion	15
4.4. Critères de non inclusion	16
5. Déroulement de l'étude	17
5.1. Techniques d'études et d'analyses.....	17
5.2. Calendrier de l'étude	18
5.3. Identification de toutes les données sources ne figurant pas dans le dossier médical	21
5.4. Règles d'arrêt de la participation d'une personne	21
6. Data Management et statistiques	23
6.1. Recueil et traitement des données de l'étude	23
6.2. Statistiques	24
7. Sécurité.....	27
7.1. Comité de Surveillance indépendant.....	27
7.2. Effets indésirables	27
8. Aspects administratifs et réglementaires	28
8.1. Droit d'accès aux données et documents source	28
8.2. Monitoring de l'étude.....	28
8.3. Inspection / Audit	28
8.4. Considérations éthiques	29
8.5. Amendements au protocole.....	30
8.6. Règles relatives à la publication	30
8.7. Devenir des échantillons biologiques	30
9. Budget de l'étude	31
Liste des annexes.....	32

INTRODUCTION

La prévalence des **maladies allergiques** (dermatite atopique, asthme, rhinite, conjonctivite et allergie alimentaire) a considérablement augmenté dans les pays industrialisés au cours des 20-30 dernières années. Les maladies allergiques sont présentes surtout chez l'enfant et l'adulte jeune, mais toutes les tranches d'âge sont concernées, avec des variations selon les pays et l'âge. Afin de proposer de nouvelles thérapeutiques, il faut avant tout comprendre la physiopathologie¹.

Depuis leur découverte les lymphocytes T régulateurs n'ont cessé de faire l'objet de travaux visant à comprendre leur rôle dans le maintien de l'homéostasie immunitaire du corps humain mais également leur implication dans les maladies auto-immunes, les maladies inflammatoires, les transplantations d'organes solides ou liquides et les maladies allergiques.

Il a été identifié deux grandes classes de lymphocytes T régulateurs :

- les lymphocytes T régulateurs naturels = acquisition d'un phénotype et d'une fonction régulatrice dès la sortie du thymus (CD25+/CD127+low/FoxP3+).
- les lymphocytes T régulateurs induits = acquisition d'un phénotype et d'une fonction régulatrice en périphérie en fonction du micro-environnement cytokinique.

La caractérisation phénotypique de ces derniers est moins évidente et ce d'autant plus que durant les dix dernières années plusieurs populations de lymphocytes T régulateurs induits ont été décrites (Tr1 par exemple)²⁻³.

Récemment, l'équipe du Pr Francine JOTEREAU a identifié une nouvelle sous-population de lymphocytes T induits chez les sujets atteints de maladies inflammatoires du tube digestif (MICI). Ces derniers ont un phénotype particulier car portant le double marquage CD4 et CD8 avec un phénotype régulateur. De plus, ils sont induits et spécifiques d'une bactérie intestinale commensale (*Faecalibacterium prausnitzii*).

En ce qui concerne les allergies, il a été largement démontré un lien entre les altérations du microbiote intestinal et la survenue de maladies allergiques.

Nous souhaitons donc proposer une étude transversale, monocentrique, contrôlée, en simple insu pour étudier le rôle de ces lymphocytes T régulateurs induits doubles positifs dits DP8 afin de comparer la fréquence et la fonction régulatrice des DP8 spécifiques de *Faecalibacterium prausnitzii* dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique par rapport à des échantillons contrôles.

Le critère de jugement principal sera la mise en évidence d'une diminution quantitative des lymphocytes T doubles positifs (CD4+/CD8+) du sang périphérique spécifiques de *F prausnitzii* chez les patients atteints d'asthme allergique, de rhinite allergique et de dermatite atopique par rapport à des échantillons contrôle issus d'une collection témoin mise à disposition par le laboratoire BIOFORTIS®.

1. JUSTIFICATION DE L'ETUDE

1.1. POSITIONNEMENT DE LA RECHERCHE

1.1.1 Les lymphocytes T doubles positifs DP8 spécifique de *F. prausnitzii*

L'intestin humain est l'hôte d'une grande diversité bactérienne tant en nombre qu'en espèces que l'on réfère sous le terme de « microbiote intestinal ». Sa composition semblerait fortement influencer l'homéostasie immunitaire et l'état de santé en général. Outre sa contribution au métabolisme, plusieurs modèles animaux ont permis de démontrer que le microbiote joue un rôle dans la formation et la composition du système immunitaire local et notamment l'induction de lymphocytes T régulateurs (T reg). Ces derniers sont essentiels dans le maintien de l'homéostasie de l'intestin⁴.

De récentes études avec des modèles murins germ-free ont identifié une bactérie sporulée appartenant aux clusters IV et XIVa du genre des *Clostridium* comme l'inducteur majoritaire de T reg coliques FoxP3 positif et IL-10 positifs. Cette étude a également montré que ces T reg coliques induits avaient un rôle clé dans l'homéostasie et la prévention de l'allergie⁵.

On sait également que chez l'Homme, les altérations du microbiote intestinal appelées dysbiose sont associées à des maladies auto-immunes ou inflammatoires telles que les MICI, le diabète de type 1 ou encore les maladies allergiques.

Récemment, il a été identifié une nouvelle sous-population de T reg chez l'homme induits par une bactérie intestinale commensale, *Faecalibacterium prausnitzii*, appartenant au cluster IV des *Clostridium*. Cependant, contrairement aux T reg coliques identifiés chez la souris, les T reg induits par *F. prausnitzii* chez l'homme sont doubles positifs pour le CD4 et CD8αα (DP8) et n'expriment pas le FoxP3 ce qui explique pourquoi ils n'avaient pas été découverts jusqu'à présent. De plus, les DP8 expriment des marqueurs régulateurs tels que GITR, LAG3, CD25, CTLA et sécrètent de l'IL-10. Ces lymphocytes DP8 spécifiques de *F. prausnitzii* semblent donc les équivalents des FoxP3 induits chez la souris et ce d'autant plus que les DP8 n'ont jamais été mis en évidence dans la muqueuse colique de souris⁶.

De manière intéressante chez les patients atteints de MICI, on observe une diminution de la proportion de *F. prausnitzii* dans les matières fécales. L'équipe du Pr Jotereau a démontré qu'il existait une corrélation entre la diminution de *F. prausnitzii* dans les matières fécales et le taux de DP8 spécifique de cette dernière dans le colon et le sang périphérique en comparaison aux sujets sains. L'équipe a également démontré que chez les sujets sains les DP8 spécifiques de *F. prausnitzii* représentaient 2,5% des CD4+ circulants. Fait intéressant, seulement 20 à 40% des DP8 circulants étaient spécifiques de *F. prausnitzii* ce qui laisse supposer que les autres DP8 non spécifiques de *F. prausnitzii* pourraient être induits par une ou plusieurs autres bactéries du microbiote⁶.

Enfin dans des modèles murins germ-free avec reconstitution du microbiote intestinal, il a été démontré que les T reg induits par les *Clostridium* recirculaient et avaient un rôle dans la prévention de l'allergie. De plus, l'inoculation par voie orale de *Clostridium* tolérogènes chez des souris induisait une résistance à l'apparition d'une colite allergique expérimentale ainsi que l'apparition d'une réponse IgE systémique^{5,7}.

1.1.2 Les maladies allergiques et les dysbioses intestinales

Depuis environ une dizaine d'années, plusieurs articles de recherche clinique ont mis en évidence un lien entre une dysbiose et la survenue de pathologies allergiques telles que la dermatite atopique, la rhinite allergique ou l'asthme allergique^{8,9}.

En effet, deux études ont montré que la réduction de la diversité du microbiote intestinal durant l'enfance exposait au développement de différentes maladies allergiques et mettait en évidence la présence d'une inflammation allergique dans le sérum^{10,11}.

De manière plus précise dans l'asthme, plusieurs études démontrent le caractère pro-inflammatoire de l'absence ou en tout cas la diminution de certaines bactéries comme les *Clostridium* qui résulte de l'apparition d'une inflammation de type Th2 dans les bronches¹¹⁻¹³. Dans le même esprit, on retrouve l'implication de bactéries commensales du tube digestif telles que les *Clostridium* ainsi que la diminution de la diversité du microbiote intestinal dans le développement de la dermatite atopique chez de jeunes enfants¹⁴⁻¹⁶.

Il faut toutefois noter que certains articles ne retrouvent pas ces différences. Cela tient probablement en grande partie aux méthodes d'analyse du microbiote intestinal allant de la simple coproculture à la caractérisation moléculaire de l'ARN 16S. En effet, aucune technique de référence n'a été jusqu'à présent reconnue pour l'analyse du microbiote d'un organe. Cela risque de changer avec les résultats du Human Microbiome Project¹⁷.

Une autre preuve de l'existence d'une relation entre maladies allergiques et dysbioses sont les modèles murins exposés à une antibiothérapie puis exposés à un allergène sur les voies aériennes basses (*Asp fumigatus*) dans lesquels on retrouve une hyperréactivité bronchique aux épreuves fonctionnelles respiratoires et un remodelage bronchique à l'histologie. Cela démontre l'importance de l'équilibre du microbiote intestinal dans le développement d'un phénomène allergique^{18,19}.

Enfin, aucun article n'a pour le moment fait état des mécanismes reliant dysbiose et maladies allergiques.

1.1.3 But de l'étude

Au vu des différentes données disponibles, nous avons décidé de mettre en place une étude transversale, monocentrique, contrôlée, en simple insu pour étudier le rôle de ces lymphocytes T régulateurs induits doubles positifs dits DP8 afin de comparer la fréquence et la fonction régulatrice des DP8 spécifiques de *Faecalibacterium prausnitzii* dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique par rapport aux échantillons contrôles.

Les patients seront inclus dans le groupe correspondant à leur pathologie allergique soit 3 groupes possibles : asthme allergique, rhinite allergique et dermatite atopique.

Les échantillons contrôles proviendront de la collection biologique de BIOFORTIS® constituée à partir de patients non allergiques.

La participation des patients se résumera au recueil d'un échantillon sanguin de 40mL au total.

L'objectif principal sera la mise en évidence d'une diminution quantitative des lymphocytes T doubles positifs (CD4+/CD8+) du sang périphérique spécifique de *F prausnitzii* chez les patients atteints

d'asthme allergique, de rhinite allergique et de dermatite atopique ainsi que la mise en évidence d'un phénotype régulateur par rapport aux échantillons contrôles.

Les objectifs secondaires seront :

- la recherche d'une corrélation entre les taux de lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique et le niveau de contrôle de la maladie allergique.
- la recherche d'une corrélation entre le taux de prolifération des lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique spécifiques de *F prausnitzii* et le niveau de contrôle de la maladie allergique.
- la recherche d'une prolifération des lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique en présence d'acariens (*Dermatophagoïdes pteronyssinus*).

Enfin, la nouveauté de ce projet qui en fait aussi son originalité est que les DP8 induits par *F prausnitzii* ayant été récemment identifiés chez l'homme, aucune étude à l'heure actuelle n'a encore étudié leur implication dans les pathologies allergiques telles que la dermatite atopique, l'asthme allergique et la rhinite allergique.

1.1.4 Perspectives

L'existence d'une corrélation entre des taux de DP8 spécifiques de *F prausnitzii* et les maladies allergiques suggérerait fortement l'existence d'une dysbiose en regard de la proportion de *F prausnitzii* chez les patients allergiques par analogie aux patients atteints de MICI.

Cela pourrait justifier d'étudier plus en détails le microbiote intestinal de ces patients et notamment étudier la proportion de *F prausnitzii* et tester l'existence d'une corrélation entre le taux de DP8 spécifique de cette dernière dans le sang périphérique et sa proportion. On peut également envisager de reproduire cette corrélation pour d'autres bactéries de la flore commensale et d'autres organes tels que les poumons, la peau.

A terme, de nouvelles stratégies thérapeutiques pourraient être envisagées pour les maladies allergiques en modulant le microbiote intestinal ou d'autres organes et ce avec un marqueur biologique permettant de contrôler l'effet escompté par le taux de DP8 spécifique d'une ou plusieurs bactéries du microbiote humain.

Les données recueillies à partir de cette étude permettront de poser les premiers fondements mécanistiques d'un champ de l'allergologie qui est encore méconnu à savoir le lien entre le microbiote intestinal et le développement/prévention des pathologies allergiques sus-citées.

A terme ces découvertes pourraient offrir de nouvelles pistes thérapeutiques lorsque les connaissances sur le microbiote intestinal à savoir sa diversité, sa physiologie et ses interactions avec les autres systèmes de l'organisme seront mieux décryptées. Des manipulations de ce dernier pourraient être envisagées pour restaurer une fonction physiologique telle que la tolérance envers des allergènes pour ce qui concerne notre étude.

2. OBJECTIFS ET CRITERES DE JUGEMENT

2.1. OBJECTIF ET CRITERE D'EVALUATION PRINCIPAL

2.1.1 Objectif principal

Mise en évidence d'une diminution quantitative des lymphocytes T doubles positifs (CD4+/CD8+) du sang périphérique spécifique de *F prauznitzii* chez les patients atteints d'asthme allergique, de rhinite allergique et de dermatite atopique ainsi que la mise en évidence d'un phénotype régulateur par rapport aux échantillons contrôles.

2.1.2. Critère d'évaluation principal

Le critère de jugement principal est le pourcentage moyen de lymphocytes T doubles positifs CD4+/CD8+ par rapport aux pourcentages moyen des lymphocytes T totaux (CD3+), des lymphocytes CD4+ et du nombre total d'éléments figurés du sang périphérique par rapport aux échantillons contrôles.

2.2. OBJECTIFS ET CRITERES D'EVALUATION SECONDAIRES

2.2.1 Objectifs secondaires

- Existe-t-il une corrélation entre les taux de lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique et le niveau de contrôle de la maladie allergique ?
- La mise en évidence d'un phénotype régulateur après prolifération avec *F prausnitzii* ?
- Existe-t-il une corrélation entre le taux de prolifération des lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique spécifiques de *F prausnitzii* et le niveau de contrôle de la maladie allergique ?
- Existe-t-il une prolifération des lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique en présence d'acariens (*Dermatophagoïdes pteronyssinus*) ?

2.2.2. Critères d'évaluation secondaires

- La présence ou non d'une prolifération en présence de *F prausnitzii*.
- la mise en évidence de marqueurs régulateurs tels que CTLA4, LAG3, CD25 et GITR sur les DP8 après prolifération avec *F prausnitzii*
- Le taux de prolifération moyen des lymphocytes T doubles positifs spécifiques de *F prausnitzii* en présence de différentes espèces bactériennes dont *F prausnitzii*.
- Evaluation du degré de sévérité de la maladie allergique :
 - SCORAD pour la dermatite atopique²³
 - Sévérité de l'asthme selon l'ACQ²⁴⁻²⁵
 - Sévérité de la rhinite allergique selon l'ARIA²²
- Le taux de prolifération moyen des lymphocytes T doubles positifs spécifiques d'acariens (*Dermatophagoïdes pteronyssinus*).

3. DESIGN DE LA RECHERCHE

3.1. METHODOLOGIE GENERALE DE LA RECHERCHE

La recherche présente les caractéristiques suivantes :

- ☐ Etude de soins courants,
- ☐ Etude monocentrique
- ☐ Etude transversale
- ☐ Etude contrôlée : 3 groupes
 - patients avec une rhinite allergique
 - patients avec une dermatite atopique
 - patients avec un asthme allergique
- ☐ Etude non randomisée
- ☐ Etude en simple insu

3.2. SCHEMA DE L'ETUDE

La durée prévue de participation des patients à l'étude est de 1 journée.

- 1 journée à la plateforme transversale d'allergologie pour la consultation d'inclusion et le prélèvement sanguin pour les 3 groupes allergiques

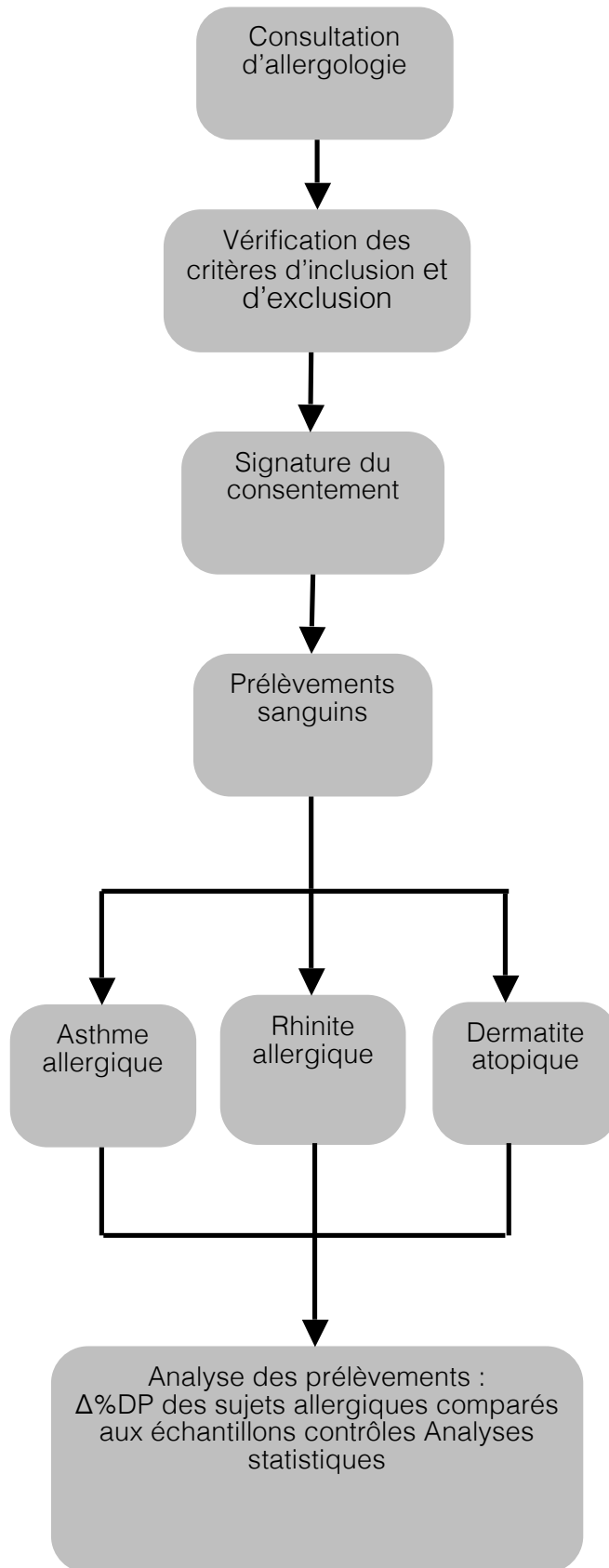
La durée de l'étude est estimée à 2 ans :

- Démarches réglementaires : 4 mois
- 1 an d'inclusion
- 8 mois pour les analyses (cf calendrier de l'étude)

La date de début : Novembre 2014

La date de fin : octobre 2016

L'objectif d'inclusions est fixé à 90 avec 30 sujets dans chaque groupe.



4. POPULATION ETUDIEE

4.1. DESCRIPTION DE LA POPULATION

Cette étude s'adresse aux patients devant bénéficier d'une consultation avec un médecin allergologue au CHU de Nantes ou en cabinet de ville dans le cadre d'un suivi ou d'une première consultation pour une dermatite atopique, un asthme allergique ou une rhinite allergique.

Les patients des cabinets d'allergologie de ville, qui satisfont aux critères de sélection, seront adressés à la plateforme transversale d'allergologie du CHU de Nantes pour réaliser leur inclusion.

Il est prévu 30 sujets dans chaque groupe soit un total de 90 sujets.

La durée de participation à la recherche est de 1 journée.

Les patients participant à cette recherche pourront participer de façon simultanée à des recherches interventionnelles ou non interventionnelles sous réserve de correspondre aux critères de sélection de ces études.

4.2. CRITERES DE PRE-INCLUSION

Critères de pré-inclusion:

- Sujet âgé de 18 à 70 ans
- Le sujet est non-fumeur
- Le sujet présente un BMI inférieur à 30 kg/m²
- Le patient **ne** présente **pas** de contre-indication à la réalisation de prick test.
- Le sujet a donné son accord pour participer à l'étude et la collection
- Le sujet est affilié à un régime de sécurité sociale

4.3. CRITERES D'INCLUSION

Critères d'inclusion spécifiques des patients avec rhinite allergique :

- Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique dûment diagnostiquée selon les critères ARIA²² (cf annexe 6)
- Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique classée persistante légère ou persistante modérée à sévère selon les critères ARIA²² (cf annexe 6)
- Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique non contrôlée selon les critères ARIA²² avec ou sans traitement. (cf annexe 6)
- Le patient présente une rhinite et/ou une conjonctivite imputable à la présence d'acariens
- Le patient doit présenter une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif pour le laboratoire

Critères d'inclusion spécifiques des patients avec dermatite atopique :

- Le patient présente une dermatite atopique (cf annexe 8) classée modérée (SCORAD entre 25 et 50) ou sévère (SCORAD > 50). (cf score SCORAD²⁴, annexe 8)
- Le patient doit présenter une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif pour le laboratoire

Critères d'inclusion spécifiques des patients avec asthme allergique :

- Le patient présente un asthme allergique diagnostiqué selon les critères GINA²¹ (cf annexe 6)
- Le patient présente un asthme classé persistant léger à persistant sévère selon les critères GINA²¹ (cf annexe 6)
- Le patient présente un asthme partiellement contrôlé ou non contrôlé selon l'ACQ²⁴⁻²⁵ (ACQ > 1) avec ou sans traitement. (cf annexe 6)
- Le patient doit présenter une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif pour le laboratoire

4.4. CRITERES DE NON INCLUSION

Les critères de non-inclusion des patients se prêtant à l'étude sont :

- Le patient est incapable majeur ou majeur protégé
- Le patient prend un traitement antimicrobien (antibiotique, antifongique ou antiviral) au long cours pour quelque raison que ce soit
- Le patient a été en contact avec une bactérie multi-résistante
- Le patient a bénéficié ou bénéficie d'une immunothérapie spécifique
- Antécédent de cancer du système hématopoïétique (mastocytose incluse)
- Antécédent de déficit immunitaire acquis par le virus HIV.
- Le patient présente un déficit immunitaire congénital
- Le patient présente une maladie inflammatoire du tube digestif
- Le patient présente une maladie auto-immune et/ou inflammatoire qu'elle soit traitée ou non
- Le patient a bénéficié d'une transplantation d'organe solide ou d'une greffe de cellules hématopoïétiques
- Le patient est toxicomane
- Le patient est une femme enceinte ou en âge de procréer sans contraception efficace
- Le patient présente une défaillance d'organe sévère aigue ou chronique (insuffisance cardiaque, insuffisance respiratoire, insuffisance hépatique, insuffisance rénale, malabsorption).
- Le patient parle difficilement français et/ou comprend difficilement le français
- Le patient est dans l'incapacité de suivre le protocole
- Le patient refuse la réalisation des prick-test

5. DEROULEMENT DE L'ETUDE

5.1. TECHNIQUES D'ETUDES ET D'ANALYSES

5.1.1. Description détaillée des paramètres d'évaluation

En ce qui concerne le critère principal :

- Pourcentage de DP8 en fonction des CD3+
- Pourcentage de DP8 en fonction des CD4+
- Pourcentage de DP8 en fonction du nombre total d'éléments figurés du sang

Ils seront évalués par la technique de référence en pratique clinique qui est la cytométrie de flux sur sang total.

En ce qui concerne les critères secondaires :

- Pourcentage de DP8 spécifique de *F. prausnitzii* ayant proliféré
- La mise en évidence de marqueurs régulateurs tels que CTLA4, LAG3, CD25 et GITR sur les DP8 après prolifération avec *F. prausnitzii*
- Pourcentage de DP8 spécifiques d'acariens (*Dermatophagoïdes pteronyssinus*) ayant proliféré

Les pourcentages de prolifération seront évalués par cytométrie de flux en analysant la fluorescence d'un marqueur intracellulaire le VPD 450.

- SCORAD pour évaluer la sévérité de la dermatite atopique²³
- Sévérité de l'asthme selon l'ACQ pour les patients atteints d'asthme allergique²⁴⁻²⁵
- Sévérité de la rhinite selon ARIA pour les patients atteints de rhinite allergique²²

Ces scores ont été validés par les sociétés savantes et couramment utilisés en pratique clinique quotidienne²¹⁻²⁴.

5.1.2. Description des techniques et analyses

Les patients atteints de maladie allergique seront inclus suivant les critères détaillés au chapitre 4. La vérification des critères d'éligibilité sera validée par le médecin investigateur au moment de la visite d'inclusion. Les prick-tests, lors de la consultation d'inclusion, seront réalisés avec des extraits allergéniques standardisés au niveau de l'avant-bras du patient selon les règles de bonnes pratiques :

- Dépôt d'un goutte d'extrait allergénique tous les 3 cm
- Effraction de l'épiderme par une lancette sans induire de saignement. Chaque lancette est à usage unique pour une solution allergénique donnée, le témoin positif et le témoin négatif.
- Essuyage des extraits allergéniques 1 minute après ponction par la lancette
- Lecture à 20 minutes.
- La positivité du test = si papule > 3mm et érythème >10mm **ou** doublement de la papule par rapport au témoin positif.

A noter que la proportion de patients atopiques dans la population générale est de 30% environ, il en sera tenu compte dans le nombre d'échantillons contrôles à tester. Les échantillons contrôles pré-inclus dont le Phadiatop^(R)²⁰ retrouvera une sensibilisation asymptomatique seront exclus de l'analyse.

Le protocole requiert ainsi 30 échantillons négatifs à la sensibilisation aux pneumallergènes courants (échantillons contrôles). Ce nombre de prélèvements négatifs sera obtenu à partir d'échantillons issus d'un groupe de 75 sujets témoins constitué par le laboratoire BioFortis pour ses propres activités de recherche ou celles de partenaires scientifiques nécessitant de faire appel à une population indemne de la pathologie d'intérêt. La négativité s'établissant grâce au Phadiatop[®] réalisé sur sérum ou plasma.

Les patients seront prélevés de 40mL de sang total sur EDTA (4 tubes de 9mL) par ponction directe d'une veine périphérique. Ces échantillons seront conservés à 4°C avant le transfert au CRCNA-UMR 892 INSERM. Les tubes EDTA seront fournis. Des étiquettes au nom du protocole devront être renseignées du numéro du patient puis collées sur chaque tube. Le transport des échantillons le jour même depuis le CHU de Nantes jusqu'au CRCNA-UMR 892 INSERM sera réalisée par navette interne.

L'analyse des pourcentages de DP8 sur sang total sera effectuée au CRCNA-UMR 892 INSERM par cytométrie de flux (FACS Canto) avec marquage préalable par des anticorps anti CD4/CD8/CD45/CD3 couplés à des fluorochromes. Ces pourcentages seront déterminés à l'aide du logiciel FlowJo. Cette analyse sera effectuée par un biologiste du CRCNA-UMR 892 INSERM ne connaissant pas le statut de l'échantillon (patient allergique ou échantillon contrôle) afin de maintenir le simple insu.

Les épreuves de prolifération en présence de différentes espèces bactériennes (dont *F. prauznitzii*) et d'acariens nécessitent plusieurs étapes

- la première étant d'isoler les PBMC par gradient de Ficoll.
- La seconde étant le tri des monocytes puis des lymphocytes CD4 + totaux à partir des PBMC. Pour cela on utilisera des kits de tri cellulaire par sélection négative à l'aide de microbilles magnétiques et d'une colonne magnétique.
- La troisième étant le chargement des monocytes isolés avec les différentes espèces bactériennes et l'acarien (*Dermatophagoïdes pteronyssinus*).
- La quatrième étant l'incubation pendant 5 jours des monocytes chargés (soit bactérie soit acarien) et des lymphocytes sur milieu de culture sans facteurs de croissance ni de cytokines + le marquage par VPD 450.
- La cinquième étant l'analyse de la prolifération cellulaire des DP8 par cytométrie de flux (prolifération cellulaire = diminution de l'intensité de fluorescence du VPD par dilution de ce dernier lors de la prolifération) + présence d'un phénotype régulateur des DP8 par analyse en cytométrie de flux de marqueurs (CTLA4, CD25, GITR, LAG3).

A noter que chaque analyse sera confrontée à un contrôle interne qui sera les lymphocytes T CD4+ CD8- du même patient.

Cette analyse sera effectuée par un biologiste du CRCNA-UMR 892 INSERM ne connaissant pas le statut du patient (allergique ou contrôle) afin de maintenir le simple insu.

5.2. CALENDRIER DE L'ETUDE

La visite d'inclusion :

Le recrutement des patients allergiques se fera à partir des patients consultant un médecin allergologue au CHU de Nantes.

Le médecin investigateur propose au patient de participer à l'étude avec remise du formulaire d'information et signature du consentement.

Le médecin investigateur s'assure que le patient répond aux critères d'inclusion et de non inclusion définis par le CRF.

La période d'inclusion s'étendra sur 1 an au maximum.

Le recueil de l'échantillon sanguin (= participation du patient) et analyse immédiate :

Quantité = 40mL de sang total sur EDTA par ponction veineuse directe (4 tubes de 9mL).

Il se fera le jour même lors de la consultation à la plateforme transversale d'allergologie

Le transfert des échantillons se fera comme édité ci-dessus (Cf. 5.1.2)

L'analyse du pourcentage de DP8 sur sang total par rapport au CD3+, CD4+ et nombre total d'éléments figurés du sang sera réalisée le lendemain selon la méthode éditée ci-dessus (Cf. 5.1.2).

Les PBMC seront ensuite extraits sur gradient de Ficoll et congelés à -80°C jusqu'à la fin de la période d'inclusion soit 1 an au maximum.

Ces étapes seront réalisées le soir même ou le lendemain de la réception de l'échantillon.

Les échantillons contrôles seront obtenus via la biocollection de BIOFORTIS qui a accepté de céder des échantillons de sa collection biologique portant le Numéro d'autorisation : **AC-2013-1792**.

Les échantillons proviennent de patients se portant volontaires pour participer à une collection biologique de sujets sains : la collection GOMMS, le consentement de cette collection est en Annexe 5 pour information.

Un phadiatop sera réalisé sur les échantillons cédés par BIOFORTIS afin de s'assurer du caractère non allergique de l'échantillon, seul les échantillons contrôles avec Phadiatop négatif pourront être inclus dans l'analyse.

Analyse différée :

L'épreuve de prolifération en présence de différentes espèces bactériennes commensales de la flore digestive humaine et la recherche d'un phénotype régulateurs des DP8 sera réalisée comme décrite ci-dessus (Cf. 5.1.2) et commencera à la fin de la période d'inclusion.

La durée maximale attendue pour cette phase est de 1 an maximum.

Actions	Visite d'inclusion	Le lendemain	Analyse par pool (fin de l'inclusion = 1 an max)	J+5 après le début de l'analyse par pool (1 an maximum)
Examen clinique	x			
Information éclairée de l'étude et signature du consentement	x			
Inclusion des patients allergiques	x			
Réalisation du Phadiatop	x			
Prélèvement sanguin	x			
Tri des PBMC par FICOLL		x		
Analyse des DP8αα en cytométrie de flux		x		
Congélation des PBMC restants		x		
Constitution de la biocollection Prévall-DP (PBMC et serum/plasma)		x		
Tri des monocytes CD14+ et des lymphocytes CD4+ totaux sur les PBMC décongelés			x	
Epreuve de prolifération en présence de différentes espèces bactériennes et d'acarien.			x	
Analyse de la prolifération de DP8αα et des CD4+ par cytométrie de flux				x
Analyse du phénotype régulateur des DP8αα et des CD4+ stimulées				x

Calendrier de l'étude

5.3. IDENTIFICATION DE TOUTES LES DONNEES SOURCES NE FIGURANT PAS DANS LE DOSSIER MEDICAL

Au plan clinique :

- SCORAD pour évaluer la sévérité de la dermatite atopique²³
- Sévérité de l'asthme selon l'ACQ pour les patients atteints d'asthme allergique²⁴⁻²⁵
- Sévérité de la rhinite selon ARIA pour les patients atteints de rhinite allergique²²
- Présence concomitante d'une autre pathologie allergique

Au plan analytique :

- Pourcentage de DP8 en fonction des CD3+
- Pourcentage de DP8 en fonction des CD4+
- Pourcentage de DP8 en fonction du nombre total d'éléments figurés du sang
- Pourcentage de DP8 spécifique de *F. prausnitzii* ayant proliféré
- Pourcentage de DP8 spécifique d'extrait total d'acarien (*Dermatophagoïdes pteronyssinus*) ayant proliféré
- La mise en évidence de marqueurs régulateurs tels que CTLA4, LAG3, CD25 et GITR sur les DP8 après prolifération avec *F. prausnitzii*

Ces données seront reportées dans l'eCRF soit par les investigateurs, le TEC, l'ARC/IRC.

5.4. REGLES D'ARRET DE LA PARTICIPATION D'UNE PERSONNE

5.4.1. 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 l'étude (retrait de consentement)
- la survenue d'un choc anaphylactique
- la nécessité de prendre un traitement immunosuppresseur et/ou immunomodulateur entre l'inclusion et le recueil du prélèvement sanguin.

Lorsqu'un patient sera sorti d'étude, les données le concernant ne seront plus recueillies.

La sortie prématurée du patient de l'étude n'aura aucune conséquence sur son suivi classique.

La durée de la recherche étant d'une journée le risque de perdre de vue est très faible.

5.4.2. Procédures d'arrêt prématuré de la participation d'une personne à la recherche

Pour les patients sortis d'étude, la raison sera précisée dans le dossier médical.

Tout patient sorti de l'étude ne sera pas remplacé.

Pour les modalités et la durée du suivi des personnes ayant arrêté prématurément l'étude, se reporter à la section statistique.

5.4.3. Critères d'arrêt de la recherche (hors considérations biostatistiques)

La durée de l'étude est estimée à 2 ans

Sur décision du CPP, de l'établissement responsable ou de l'investigateur coordonnateur, l'étude peut être interrompue (faute de recrutement, question devenue obsolète...)

En cas d'arrêt prématuré de l'étude, l'information sera transmise dans un délai de 15 jours à l'autorité compétente et au CPP.

6. DATA MANAGEMENT ET STATISTIQUES

6.1. RECUEIL ET TRAITEMENT DES DONNEES DE L'ETUDE

6.1.1. Recueil des données

Un cahier d'observation électronique (eCRF) sera créé par patient. Toutes les informations requises par le protocole doivent être fournies dans le CRF. Il doit comprendre les données nécessaires pour confirmer le respect du protocole et toutes les données nécessaires aux analyses statistiques, et déceler les écarts majeurs au protocole. La personne responsable du remplissage des eCRF sera identifiée dans le tableau de délégation des responsabilités.

Le recueil des données sera effectué directement par l'investigateur ou le TEC de l'équipe clinique, en utilisant un CRF électronique (eCRF) accessible depuis le site interne.

Chaque personne (investigateur, ARC/IRC, ARC de Promotion, ARC de Monitoring) disposera d'un compte utilisateur personnel en rapport avec son rôle (profil) qui lui aura été assigné par le responsable de l'étude. La création et l'administration des comptes informatiques sera assurée par le Data Manager en charge de l'étude.

Chaque utilisateur devra changer son mot de passe initial à la première connexion : mot de passe crypté de 8 caractères alphanumériques minimum, durée de validité du mot de passe : 30 jours, mise en veille après 15 minutes d'inactivité sur l'application, blocage du compte utilisateur après 3 échecs de connexion.

Un guide de saisie et de navigation sera fourni à l'investigateur et à l'ARC/IRC chargés du recueil des données. Le Data Manager en charge de l'étude assurera une assistance téléphonique en cas de problème lié à l'utilisation de l'eCRF.

6.1.2. 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 première lettre du nom, la première lettre du prénom, le numéro d'inclusion, la date de naissance (mois/année seulement) du patient et les initiales de la pathologie allergique (RA, DA, AA, EC) seront les seules informations qui figureront sur le cahier d'observation (CRF) et qui permettront de rattacher à posteriori le CRF au patient.

Ce code sera la seule information qui figurera sur le cahier d'observation (CRF) et qui permettra de rattacher à posteriori le CRF au patient.

Le promoteur est également tenu de coder les données patients sur tous les documents qu'il pourrait avoir en sa possession (compte-rendus d'examen d'imagerie, de biologie, ...) qui seraient joints au CRF.

6.1.3. Traitement des données

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

La structure de la base de données et des écrans de saisie sera approuvée par l'établissement responsable de l'étude.

6.2. STATISTIQUES

Nom et coordonnées du responsable de l'analyse :

Béatrice DELASALLE-GUYOMARC'H - Institut du Thorax – CHU de Nantes, Hôpital Laënnec

6.2.1. Description des méthodes statistiques prévues, y compris du calendrier des analyses intermédiaires prévues

Le critère de jugement principal est le pourcentage moyen de lymphocytes T doubles positifs CD4+/CD8+ par rapport au pourcentage moyen des lymphocytes T totaux (CD3+), des lymphocytes CD4+ et du nombre total d'éléments figurés du sang périphérique. Ces moyennes (+/- écartype) seront comparées à l'aide de t-tests entre les 2 groupes d'échantillons patients et contrôles. Si des différences significatives sont notées, on procédera à des analyses en sous-groupes de patients malades.

Des modèles de régression linéaire permettront d'ajuster sur l'âge (+/- d'autres facteurs).

Les autres facteurs (exemple : La présence ou non d'une prolifération en présence de F prausnitzii) seront décrits avec leur effectif et pourcentage.

Pour les analyses secondaires, des comparaisons de moyennes entre les groupes de patients permettront de décrire les autres populations (les marqueurs régulateurs tels que CTLA4, LAG3, CD25 et GITR sur les DP8 après prolifération avec F prausnitzii). Des t-tests seront également utilisés.

Des tests de corrélation de Person seront également utilisés pour évaluer une corrélation entre ces populations de lymphocytes T double positifs et les critères cliniques de sévérité des pathologies allergiques (SCORAD pour la dermatite atopique²³, Sévérité de l'asthme selon l'ACQ²⁴⁻²⁵, Sévérité de la rhinite allergique selon l'ARIA²²).

Une analyse intermédiaire à la moitié des inclusions sera réalisée sur le critère de jugement principal à savoir la moyenne des pourcentages du taux de DP dans le sang périphérique entre les patients allergiques (toute pathologie allergique confondue) et les contrôles à l'aide d'un t-test. Une analyse en sous-groupe (par pathologie) sera faite si des différences significatives sont notées.

6.2.2. Justification statistique du nombre d'inclusions

Les données de la littérature sur ces nouvelles sous populations de lymphocytes T double positifs sont pauvres. Nous espérons une différence importante entre le groupe de patients malades et le groupe constitué des échantillons contrôles. Des données internes de l'EFS sur des sujets sains montrent sur un petit échantillon que la moyenne du pourcentage de DP8 en fonction des CD3+ serait de 1.08+/-0.63. Avec un risque alpha à 5% et une puissance à 80%, on a besoin d'au moins 30 patients dans chaque groupe pour montrer une diminution d'au moins 40%. Notre groupe de patients malades sera composé de sous-groupes de patients atteints d'asthme allergique, de rhinite allergique, et de dermatite atopique. Il s'agit d'une étude observationnelle donc le nombre de sujets à inclure a été aussi déterminé en tenant compte des moyens matériels disponibles et d'exigences statistiques non strictes. Nous avons choisi d'inclure 30 patients dans chaque sous-groupe soit 90 patients au total.

6.2.3. Degré de signification statistique prévu

Le seul alpha est fixé à 5%

6.2.4. Critères statistiques d'arrêt de la recherche

Aucun malgré l'absence de significativité de l'analyse intermédiaire.

6.2.5. Méthode de prise en compte des données manquantes, inutilisées ou non valides

Les données manquantes seront décrites en termes d'effectifs et pourcentages.

Les patients pour lesquels il y aura des données manquantes ne seront pas remplacés. La gestion des données incomplètes se fera de la manière suivante à travers notamment des analyses de sensibilité permettant d'évaluer la robustesse des résultats en envisageant plusieurs stratégies possible d'imputation des données manquantes :

- les données manquantes seront remplacées par la valeur la plus défavorable,
- les données manquantes seront remplacées par la dernière valeur disponible,
- des méthodes d'imputation multiple seront utilisées pour remplacer les données manquantes.

6.2.6. Gestion des modifications apportées au plan d'analyse de la stratégie initiale

En cas d'analyse intermédiaire montrant une diminution significative du taux de DP dans le sang périphériques des patients allergiques par rapport aux contrôles, le plan d'analyse ne sera pas modifiée.

En cas d'analyse intermédiaire ne montrant pas une diminution significative du taux de DP dans le sang périphérique des patients allergiques par rapport aux contrôles :

- soit la significativité (valeur du p) est entre 0,05 et 0,1 : le NSN sera augmenté à 60 patients par groupe.
- soit la significativité (valeur du p) est supérieure à 0,1 : la plan ne sera pas modifié malgré l'absence de significativité probable à la fin du protocole.

6.2.7. Choix des personnes à inclure dans les analyses

L'ensemble des patients inclus sera utilisé pour les analyses.

6.2.8. Randomisation

Non applicable

7. SECURITE

7.1. COMITE DE SURVEILLANCE INDEPENDANT

Non applicable

7.2. 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...).

Tout effet indésirable survenant pendant le déroulement du protocole ne saurait être imputable à la présente Recherche en Soins Courants.

8. ASPECTS ADMINISTRATIFS ET REGLEMENTAIRES

8.1. DROIT D'ACCES AUX DONNEES ET DOCUMENTS SOURCE

Les données médicales de chaque patient ne seront transmises qu'au 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 responsable de la recherche et les autorités de tutelle pourront demander un accès direct au dossier médical pour vérification des procédures et/ou des données de l'étude, sans violer la confidentialité et dans les limites autorisées par les lois et réglementations.

Les données recueillies lors de l'étude feront l'objet d'un traitement informatique, en conformité avec les exigences de la CNIL.

8.2. MONITORING DE L'ETUDE

Le monitoring sera assuré par le département promotion de la Direction de la recherche. Un Attaché de Recherche Clinique (ARC) se rendra sur le site afin de procéder au contrôle qualité des données rapportées dans les cahiers d'observations.

L'ARC s'assure que les cahiers contiennent toutes les informations demandées et vérifiera la conformité du cahier d'observation par rapport au protocole et à la réglementation en vigueur.

Le cahier d'observation de chaque patient doit être en adéquation avec les documents sources (= dossier patient). L'accès de l'ARC à ces documents doit être facilité. L'ARC est tenu à la confidentialité quant aux informations auxquelles il accède.

La fréquence des visites dépendra du nombre de patients inclus, du rythme d'inclusions et des difficultés constatées lors de la réalisation de l'étude et sera définie par le responsable de l'étude.

Les visites de monitoring sur site seront organisées après rendez-vous avec l'investigateur. Les ARC devront pouvoir consulter :

- les cahiers de recueil de données des patients inclus,
- les dossiers médicaux et infirmiers des patients,
- le classeur investigateur.

Le protocole a été classé selon le niveau de risque estimé pour le patient se prêtant à la recherche. Il sera suivi de la manière suivante :

Risque A : risque prévisible faible ou négligeable.

8.3. INSPECTION / AUDIT

Dans le cadre de la présente étude, une inspection ou un audit pourra avoir lieu.

Une inspection est un contrôle officiel assuré par les autorités de Tutelles dans le but d'évaluer la recevabilité des données cliniques, de vérifier le respect de la législation et l'absence de fraude.

Les inspecteurs vérifient les documents, les moyens logistiques, les enregistrements et toute autre ressource que les autorités considèrent comme associée à l'étude et qui peuvent se trouver sur les lieux même de l'étude, chez le et/ou dans les locaux de l'organisme prestataire de service (CRO) ou dans d'autres établissements jugés pertinents.

Un audit est un contrôle qualité. Il peut être conduit par des représentants du responsable de l'étude ou une société dûment mandatée par le responsable de l'étude.

8.4. CONSIDERATIONS ETHIQUES

8.4.1. Information et recueil de non opposition

L'investigateur s'engage à informer le patient de façon claire et juste du protocole et à recueillir son accord préalable à la participation à la recherche. L'information orale délivrée par l'investigateur sera complétée par une lettre d'information remise au patient (annexe 3). La participation du patient sera validée sous forme de non opposition tracée dans le dossier médical.

8.4.2. Consentement éclairé écrit (cf. annexe 4)

La participation à la recherche implique la participation à la collection d'échantillons biologiques. L'investigateur s'engage à informer le patient de façon claire et juste des modalités de participation à la collection et à lui demander un consentement éclairé et écrit pour la conservation à long terme des échantillons (note d'information et formulaire de recueil de consentement). Il remettra au patient un exemplaire de la note d'information et un formulaire de recueil de consentement à la bio-collection. Le patient ne pourra être inclus dans la bio-collection qu'après avoir pris connaissance de la note d'information et avoir signé et daté le formulaire de recueil de consentement. L'investigateur doit également signer et dater le formulaire de recueil de consentement. Le formulaire de consentement sera signé en 2 exemplaires minimum afin que le patient et l'investigateur puissent chacun en garder un original. L'original de l'investigateur sera classé dans une armoire de recherche clinique. La participation du patient à la collection sera tracée dans son dossier médical simultanément à la notification de sa participation à l'étude Prévall DP.

8.4.2. Comité de Protection des Personnes

L'établissement responsable de la recherche s'engage à soumettre le projet d'étude à l'avis préalable du Comité de Protection des Personnes (CPP) Ouest V. Les informations communiquées portent d'une part sur les modalités et la nature de la recherche et d'autre part, sur les garanties prévues pour les patients participant à cette étude. Le protocole a reçu l'avis favorable du CPP Ouest V le 24/02/2015.

8.5. AMENDEMENTS AU PROTOCOLE

Les demandes de modifications substantielles seront adressées par le responsable de la recherche pour avis au comité de protection des personnes concerné.

Le protocole modifié devra faire l'objet d'une version actualisée datée.

Les formulaires d'information et de recueil de consentement du patient devront faire l'objet de modifications si nécessaire.

8.6. REGLES RELATIVES A LA PUBLICATION

Une copie de la publication sera remise au CHU de Nantes, responsable 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.

8.7. DEVENIR DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES

Les échantillons biologiques humains recueillis au cours de la recherche seront rattachés au programme de recherche « Thorax, Pathologies cardiaques, vasculaires, respiratoires, leurs facteurs de risque et leurs traitements » déclaré au ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche sous la référence DC-2011-1399.

Le programme de recherche et les modalités d'inclusion dans la collection ont reçu l'avis favorable du CCP ouest IV le 08.11.2011. Les échantillons biologiques seront stockés à l'institut du thorax (Equipe 6 : Pathologie Bronchiques et allergies, IRS-UN, 8 quai Moncousu, 44007 NANTES).

Au terme de l'étude, les échantillons seront conservés à l'institut du thorax et intégrés au programme de recherche «Génétique et biomarqueurs des pathologies cardiovasculaires, respiratoires et leurs facteurs de risque» déclaré par le CHU de Nantes et pourront être réutilisés pour de nouveaux projets de recherche.

9. BUDGET DE L'ETUDE

Projet Monocentrique avec 90 inclusions (90 patients répartis dans 3 groupes) prévues sur 24 mois

❖ Dépenses de personnel

Chef de projet : 1 jour d'aide au montage du projet, 4 jours de démarches réglementaires, 1 jour de suivi par an et un jour d'archivage soit 8 jours au total : **2400 euros**

ARC de Monitoring : ½ journée de formation, ½ journée de mise en place, 1 journée de monitoring, 1 journée de Clôture, soit 3 jours : **885.5 euros**

CEC : Expertise projet, aide à la rédaction, coordination du projet soit **4 333€**

TEC-CIC : Temps pour la saisie des CRF (30 min par patient) soit **1979€**

Ingénieur Biologiste : Technicage des échantillons (1h par patient) soit **4500€**

Data-management : **873.33 euros** (sur devis)

Biostatistiques : **2257.5 euros** (sur devis)

❖ Dépenses à caractère médical

Dépenses lié aux actes médicaux :

- Forfait Prélèvement par IDE de la PFTA
- Prick-test (tests cutanés)
- phadiatop® (

Dépenses pour le materiel medical:

- tubes sec (4,5ml) (pour le phadiatop®)
- tubes EDTA 9ml (3 par patient)
- Anticorps (anti CD3, CD4, CD8a, CTLA-4, GITR, CD25, LAG3)
- Tube Sepmate pour Ficoll
- Divers réactifs de culture (VPD, BSA, Ficoll, SVF)
- Matériel Plastique (cryotubes, boîtes, pipettes, tubes)
- Kit de tri des monocytes
- Kit de tri des CD4
- Colonnes de tri
- Forfait Plateforme de cytométrie IFR 30h

Soit **un total de 11 819 euros**

❖ Dépenses hôtelières et générales

Impression : **574.4 euros** (devis)

Frais de publication : **1500 euros**

Transports biologie : transports de 30 prélèvements entre la société Biofortis et l'unité Inserm en charge des analyses soit **2013,60 euros**

BIOFORTIS participe au projet à titre gracieux, aucune contrepartie financière ne sera versée. En contrepartie du travail réalisé, le laboratoire BIOFORTIS® apparaîtra dans les publications issues du projet et partagera partiellement les résultats et la propriété intellectuelle.

Coût global de l'étude 33 135 euros.

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Références Bibliographiques

Annexe 2 : Liste des investigateurs

Annexe 3 : Notice d'information pour les patients allergiques

Annexe 4 : Formulaire de consentement pour participer à la biocollection du CHU de Nantes

Annexe 5 : Formulaire de consentement pour participer à la biocollection BIOFORTIS (pour information)

Annexe 6 : Diagnostic, classification et sévérité de l'asthme allergique

Annexe 7 : Diagnostic, classification et sévérité de la rhinite allergique

Annexe 8 : Diagnostic, classification et sévérité de la dermatite atopique

Annexe 9 : CRF des sujets atteints d'asthme allergique

Annexe 10 : CRF des sujets atteints de rhinite allergique

Annexe 11 : CRF des sujets atteints de dermatite atopique

Annexe n°1 : Références bibliographiques

1. Daniel Vervloet, Antoine Magnan, *Traité d'Allergologie*, 2003 Médecine-Sciences Flammarion. ISBN : 2-257-10525-7
2. O'Shea et al, *Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells*, Science 2010 ; 1098-1102.
3. Zhu J et al, *Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors*, Immunological Reviews 2010, Vol. 238: 247–262
4. Hill DA et al, *Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis*, Mucosal immunology 2010; volume 3 : 148-158.
5. Atarashi K et al, *Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species*, Science 2011 ; vol 331 : 337-341.
6. Sarraeyrouse G et al, *CD4CD8aa Lymphocytes, A Novel Human Regulatory T Cell Subset Induced by Colonic Bacteria and Deficient in Patients with Inflammatory Bowel Disease*, PLOS Biology 2014, vol12 : e1001833.
7. Atarashi et al, *Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota*, Nature 2013, vol 500 : 232-238.
8. West C, *Gut microbiota and allergic disease: new findings*, Curr Opin Clin Nutr Metab Care 2014, 17:000–000
9. Huffnagle GB, *The Microbiota and Allergies/Asthma*, PLoSPathog 6(5): e1000549
10. Bisgaard H et al, *Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age*, J Allergy Clin Immunol 2011;128:646-52
11. Abrahamsson TR et al, *Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age*, Clin Exp Allergy. 2014 Jun;44(6):842-50. doi: 10.1111/cea.12253.
12. Hill DA et al, *Commensal bacteria-derived signals regulate basophil hematopoiesis and allergic inflammation*, Nature Médecine 2012, Vol 18 : 538-547
13. Herbst T et al, *Dysregulation of Allergic Airway Inflammation in the Absence of Microbial Colonization*, Am J of resps and crit care med 2011, vol 184 : 198-205
14. Penders J et al, *Establishment of the intestinal microbiota and its role for atopic dermatitis in early childhood*, J Allergy Clin Immunol 2013, 601-607
15. Abrahamsson TR et al, *Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema*, J Allergy Clin Immunol, Vol 129 : 434-440

16. Mah KW et al, *Distinct Pattern of Commensal Gut Microbiota in Toddlers with Eczema*, Int Arch Allergy Immunol 2006;140:157–163
17. NIH HMP Working Group et al, *The NIH Human Microbiome Project*, Genome Res, 2009 Oct 9;19(12):2317-23
18. Noverr MC et al, *Role of Antibiotics and Fungal Microbiota in Driving Pulmonary Allergic Responses*, Infection and Immunity 2004, vol 72 : 4996–5003.
19. Noverr MC et al, *Development of Allergic Airway Disease in Mice following Antibiotic Therapy and Fungal Microbiota Increase: Role of Host Genetics, Antigen, and Interleukin-13*, Infection and Immunity, vol 73 : 30-38.
20. Matricardi PM et al, *The use of Phadiatop in mass-screening programmes of inhalant allergies: advantages and limitations*, Clin Exp Allergy 1990 ; vol 20 : 151-155.
21. *Pocket Guide for Asthma Management and Prevention in Adult and Child over 5 years*, GINA, update revised on 2014.
22. Bousquet and al, *Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) : Achievements in 10 years and future needs*, J Allergy Clin Immunol, nov 2012, 1049-1056.
23. Leung D, Bieber T, *Atopic dermatitis*, Lancet, Jan 2003, 151-160.
24. Juniper EF, O’Byrne PM, Guyatt GH, Ferrie PJ, King DR. Development and validation of a questionnaire to measure asthma control. Eur Respir J 1999; 14: 902-7
25. Juniper EF, Bousquet J, Abetz L, Bateman ED. Identifying ‘well-controlled’ and ‘not well-controlled’ asthma using the Asthma Control Questionnaire. Respir Med 2006; 100: 616- 621.

Annexe 2 : Liste des investigateurs

Nom et prénom	Spécialité	Fonction	Nom de l'établissement	Service de rattachement	Coordonnées	N° RPPS
Dr BERNIER Claire	Dermatologie et Allergologie Praticien Hospitalier	Investigateur – coordonnateur	CHU de Nantes	Plateforme transversale d'allergologie, CHU Hôtel Dieu 1 place Alexis Ricordeau 44000 Nantes	Tel : 00 33 (0)2 40 Fax : 00 33 (0)2 40 48 21 81 mail : claire.bernier@chu- nantes.fr	1000258690 6
Dr PIPET Anaïs	Pneumologie et Allergologie Praticien Hospitalier	Co- Investigateur	CHU de Nantes	Plateforme transversale d'allergologie, CHU Hôtel Dieu 1 place Alexis Ricordeau 44000 Nantes	Tel : 00 33 (0)2 40 16 51 76 Fax : 00 33 (0)2 40 48 21 81 mail : anais.pipet@chu- nantes.fr	
JOTEREAU Francine	Immunologie fondamentale	Chercheur associé	INSERM	CRCNA-UMR 892 INSERM 8 quai Moncousu BP70721 44007 Nantes Cedex 1	Tel : 00 33 (0)2 28 08 02 44 Fax : 00 33 (0)2 28 08 02 04 mail : jotereau@nantes.inser- m.fr	1000403568 8
COLAS Luc	Médecine générale, allergologie et immunologie clinique	Interne	CHU de Nantes	Plateforme transversale d'allergologie, CHU Hôtel Dieu 1 place Alexis Ricordeau 44000 Nantes	Tel : 00 33 (0)2 40 Fax : 00 33 (0)2 40 48 21 81 Mail : colas.luc@gmail.com	
GUYOMARC'H Béatrice		Data Manager Biostaticienne	CHU de Nantes	CIC 4 - Equipe Thorax L'institut du thorax Hôpital Laënnec Boulevard Jacques Monod 44093 Nantes Cedex 01	Tel : 00 33 (0)2 40 16 58 59 Fax : 00 33 (0)2 40 16 57 29 mail : beatrice.guyomarch@ chu-nantes.fr	NA
FOUREAU Aurore		Coordinatrice d'Essai Clinique	CHU de Nantes	CIC 4 - Equipe Thorax L'institut du thorax Hôpital Laënnec Boulevard Jacques Monod 44093 Nantes Cedex 01	Tel : 00 33 (0)2 40 16 55 33 Fax : 00 33 (0)2 40 16 57 29 mail: aurore.foureau@chu- nantes.fr	NA
LEBEAUPIN Maxime		Chef de Projet	CHU de Nantes	Direction de la recherche Département promotion 5 allée de l'Ile Gloriette 44093 Nantes cedex 1	Tel : 00 33 (0) 2 53 48 28 18 Mail : maxime.lebeaupin@c hu-nantes.fr	NA

Annexe n°3 : Notice d'information patients allergiques



Note d'information pour la participation à la recherche

«Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8αα (DP8α) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique»

Titre abrégé : « Prévall-DP »

Responsable de la Recherche : CHU de Nantes

N° Enregistrement : n°2014-A01759-38

Médecin investigateur Nom : Service : Adresse : Téléphone :	Responsable de la recherche Nom : CHU de Nantes Adresse : 5, allée de l'île Gloriette, 44 093 NANTES Contact: Secrétariat du Département Promotion Téléphone : 02 53 48 28 35 (secrétariat) Mail : rderecherche@chu-nantes.fr
--	---

Ce document est remis au patient.

Un exemplaire est conservé par le patient et un exemplaire est conservé par le médecin dans un endroit prévu à cet effet (hors du dossier médical).

La participation du patient est tracée dans son dossier.

Madame, Monsieur,

Dans le cadre de votre prise en charge, nous vous proposons de participer à une recherche de soins courants nommée « Prévall-DP ». Cette recherche a pour but de mettre en évidence que certains globules blancs spécifiques (lymphocytes T présentant des signaux de surface spécifiques - CD4/CD8αα) sont diminués dans le sang de patients porteurs de pathologies allergiques (asthme allergique, rhinite allergique et dermatite atopique) par rapport à des personnes non allergiques

Le CHU de Nantes est le responsable de cette recherche, c'est à dire qu'il en est responsable et qu'il l'organise.

1. COMMENT VOUS DECIDER ?

Si vous acceptez de participer à cette recherche, le médecin de l'étude confirmera votre accord en attestant du recueil de votre non-opposition. Même après avoir donné votre accord de participation, vous garderez le droit d'interrompre à tout moment votre participation sans avoir à vous justifier et sans préjudice pour votre prise en charge.

2. QUEL EST LE BUT DE CETTE RECHERCHE ? QUEL EST SON DEROULEMENT GENERAL ?

La plateforme transversale d'allergologie du Centre Hospitalier et Universitaire de Nantes conduit une recherche dont l'objectif est de mettre en évidence que certains globules blancs spécifiques (lymphocytes T présentant des signaux de surface spécifiques - CD4/CD8αα) sont diminués dans le sang de patients porteurs de pathologies allergiques (asthme allergique, rhinite allergique et dermatite atopique) par rapport à des personnes non allergiques.

Ces globules blancs spécifiques présentent une fonction de régulation des pathologies allergiques citées ci-dessus. Cette fonction est acquise suite au contact avec une bactérie résidente de l'intestin (*Faecalibacterium prausnitzii*).

La mise en évidence d'une diminution de ces globules blancs spécifiques et de leur fonction de régulation dans les pathologies allergiques principales apporterait la première preuve physiopathologique d'un phénomène qui est maintenant connu depuis une dizaine d'année : la relation entre l'altération de certaines espèces bactériennes de l'intestin et la présence de pathologies allergiques (asthme, rhinite et dermatite atopique). A terme cela permettra de mieux comprendre les mécanismes de ces maladies allergiques. De plus, cela pourrait aboutir à la création d'un marqueur biologique (dosage sur une prise de sang) qui permettrait d'évaluer la réponse aux différents traitements de ces maladies allergiques. Cette recherche est réalisée à partir de données médicales collectées au cours de votre prise en charge et/ou grâce aux réponses que vous apporterez à différents questionnaires. Elle pourra également comprendre les données relatives à vos habitudes de vie.

Si vous choisissez de participer à cette étude, votre participation se limitera à un prélèvement sanguin d'environ 40mL (4 tubes).

Ce prélèvement de sang sera réalisé au CHU de Nantes à la plateforme transversale d'allergologie.

Les éléments de votre dossier médical nécessaire à l'inclusion dans l'étude seront collectés dans un cahier d'observation informatisé. Votre anonymat sera préservé grâce à un numéro d'inclusion basé sur vos initiales, votre âge et le rang d'inclusion dans le protocole. Seul le médecin investigateur de l'étude et votre médecin allergologue pourront avoir accès à ces données.

Il est prévu d'inclure 90 patients dans cette étude répartis en 3 groupes (asthme allergique, rhinite allergique, dermatite atopique). L'inclusion dans l'étude est réalisée au cours de votre consultation programmée avec votre médecin allergologue.

Au terme de votre inclusion dans le protocole, vous serez intégré dans un groupe correspondant à votre pathologie allergique. Votre suivi et la surveillance de votre pathologie n'en sera absolument pas modifiée.

Les échantillons de sang pourront être utilisés pour d'autres recherches ultérieures à l'étude Prévall-DP. C'est pourquoi un formulaire d'information et de recueil de consentement spécifique à cette biocollection vous est présenté en parallèle du présent document.

Cette recherche est réalisée en collaboration avec l'Unité Mixte de Recherche UMR892 de l'Inserm et le laboratoire BIOFORTIS® situé à Saint-Herblain.

Votre participation éventuelle à cette recherche durera une journée.

3. QUELS SONT LES RISQUES ET LES BENEFICES?

La recherche Prévall-DP ne présente aucun risque de plus que la prise en charge normale qui vous serait proposée si vous n'y participiez pas. Votre prise en charge ne sera pas modifiée quelque soit votre décision.

Lors de la prise de sang, les risques liés à la ponction veineuse sont très faibles (hématome, saignement au point de ponction, malaise vagal)

Les résultats qui en seront issus ne permettront pas d'apporter des informations pertinentes pour votre santé en particulier. Ils favoriseront le développement des connaissances dans le domaine de votre pathologie.

4. QUE SE PASSERA-T-IL A LA FIN DE LA RECHERCHE, SI LA RECHERCHE S'ARRETE OU SI VOUS DECIDEZ D'INTERROMPRE VOTRE PARTICIPATION ? QUELS SONT VOS DROITS PENDANT LA RECHERCHE ?

Vous êtes libre d'accepter ou de refuser de participer à la recherche qui vous est présentée. Si vous acceptez, vous êtes libre de changer d'avis à tout moment sans avoir à vous justifier et votre décision ne portera aucun préjudice à la qualité de votre prise en charge. Si vous refusez de participer, les données ne seront pas utilisées pour cette recherche et resteront destinées à l'usage strict du soin.

Pour être menée à bien, cette recherche nécessite la mise en œuvre d'un traitement informatisé de certaines de vos données personnelles afin d'analyser les résultats. Un fichier informatique comportant vos données va donc être constitué. Par mesure de confidentialité et pour respecter votre vie privée, vos données seront systématiquement codées. Seuls les professionnels de santé personnellement en charge de votre suivi et les personnels mandatés par le CHU de Nantes auront connaissance de vos données nominatives. Le personnel impliqué dans la recherche est soumis au secret professionnel, tout comme votre médecin traitant.

Conformément à la loi, vous disposez d'un droit d'accès, d'opposition et de rectification des données enregistrées sur informatique, à tout moment, par l'intermédiaire de votre médecin. Vous disposez également d'un droit d'opposition à la transmission des données couvertes par le secret professionnel susceptibles d'être utilisées et d'être traitées dans le cadre de cette recherche. Vous pouvez exercer vos droits d'accès et de rectification auprès de la Direction de la Recherche du CHU de Nantes dont les coordonnées figurent au début de la lettre.

Cette étude a reçu une autorisation de la Commission Nationale Informatique et Libertés (CNIL). Cette étude est réalisée conformément à la Loi 2004-806 relative à la politique de santé publique (Articles L.1121-1 à 1126-7 du Code de la Santé Publique).

Les modalités de cette étude ont été soumises au Comité de Protection des Personnes (CPP) Ouest V de Rennes qui a pour mission de vérifier si les conditions requises pour votre protection et le respect de vos droits sont respectés. Ce comité a émis un avis favorable le 24/02/2015.

5. AUREZ-VOUS DES FRAIS SUPPLEMENTAIRES ?

Votre participation à cette recherche n'engendrera pour vous aucun frais supplémentaire par rapport à ceux que vous auriez dans la prise en charge habituelle de cette maladie.

6. ACCES AUX RESULTATS GLOBAUX DE LA RECHERCHE

Votre médecin pourra vous informer, sur votre demande, des résultats globaux de cette recherche.

Le médecin qui vous a proposé la recherche et vous a donné oralement toutes les informations nécessaires est à votre disposition pour répondre à toutes vos questions.

Attestation de recueil de non-opposition

Je soussigné(e), Dr/Pr....., atteste avoir obtenu la non-opposition de
M. Mme Melle....., en sa qualité de participant(e) à la recherche,
à la date du/...../..... ,

Je déclare l'avoir informé (e) du déroulement du protocole sus nommé et lui avoir remis la note
d'information.

Fait à Nantes, le

Signature du médecin :

Annexe n°4 : Formulaire de consentement pour la biocollection du CHU de Nantes

	Constitution d'une collection d'échantillons pour un programme de recherche intitulé : « Génétique et biomarqueurs des pathologies cardiovasculaires, respiratoires et leurs facteurs de risques »	Date d'application : 02/04/2014 Page 1 sur 2
---	---	--

Madame, Monsieur,

Votre prise en charge peut nécessiter des prélèvements (prise de sang, biopsies...). Après avoir été utilisés pour votre diagnostic ou traitement, vos échantillons peuvent présenter un intérêt pour la recherche. Il peut s'agir de recherches liées à votre pathologie ou à d'autres domaines médicaux.

Pour ces recherches, il pourra vous être proposé un prélèvement de sang supplémentaire. Ce prélèvement ne sera réalisé que s'il ne comporte que des risques négligeables. Ces recherches pourront également nécessiter le recueil de vos données médicales, y compris vos origines ethniques ou raciales, seulement si celle-ci présente un intérêt justifié pour la recherche.

La recherche nommée en en-tête de ce document et décrite sur la page de consentement pourra comprendre l'examen de vos caractéristiques génétiques. Mais elle n'a pas vocation à modifier ou adapter votre prise en charge, pour vous même ou votre famille. Elle n'a notamment pas pour objectif de poser, confirmer ou infirmer le diagnostic d'une maladie génétique, de rechercher les caractéristiques d'un ou plusieurs gènes susceptibles d'être à l'origine d'une maladie.

De manière générale, les résultats produits par ces recherches ne permettront pas d'apporter des informations pertinentes pour votre santé en particulier. L'objectif des recherches est de favoriser le développement des connaissances en santé. Les résultats des recherches doivent ensuite être confirmés par des études cliniques complémentaires, pour aboutir à de nouvelles méthodes de diagnostic, de nouveaux traitements médicaux ou chirurgicaux.

Si vous le souhaitez, votre médecin pourra vous informer des résultats globaux de cette recherche.

Bien que cela n'en soit pas l'objectif, il peut toutefois arriver que les travaux de recherche mettent en évidence de nouveaux résultats intéressant votre santé. Vous avez la possibilité de préciser, au sein du formulaire joint, votre choix d'être tenu(e) informé(e) ou non de ces résultats.

La réalisation des recherches

Les travaux de recherche pourront être conduits par les équipes du CHU de Nantes seules, ou en collaboration avec des équipes d'autres structures de recherche publique (par exemple l'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale - INSERM). Ces équipes peuvent être privées, industrielles, françaises ou étrangères. Des recherches pourront aussi être conduites par ces organismes en dehors de toute collaboration avec le CHU de Nantes. Pour cela, le CHU de Nantes pourra transférer gratuitement vos échantillons et les données médicales associées.

Toutes les recherches du CHU de Nantes sont réalisées dans des conditions strictes de confidentialité conformes à la réglementation. Toutes les données sont systématiquement codées. Les échanges et le transfert d'échantillons et de données entre équipes de recherche peuvent être nationaux ou internationaux.

L'encadrement des recherches

Toutes ces recherches sont soumises au Comité de Protection des Personnes compétent et font l'objet d'une déclaration/autorisation auprès du Ministère en charge de la recherche. Le traitement automatisé des informations médicales vous concernant a fait l'objet d'un avis du Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé, et/ou d'une autorisation de la Commission Nationale Informatique et Liberté (CNIL).

Votre information et le recueil de votre consentement

La conservation, l'utilisation des échantillons et des données médicales collectés et leur éventuelle cession à des fins scientifiques **nécessitent votre autorisation**, en vertu des lois de « Bioéthique » (29 juillet 1994, 6 août 2004, 7 juillet 2011) et de la loi « Informatique et liberté » du 6 janvier 1978 modifiée.

Vous pouvez poser toutes les questions nécessaires à votre médecin.

Lorsque vous nous aurez fait part de votre décision, vous pourrez changer d'avis à tout moment sans que cela ne modifie votre prise en charge et ses conditions.



Constitution d'une collection d'échantillons pour un programme de recherche intitulé : « Génétique et biomarqueurs des pathologies cardiovasculaires, respiratoires et leurs facteurs de risques »

Date d'application :
02/04/2014
Page 2 sur 2

Le CHU de Nantes réalise un programme de recherche sur la génétique et les biomarqueurs des pathologies cardiovasculaires, respiratoires et leurs facteurs de risque. Son but est de permettre la découverte de marqueurs génétiques ou biologiques associés à la survenue ou à l'évolution des maladies. Cette recherche est réalisée à partir des échantillons disponibles au cours de votre prise en charge, ou grâce à la réalisation d'un prélèvement de sang ne comportant que des risques négligeables. Elle pourra également comprendre l'examen de vos caractéristiques génétiques. En cas d'absence de consentement, vos échantillons seront détruits et aucun prélèvement de sang ne sera réalisé. Cette recherche peut également nécessiter le recueil de données médicales vous concernant, y compris des informations d'origine ethnique ou raciale. Afin de respecter leur confidentialité, ces données seront codées.

Merci de nous indiquer votre décision en **complétant et signant** ce document qui sera joint à votre dossier médical et transmis au service en charge du stockage de vos échantillons biologiques.

Je déclare avoir compris le but et les modalités de cette recherche, qui m'ont été expliqués par le Dr/Pr.....

Je soussigné(e) (la personne prélevée) : ☐ Mlle ☐ Mme ☐ M.

Nom de famille : Nom de jeune fille :

Prénom : A (lieu de naissance) :

né(e) le : []/[]/[] A (lieu de naissance) :

précise :

☐ être majeur et ne bénéficier d'aucune mesure de protection légale (tutelle, curatelle, sauvegarde de justice)

☐ être mineur *

☐ bénéficier d'une mesure de protection légale : ☐ Tutelle, ☐ Curatelle, ☐ Sauvegarde de justice

Le cas échéant, le ou les représentants légaux (pour les mineurs, et personnes protégées par la loi) ; la personne de confiance désignée ou un membre de la famille (pour les situations d'urgence)

☐ Mlle ☐ Mme ☐ M. ☐ Mlle ☐ Mme ☐ M.

Nom de famille : Nom de famille :

Prénom : Prénom :

Nom de jeune fille : Nom de jeune fille :

Né(e) le : []/[]/[] Né(e) le : []/[]/[]

A (lieu de naissance) : A (lieu de naissance) :

Je suis libre de refuser ou d'accepter ma participation à la réalisation de cette recherche et à l'utilisation des données associées. **Ma décision n'aura aucun effet sur ma prise en charge médicale, notamment sur la qualité des soins qui me sont et me seront apportés.**

Merci d'indiquer votre décision en cochant la ou les cases correspondant à votre choix :

☐ **J'accepte ou ☐ je refuse** de faire don de mes échantillons au CHU de Nantes : il s'agit des échantillons disponibles au cours de ma prise en charge ou par prélèvement direct de sang. Les échantillons et les données associées codées me concernant, seront conservés et utilisés par le CHU de Nantes pour la recherche décrite en haut de ce formulaire dans les conditions présentées dans la note d'information jointe.

☐ **J'accepte ou ☐ je refuse** que mes échantillons soient utilisés pour la recherche en dehors du CHU de Nantes : il s'agit de mes échantillons biologiques, ainsi que des données associées codées. J'accepte qu'ils soient laissés à l'usage de tiers en France ou à l'étranger, dans le respect de la réglementation, afin qu'il(s) effectue(nt) la recherche décrite en haut de ce formulaire et dans les conditions présentées par l'équipe médicale ainsi que dans la note d'information jointe.

☐ **Je souhaite ou ☐ je ne souhaite pas** être informé(e) dans le cas où les travaux de recherche mettent en évidence de nouveaux résultats intéressant ma santé.

Ce formulaire et toutes les informations personnelles me concernant resteront strictement confidentiels, sont et resteront couverts par le secret professionnel et médical, ainsi que par le respect dû à ma vie privée. En vertu de la loi « Informatique et Libertés » du 06/01/1978 modifiée (notamment par la loi n° 2004-801 du 6/08/2004) le traitement informatisé de mes données personnelles a été autorisé par la Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL) et je dispose à cet égard d'un droit d'accès, d'opposition, et de rectification des données enregistrées sur informatique à tout moment, par l'intermédiaire de mon médecin.

Date :

Signature du patient :

Signature du médecin :

Signature des représentants légaux* :

*Pour les mineurs : si la mère ou le père signe seul, il s'engage à avoir obtenu l'accord de l'autre parent

Je suis libre de revenir sur ma décision en le signifiant au secrétariat de la direction de la recherche, 5 allée de l'île Gloriette, 44 093 NANTES cedex 01 ; par téléphone : 02 53 48 28 35 ; par fax : 02 53 48 28 36 ; ou par e-mail : rderecherche@chu-nantes.fr
Préciser dans la demande le service et le nom du programme (mentionnés en haut de page)

Acronyme étude : Centre : Code d'inclusion :

Annexe n°5 : Formulaire de consentement pour la biocollection BIOFORTIS

Étude n° PEC13157
Version n°1 du 13/10/2014



DOCUMENT DE CONSENTEMENT POUR LA CONSERVATION ET L'UTILISATION D'ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES HUMAINS

Madame, Monsieur,

Dans le cadre de son activité, la société Biofortis constitue une collection d'échantillons biologiques humains. Cette collection a reçu l'autorisation du ministère de la recherche et l'avis favorable du Comité de Protection des Personnes Ouest IV. Les échantillons de cette collection peuvent être utilisés par Biofortis à des fins de recherches ou cédés à d'autres organismes à des fins de recherche.

En signant ce document, j'accepte de donner des échantillons de sang, selles, salive et flore orale, j'accepte leur conservation et utilisation par Biofortis, ainsi que la conservation et l'utilisation par Biofortis de mes données personnelles associées.

Ces échantillons et données seront identifiés par un numéro de code et mes initiales.

Les données médicales associées aux prélèvements seront réunies sur un fichier informatique permettant leur traitement automatisé dans le cadre des recherches. Conformément à la loi n°2004-801 du 06 août 2004 relative à la protection des personnes physiques à l'égard des traitements des données à caractère personnel, je dispose à cet égard d'un droit d'accès, de rectification et d'opposition auprès du service Data Management de Biofortis.

Je dispose d'un droit d'opposition à la conservation et l'utilisation de ces échantillons, que je peux exprimer dès à présent ou à tout moment par la suite.

En fonction de ma volonté, ce tube sera détruit et/ou mes données médicales ne seront plus utilisées à des fins de recherches scientifiques futures. Néanmoins, l'ensemble de la recherche scientifique réalisée jusqu'à ce moment sur le matériel et/ou les données médicales en question ne pourra pas être détruit. Je comprends bien que mon refus / retrait de consentement n'aura d'effet qu'à partir de la date de notification de ce refus/ retrait.

[Nom] _____ [Prénom] _____

[Nom de jeune fille] _____ né(e) le _____ à _____

A [ville] le [date] |__|_|_|.20|__|_|

Signature du volontaire :

▪ Conformément à la loi (art. 16-1 et 16-6 du code civil), ce prélèvement ne pourra donner lieu à une rémunération à votre bénéfice. Il pourra être utilisé pour des recherches effectuées en partenariat avec un ou plusieurs organismes publics ou privés.

▪ Les informations portées sur ce document sont confidentielles et couvertes par le secret professionnel. A aucun moment, les données personnelles qui y figurent n'apparaîtront lors de la publication des résultats des travaux de recherche.

BIOFORTIS – 3 Route de la chatterie – 44800 Saint Herblain

Document établi en duplicata : un exemplaire est remis au volontaire, l'exemplaire original est conservé par Biofortis

EN-BIO-093 - Révision D

p. 1/1

Annexe 6 : Diagnostic, classification et sévérité de l'asthme allergique

Grille diagnostic pour l'asthme selon GINA 2014 ⁽¹⁾

- 1) Présences de symptômes à type de toux, sensation d'avoir le souffle court, sifflement expiratoire.
- 2) Ces symptômes
 - sont survenus plus d'une fois
 - avec des intensités variables
 - majorés par les infections virales de la sphère ORL (« ca tombe sur les bronches »)
 - majorés ou déclenchés par des aéro-allergènes, l'air froid et/ou humide, l'exercice.
 - se manifeste ou s'aggrave la nuit ou au petit matin
- 3) Examen pulmonaire normal et/ou pouvant révéler des sibilants notamment lors de l'expiration forcées.
- 4) Le soulagement des symptômes avec des bronchodilatateurs
- 5) La présence d'un syndrome obstructif réversible sur des EFRs si le patient en a déjà bénéficié.

Classification de l'asthme allergique

	STADE I intermittent	STADE II persistant léger	STADE III persistant modéré	STADE IV persistant sévère
SYMPTÔMES	• symptômes présents moins d'une fois par semaine • exacerbations brèves • symptômes nocturnes pas plus de 2 fois par mois	• symptômes présents plus d'une fois par semaine mais moins d'1 fois par jour • exacerbations pouvant affecter les activités et le sommeil • symptômes nocturnes plus de 2 fois par mois	• symptômes présents quotidiennement • exacerbations pouvant affecter les activités et le sommeil • symptômes nocturnes présents plus d'une fois par semaine • utilisation quotidienne de β_2 agoniste de courte durée d'action	• symptômes présents quotidiennement • exacerbations fréquentes • symptômes nocturnes fréquents • limitation des activités physiques
SPIROMÉTRIE	• DEP ou VEMS $\geq 80\%$ de la valeur prédite • variabilité du DEP ou VEMS $< 20\%$	• DEP ou VEMS $\geq 80\%$ de la valeur prédite • variabilité du DEP ou VEMS 20-30%	• DEP ou VEMS 60-80% de la valeur prédite • variabilité du DEP ou VEMS $> 30\%$	• DEP ou VEMS $\leq 60\%$ de la valeur prédite • variabilité du DEP ou VEMS $> 30\%$

Critères de contrôle de l'asthme allergique

Tableau 1. Degrés de maîtrise de l'asthme			
Critère	Asthme totalement maîtrisé (Respect de tous les critères)	Asthme partiellement maîtrisé (Présence de n'importe lequel des critères au cours d'une semaine)	Asthme non maîtrisé
Symptômes diurnes	Aucun (≤2 par semaine)	>2 fois par semaine	Au moins 3 critères de l'asthme partiellement maîtrisé présents au cours d'une semaine
Restriction des activités	Non	Oui, quelle qu'elle soit	
Symptômes/réveils nocturnes	Aucun	Oui, quels qu'ils soient	
Besoin de traitement de secours	Non (≤2 fois par semaine)	>2 fois par semaine	
Fonction pulmonaire (DEP ou VEMS)	Normale	<80 % de la valeur théorique ou du meilleur résultat personnel (si connu), n'importe quel jour	1 au cours d'une semaine
Exacerbation	Aucune	≥ 1 par année	

D'après:

ASTHMA CONTROL QUESTIONNAIRE ©

Please answer questions 1–6.

Circle the number of the response that best describes how you have been during the past week

- On average, during the past week, how often were you **woken by your asthma** during the night?
 - Never
 - Hardly ever
 - A few minutes
 - Several times
 - Many times
 - A great many times
 - Unable to sleep because of asthma
- On average, during the past week, how **bad were your asthma symptoms when you woke up in the morning**?
 - No symptoms
 - Very mild symptoms
 - Mild symptoms
 - Moderate symptoms
 - Quite severe symptoms
 - Severe symptoms
 - Very severe symptoms
- In general, during the past week, how **limited were you in your activities** because of your asthma?
 - Not limited at all
 - Very slightly limited
 - Slightly limited
 - Moderately limited
 - Very limited
 - Extremely limited
 - Totally limited
- In general, during the past week, how much **shortness of breath** did you experience because of your asthma?
 - None
 - A very little
 - A little
 - A moderate amount
 - Quite a lot
 - A great deal
 - A very great deal
- In general, during the past week, how much of the time did you **wheeze**?
 - Not at all
 - Hardly any of the time
 - A little of the time
 - A moderate amount of the time
 - A lot of the time
 - Most of the time
 - All the time
- On average, during the past week, how many **puffs of short-acting bronchodilator** (eg. Ventolin) have you used each day?
 - None
 - 1–2 puffs most days
 - 3–4 puffs most days
 - 5–8 puffs most days
 - 9–12 puffs most days
 - 13–16 puffs most days
 - More than 16 puffs most days

To be completed by a member of the clinic staff

- FEV₁ pre-bronchodilator:
 - >95% predicted
 - 95–90%
 - 89–80%
 - 79–70%
 - 69–60%
 - 59–50%
 - <50% predicted
- FEV₁ predicted
- FEV₁ % predicted
- (Record actual values on the dotted lines
and score the FEV₁ % predicted in the next
column)

Annexe 7 : Diagnostic, classification et sévérité de la rhinite allergique

Grille diagnostic pour la rhino-conjonctivite allergique selon l'ARIA⁽²⁾

Définition :

L'ensemble des manifestations fonctionnelles nasales engendrées par une inflammation IgE dépendante dans la muqueuse nasale liée à l'exposition à différents allergènes. Elle nécessite une première phase de sensibilisation après laquelle les symptômes cliniques apparaîtront lors d'une nouvelle exposition avec l'allergène.

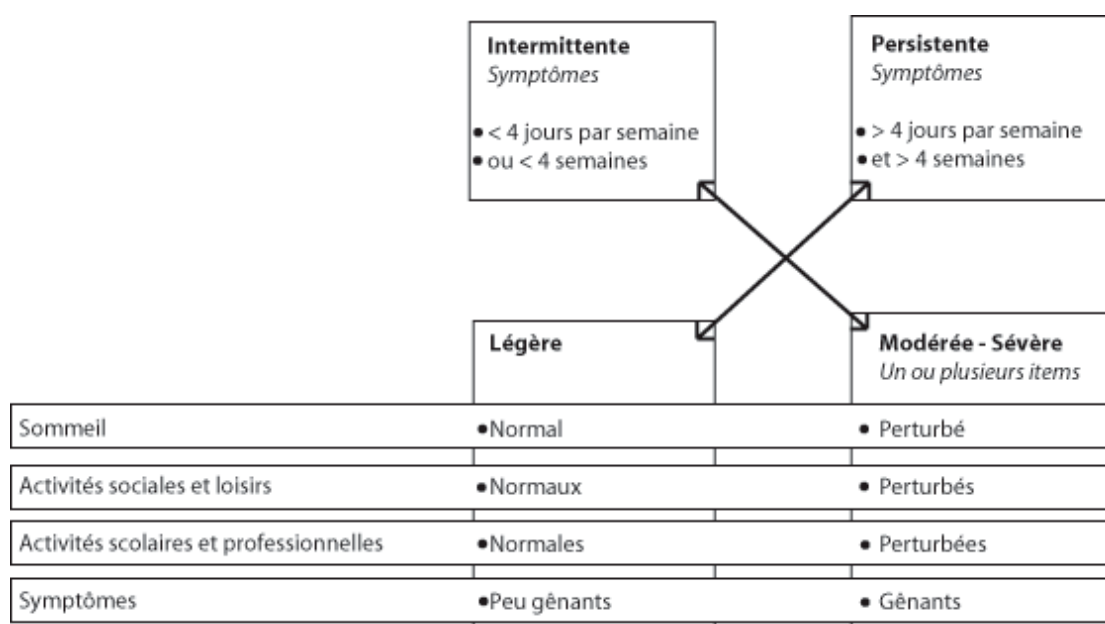
1) Triade clinique :

- obstruction nasale
- prurit nasal et/ou du voile du palais
- rhinorrhée claire

2) Cette triade clinique peut s'associer à une conjonctivite définie par une hyperhémie conjonctivale +/- la présence de papille lymphoïdes.

3) Ces symptômes sont variables dans le temps. Leur apparition coïncident avec l'exposition à l'allergène majeur = UNITE DE TEMPS et DE LIEU

Classification de la rhinite allergique (RA)



Critères de contrôle de la rhinite allergique

Ils seront évalués par le score de contrôle de la rhinite mis au point par le Pr Pascal DEMOLY. Un score de 0 à 20 signifie une rhinite incontrôlée. Un score supérieur de 21 à 25 signifie une rhinite contrôlée.

1°) Au cours des 2 dernières semaines, votre rhinite allergique vous a-t-elle gêné dans vos activités professionnelles/personnelles ?

- 1 = En permanence
- 2 = Très fréquemment
- 3 = Fréquemment
- 4 = Peu fréquemment
- 5 = Jamais

2°) Au cours des 2 dernières semaines, votre rhinite allergique a-t-elle influencé votre humeur ?

- 1 = En permanence
- 2 = Très fréquemment
- 3 = Fréquemment
- 4 = Peu fréquemment
- 5 = Jamais

3°) Au cours des 2 dernières semaines, votre rhinite allergique a-t-elle perturbé votre sommeil (endormissement, réveil la nuit) ?

- 1 = En permanence
- 2 = Très fréquemment
- 3 = Fréquemment
- 4 = Peu fréquemment
- 5 = Jamais

4°) Au cours des 2 dernières semaines, avez-vous eu besoin d'utiliser un traitement supplémentaire non prescrit par votre médecin pour soigner votre rhinite allergique ?

- 1 = 4 jours ou plus par semaine
- 2 = 2 à 3 jours ou plus par semaine
- 3 = 1 jour par semaine
- 4 = 1 à 2 fois en tout
- 5 = Jamais

5°) Au cours des 2 dernières semaines, comment évaluez-vous votre rhinite allergique ?

- 1 = Pas du tout contrôlée
- 2 = Très peu contrôlée
- 3 = Un peu contrôlée
- 4 = Bien contrôlée
- 5 = Complètement contrôlée

SCORE = somme des points à chaque item

Annexe 8 : Diagnostic, classification et sévérité de la dermatite atopique

Grille diagnostic de la dermatite atopique ⁽³⁾

1) Manifestation les plus communes :

- Prurit
- localisation sur les parties convexes (face extenseur) des articulations +/- atteinte faciale chez l'enfant
- localisation au niveau des plis de flexion chez l'adulte sans atteinte faciale
- dermatose chronique (lichénification) avec rechute.

2) Association fréquente :

- xérose cutanée
- âge de début précoce
- Prick test positif pour un ou plusieurs allergènes
- antécédents familiaux
- susceptibilité aux infections cutanée (Syndrome de Kaposi-Juliusberg)
- atteinte palmo-plantaire

3) Autres formes plus rare :

- eczéma mamelonné
- pityriasis alba
- érythrodermie
- signe de Dennie-Morgan (double repli palpébral de la paupière inférieure)

Score SCORAD

SCORAD

SCORAD INDEX

EUROPEAN TASK FORCE

ON ATOPIC DERMATITIS

Last Name

First Name

Date of Birth

Date of Visit

4.5 (8-5)

4.5

18

9

9

4.5 (8-5)

4.5

18

9

9

Figures in parenthesis

for children under two years

A: EXTENT Please indicate the area involved

B: INTENSITY

C: SUBJECTIVE SYMPTOMS
PRURITUS + SLEEP LOSS

A/5 + 7B/2 + C

CRITERIA	INTENSITY
Erythema	
Oedema/Papulation	
Oozing/crust	
Excoriation	
Lichenification	
Dryness*	

* Dryness is evaluated on uninvolved areas

MEANS OF CALCULATION

INTENSITY ITEMS
(average representative area)

0 = absence
1 = mild
2 = moderate
3 = severe

Visual analog scale
(average for the last 3 days or nights)

PRURITUS (0 to 10)

0

10

SLEEP LOSS (0 to 10)

The SCORAD index (derived from the report of European Task Force on Atopic Dermatitis).

Version du 23/03/2015

Page 49 sur 71

Annexe 9 : CRF patient avec un asthme allergique

Cahier d'observation

Etude Prévall DP
N° Enregistrement :

Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique.

Initiales des patients :

- Nom :

- Prénom :

Date de naissance (format mois/ année) :

N° inclusion du patient :

Investigateur :

Investigateur Coordonnateur

Dr Bernier Claire
Plateforme Transversale d'Allergologie
CHU Hôtel Dieu
1 place Ricordeau
44 000 NANTES
Tel : 00 33(0)2 40 08 31 41
Fax : 00 33 (0)2 40 48 21 81
E-mail : claire.bernier@chu-nantes.fr

Promoteur

CHU de Nantes
Cellule de promotion à 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

Protocole Prévall DP

Visite d'inclusion des patients présentant un asthme allergique

Date de signature du consentement :

Date du prélèvement sanguin :

Données démographiques

Âge :

Sexe :

Poids :

Taille :

BMI = poids/(taille)² =

Critères d'inclusion

Une réponse **NON** à l'une des questions suivantes ne permet pas l'inclusion

	Oui	Non
Patients âgés de 18 à 70 ans		
Le patient est non fumeur		
Le patient présente un BMI inférieur à 30 kg/m ²		
Le patient présente un asthme allergique diagnostiqué selon les critères GINA (cf grille diagnostic)		
Le patient présente un asthme classé persistant léger à persistant sévère selon les critères GINA (cf classification AA)		
Le patient présente un asthme partiellement contrôlé ou non contrôlé selon l'ACQ (ACQ>1) avec ou sans traitement.		
Le patient doit présenter une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif selon les normes du laboratoire		
Le patient ne présente pas de contre-indication à la réalisation de prick test.		
Le patient a donné son accord pour participer à l'étude et à la biocollection		
Le patient est affilié à un régime de sécurité sociale		

Protocole Prévall DP

	Oui	Non
Le patient est incapable majeur ou majeur protégé		
Le patient prend un traitement antimicrobien (antibiotique, antifongique ou antiviral) au long cours pour quelque raison que ce soit		
Le patient a bénéficié ou bénéficie d'une immunothérapie spécifique		
Le patient a été en contact avec une bactérie multi-résistante		
Antécédent de cancer du système hématopoïétique (mastocytose incluse)		
Antécédent de déficit immunitaire acquis par le virus HIV.		
Le patient présente un déficit immunitaire congénital		
Le patient présente une maladie inflammatoire du tube digestif		
Le patient présente une maladie auto-immune et/ou inflammatoire qu'elle soit traitée ou non		
Le patient a bénéficié d'une transplantation d'organes solides ou d'une greffe de cellules hématopoïétiques		
Le patient est toxicomane		
Le patient est une femme enceinte ou en âge de procréer sans contraception efficace		
Le patient présente une défaillance d'organe sévère aiguë ou chronique (insuffisance cardiaque, insuffisance respiratoire, insuffisance hépatique, insuffisance rénale, malabsorption).		
Le patient parle difficilement français et/ou comprend difficilement le français		
Le patient est dans l'incapacité de suivre le protocole		
Le patient refuse la réalisation des prick-test		

Critère de non inclusion

Protocole Prévall DP

Traitement en cours :

Nom du produit	Posologie	Galénique / voie	Indication	Début de la prise

INCLUSION

OUI

NON

Protocole Prévall DP

Données cliniques

Sévérité de l'asthme selon l'ACQ²⁴⁻²⁵ =

Présence d'une maladie allergique concomitante :

Si oui, laquelle ? :

Données de l'analyse

Pourcentage de DP8 en fonction des CD3+ :

Pourcentage de DP8 en fonction des CD4+ :

Pourcentage de DP8 en fonction du nombre total d'éléments figurés du sang :

Compte absolu des DP8 sur sang total :

Pourcentage de DP8 spécifiques de *F prausnitzii* ayant proliféré :

Pourcentage de DP8 spécifiques d'extrait total d'acarien (*Dermatophagoïdes pteronyssinus*) ayant proliféré :

Présence d'un phénotype régulateur des DP8 après prolifération avec *F prausnitzii* :

Présence d'un phénotype régulateur des DP8 après prolifération avec l'extrait total d'acarien :

Protocole Prévall DP

Grille diagnostic pour l'asthme selon GINA 2014 ⁽²¹⁾

- 1) Présences de symptômes à type de toux, sensation d'avoir le souffle court, sifflement expiratoire.
- 2) Ces symptômes
 - sont survenus plus d'une fois
 - avec des intensités variables
 - majorés par les infections virales de la sphère ORL (« ca tombe sur les bronches »)
 - majorés ou déclenchés par des aéro-allergènes, l'air froid et/ou humide, l'exercice.
 - se manifeste ou s'aggrave la nuit ou au petit matin
- 3) Examen pulmonaire normal et/ou pouvant révéler des sibilants notamment lors de l'expiration forcées.
- 4) Le soulagement des symptômes avec des bronchodilatateurs
- 5) La présence d'un syndrome obstructif réversible sur des EFRs si le patient en a déjà bénéficié.

Protocole Prévall DP

Classification de l'asthme allergique

	STADE I intermittent	STADE II persistant léger	STADE III persistant modéré	STADE IV persistant sévère
SYMPTÔMES	• symptômes présents moins d'une fois par semaine • exacerbations brèves • symptômes nocturnes pas plus de 2 fois par mois	• symptômes présents plus d'une fois par semaine mais moins d'1 fois par jour • exacerbations pouvant affecter les activités et le sommeil • symptômes nocturnes plus de 2 fois par mois	• symptômes présents quotidiennement • exacerbations pouvant affecter les activités et le sommeil • symptômes nocturnes présents plus d'une fois par semaine • utilisation quotidienne de β_2 agoniste de courte durée d'action	• symptômes présents quotidiennement • exacerbations fréquentes • symptômes nocturnes fréquents • limitation des activités physiques
SPIROMÉTRIE	• DEP ou VEMS $\geq 80\%$ de la valeur prédite • variabilité du DEP ou VEMS $< 20\%$	• DEP ou VEMS $\geq 80\%$ de la valeur prédite • variabilité du DEP ou VEMS 20-30%	• DEP ou VEMS 60-80% de la valeur prédite • variabilité du DEP ou VEMS $> 30\%$	• DEP ou VEMS $\leq 60\%$ de la valeur prédite • variabilité du DEP ou VEMS $> 30\%$

Protocole Prévall DP

Critères de contrôle de l'asthme allergique

ASTHMA CONTROL QUESTIONNAIRE ©

Please answer questions 1–6.

Circle the number of the response that best describes how you have been during the past week

- | | |
|--|--|
| 1. On average, during the past week, how often were you woken by your asthma during the night? | 0 Never
1 Hardly ever
2 A few minutes
3 Several times
4 Many times
5 A great many times
6 Unable to sleep because of asthma |
| 2. On average, during the past week, how bad were your asthma symptoms when you woke up in the morning? | 0 No symptoms
1 Very mild symptoms
2 Mild symptoms
3 Moderate symptoms
4 Quite severe symptoms
5 Severe symptoms
6 Very severe symptoms |
| 3. In general, during the past week, how limited were you in your activities because of your asthma? | 0 Not limited at all
1 Very slightly limited
2 Slightly limited
3 Moderately limited
4 Very limited
5 Extremely limited
6 Totally limited |
| 4. In general, during the past week, how much shortness of breath did you experience because of your asthma? | 0 None
1 A very little
2 A little
3 A moderate amount
4 Quite a lot
5 A great deal
6 A very great deal |
| 5. In general, during the past week, how much of the time did you wheeze ? | 0 Not at all
1 Hardly any of the time
2 A little of the time
3 A moderate amount of the time
4 A lot of the time
5 Most of the time
6 All the time |
| 6. On average, during the past week, how many puffs of short-acting bronchodilator (eg. Ventolin) have you used each day? | 0 None
1 1–2 puffs most days
2 3–4 puffs most days
3 5–8 puffs most days
4 9–12 puffs most days
5 13–16 puffs most days
6 More than 16 puffs most days |

To be completed by a member of the clinic staff

- | | |
|--|------------------|
| 7. FEV ₁ pre-bronchodilator: | 0 >95% predicted |
| FEV ₁ predicted | 1 95–90% |
| FEV ₁ % predicted | 2 89–80% |
| (Record actual values on the dotted lines | 3 79–70% |
| and score the FEV ₁ % predicted in the next | 4 69–60% |
| column) | 5 59–50% |
| | 6 <50% predicted |

Protocole Prévall DP

Annexe 10 : CRF patient avec une rhinite allergique Cahier d'observation

Etude Prévall DP N° Enregistrement :

Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique.

Initiales des patients :

- Nom :
- Prénom :

Date de naissance (format mois/année) :

N° inclusion du patient :

Investigateur :

Investigateur Coordonnateur

Dr Bernier Claire
Plateforme Transversale d'Allergologie
CHU Hôtel Dieu
1 place Ricordeau
44 000 NANTES
Tel : 00 33(0)2 40 08 31 41
Fax : 00 33 (0)2 40 48 21 81
E-mail : claire.bernier@chu-nantes.fr

Promoteur

CHU de Nantes
Cellule de promotion à 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

Protocole Prévall DP

Visite d'inclusion des patients présentant une rhinite allergique

Date de signature du consentement :

Date du prélèvement sanguin :

Données démographiques

Âge :

Sexe :

Poids :

Taille :

BMI = poids/(taille)² =

Critères d'inclusion

Une réponse **NON** à l'une des question suivante ne permet pas l'inclusion

	Oui	Non
Patients âgés de 18 à 70 ans		
Le patient est non fumeur		
Le patient présente un BMI inférieur à 30 kg/m ²		
Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique dûment diagnostiquée selon les critères ARIA (cf grille diagnostic)		
Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique classée persistante légère ou persistante modérée à sévère selon les critères ARIA (cf classification RA)		
Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique non contrôlée selon les critères ARIA avec ou sans traitement. (cf critères de contrôle RA)		
Le patient présente une rhinite et/ou une conjonctivite imputable à la présence d'acariens		
Le patient présente une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif selon les normes du laboratoire		
Le patient ne présente pas de contre-indication à la réalisation de prick test.		
Le patient a donné son accord pour participer à l'étude et à la biocollection		
Le patient est affilié à un régime de sécurité sociale		

Protocole Prévall DP

	Oui	Non
Le patient est incapable majeur ou majeur protégé		
Le patient prend un traitement antimicrobien (antibiotique, antifongique ou antiviral) au long cours pour quelque raison que ce soit		
Le patient a bénéficié ou bénéficie d'une immunothérapie spécifique		
Le patient a été en contact avec une bactérie multi-résistante		
Antécédent de cancer du système hématopoïétique (mastocytose incluse)		
Antécédent de déficit immunitaire acquis par le virus HIV.		
Le patient présente un déficit immunitaire congénital		
Le patient présente une maladie inflammatoire du tube digestif		
Le patient présente une maladie auto-immune et/ou inflammatoire qu'elle soit traitée ou non		
Le patient a bénéficié d'une transplantation d'organes solides ou d'une greffe de cellules hématopoïétiques		
Le patient est toxicomane		
Le patient est une femme enceinte ou en âge de procréer sans contraception efficace		
Le patient présente une défaillance d'organe sévère aiguë ou chronique (insuffisance cardiaque, insuffisance respiratoire, insuffisance hépatique, insuffisance rénale, malabsorption).		
Le patient parle difficilement français et/ou comprend difficilement le français		
Le patient est dans l'incapacité de suivre le protocole		
Le patient refuse la réalisation des prick-test		

Critères de non inclusion

Une réponse **OUI** à l'une des question ne permet pas l'inclusion

Protocole Prévall DP

Traitement en cours :

Nom du produit	Posologie	Galénique / voie	Indication	Début de la prise

INCLUSION

OUI

NON

Protocole Prévall DP

Données cliniques

Sévérité de la rhinite allergique selon ARIA =

Présence d'une autre pathologie allergique concomittante :

Si oui, laquelle ? :

Données de l'analyse

Pourcentage de DP8 en fonction des CD3+ :

Pourcentage de DP8 en fonction des CD4+ :

Pourcentage de DP8 en fonction du nombre total d'élément figurés du sang :

Compte absolu des DP8 sur sang total :

Pourcentage de DP8 spécifiques de *F prausnitzii* ayant proliféré :

Pourcentage de DP8 spécifiques d'extrait total d'acarien (*Dermatophagoïdes pteronyssinus*) ayant proliféré :

Présence d'un phénotype régulateur des DP8 après prolifération avec *F prausnitzii* :

Présence d'un phénotype régulateur des DP8 après prolifération avec l'extrait total d'acarien :

Protocole Prévall DP

Grille diagnostic pour la rhino-conjonctivite allergique selon l'ARIA⁽²⁾

Définition :

L'ensemble des manifestations fonctionnelles nasales engendrées par une inflammation IgE dépendante dans la muqueuse nasale liée à l'exposition à différents allergènes. Elle nécessite une première phase de sensibilisation après laquelle les symptômes cliniques apparaîtront lors d'une nouvelle exposition avec l'allergène.

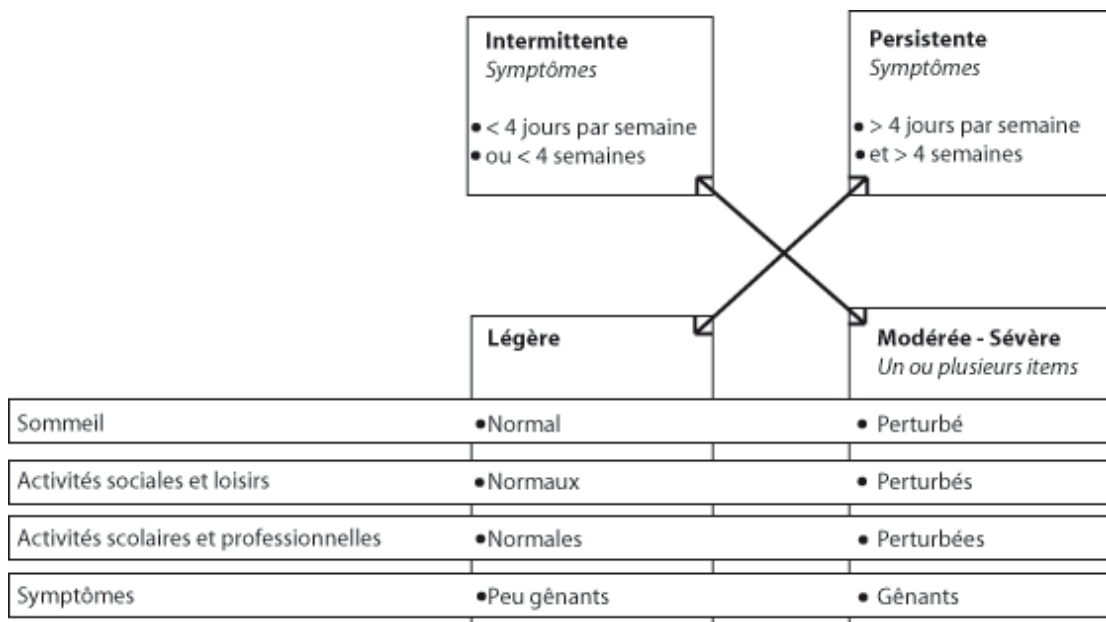
1) Triade clinique :

- obstruction nasale
- prurit nasal et/ou du voile du palais
- rhinorrhée claire

2) Cette triade clinique peut s'associer à une conjonctivite définie par une hyperhémie conjonctivale +/- la présence de papille lymphoïdes.

3) Ces symptômes sont variables dans le temps. Leurs apparitions coïncident avec l'exposition à l'allergène majeur = UNITE DE TEMPS et DE LIEU

Classification de la rhinite allergique (RA)



Critères de contrôle de la rhinite allergique

Ils seront évalués par le score de contrôle de la rhinite mis au point par le Pr Pascal DEMOLY. Un score de 0 à 20 signifie une rhinite incontrôlée. Un score supérieur de 21 à 25 signifie une rhinite contrôlée.

1°) Au cours des 2 dernières semaines, votre rhinite allergique vous a-t-elle gêné dans vos activités professionnelles/personnelles ?

Protocole Prévall DP

- 1 = En permanence
- 2 = Très fréquemment
- 3 = Fréquemment
- 4 = Peu fréquemment
- 5 = Jamais

2°) Au cours des 2 dernières semaines, votre rhinite allergique a-t-elle influencée votre humeur ?

- 1 = En permanence
- 2 = Très fréquemment
- 3 = Fréquemment
- 4 = Peu fréquemment
- 5 = Jamais

3°) Au cours des 2 dernières semaines, votre rhinite allergique a-t-elle perturbée votre sommeil (endormissement, réveil la nuit) ?

- 1 = En permanence
- 2 = Très fréquemment
- 3 = Fréquemment
- 4 = Peu fréquemment
- 5 = Jamais

4°) Au cours des 2 dernières semaines, avez-vous eu besoins d'utiliser un traitement supplémentaire non prescrit par votre médecin pour soigner votre rhinite allergique ?

- 1 = 4 jours ou plus par semaine
- 2 = 2 à 3 jours ou plus par semaine
- 3 = 1 jour par semaine
- 4 = 1 à 2 fois en tout
- 5 = Jamais

5°) Au cours des 2 dernières semaines, comment évaluez-vous votre rhinite allergique ?

- 1 = Pas du tout contrôlée
- 2 = Très peu contrôlée
- 3 = Un peu contrôlée
- 4 = Bien contrôlée
- 5 = Complètement contrôlée

SCORE = somme des point à chaque item

Protocole Prévall DP

Annexe 11 : CRF patient avec une dermatite atopique Cahier d'observation

Etude Prévall DP N° Enregistrement :

Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique.

Initiales des patients :

- Nom :

- Prénom :

Date de naissance (format mois/année) :

N° inclusion du patient :

Investigateur :

Investigateur Coordonnateur

Dr Bernier Claire
Plateforme Transversale d'Allergologie
CHU Hôtel Dieu
1 place Ricordeau
44 000 NANTES
Tel : 00 33(0)2 40 08 31 41
Fax : 00 33 (0)2 40 48 21 81
E-mail : claire.bernier@chu-nantes.fr

Promoteur

CHU de Nantes
Cellule de promotion à 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

Protocole Prévall DP

Visite d'inclusion des patients présentant une dermatite atopique

Date de signature du consentement :

Date du prélèvement sanguin :

Données démographiques

Âge :

Sexe :

Poids :

Taille :

BMI = poids/(taille)² =

Critères d'inclusion

Une réponse **NON** à l'une des questions suivantes ne permet pas l'inclusion

	Oui	Non
Patients âgés de 18 à 70 ans		
Le patient est non fumeur		
Le patient présente un BMI inférieur à 30 kg/m ²		
Le patient présente une dermatite atopique (cf grille diagnostique) classée modérée (SCORAD entre 25 et 50) ou sévère (SCORAD > 50). (cf score SCORAD)		
Le patient doit présenter une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif selon les normes du laboratoire		
Le patient ne présente pas de contre-indication à la réalisation de prick test.		
Le patient a donné son accord pour participer à l'étude et à la biocollection		
Le patient est affilié à un régime de sécurité sociale		

Protocole Prévall DP

Critères de non inclusion

	Oui	Non
Le patient est incapable majeur ou majeur protégé		
Le patient prend un traitement antimicrobien (antibiotique, antifongique ou antiviral) au long cours pour quelque raison que ce soit		
Le patient a bénéficié ou bénéficie d'une immunothérapie spécifique		
Le patient a été en contact avec une bactérie multi-résistante		
Antécédent de cancer du système hématopoïétique (mastocytose incluse)		
Antécédent de déficit immunitaire acquis par le virus HIV.		
Le patient présente un déficit immunitaire congénital		
Le patient présente une maladie inflammatoire du tube digestif		
Le patient présente une maladie auto-immune et/ou inflammatoire qu'elle soit traitée ou non		
Le patient a bénéficié d'une transplantation d'organes solides ou d'une greffe de cellules hématopoïétiques		
Le patient est toxicomane		
Le patient est une femme enceinte ou en âge de procréer sans contraception efficace		
Le patient présente une défaillance d'organe sévère aiguë ou chronique (insuffisance cardiaque, insuffisance respiratoire, insuffisance hépatique, insuffisance rénale, malabsorption).		
Le patient parle difficilement français et/ou comprend difficilement le français		
Le patient est dans l'incapacité de suivre le protocole		
Le patient refuse la réalisation des prick-test		

Une réponse **OUI** à l'une des question ne permet pas l'inclusion

Protocole Prévall DP

Nom du produit	Posologie	Galénique / voie	Indication	Début de la prise

Traitement en cours :

INCLUSION

OUI

NON

Protocole Prévall DP

Données cliniques

SCORAD =

Présence d'une autre pathologie allergique concomitante :

Si oui, laquelle ? :

Données de l'analyse

Pourcentage de DP8 en fonction des CD3+ :

Pourcentage de DP8 en fonction des CD4+ :

Pourcentage de DP8 en fonction du nombre total d'élément figurés du sang :

Compte absolu des DP8 sur sang total :

Pourcentage de DP8 spécifiques de *F prausnitzii* ayant proliféré :

Pourcentage de DP8 spécifiques d'extrait total d'acarien (*Dermatophagoïdes pteronyssinus*) ayant proliféré :

Présence d'un phénotype régulateur des DP8 après prolifération avec *F prausnitzii* :

Présence d'un phénotype régulateur des DP8 après prolifération avec l'extrait total d'acarien :

Protocole Prévall DP

Grille diagnostic de la dermatite atopique ⁽³⁾

1) Manifestation les plus communes :

- Prurit
- localisation sur les parties convexes (face extenseur) des articulations +/- atteinte faciale chez l'enfant
- localisation au niveau des plis de flexion chez l'adulte sans atteinte faciale
- dermatose chronique (lichénification) avec rechute.

2) Association fréquente :

- xérose cutanée
- âge de début précoce
- Prick test positif pour un ou plusieurs allergènes
- antécédents familiaux
- susceptibilité aux infections cutanée (Syndrome de Kaposi-Juliusberg)
- atteinte palmo-plantaire

3) Autres formes plus rare :

- eczéma mamelonné
- pityriasis alba
- érythrodermie
- signe de Dennie-Morgan (double repli palpébral de la paupière inférieure)

SCORAD

SCORAD INDEX

EUROPEAN TASK FORCE
ON ATOPIC DERMATITIS

Last Name First Name

Date of Birth: DD/MM/YY

Date of Visit:

Figures in parenthesis
for children under two years

A: EXTENT Please indicate the area involved

B: INTENSITY

C: SUBJECTIVE SYMPTOMS
PRURITUS + SLEEP LOSS

A/5 + 7B/2 + C

CRITERIA	INTENSITY
Erythema	
Oedema/Papulation	
Oozing/crust	
Excoration	
Lichenification	
Dryness*	

* Dryness is evaluated
on uninvolved areas

MEANS OF CALCULATION

INTENSITY ITEMS
(average representative area)

0 = absence
1 = mild
2 = moderate
3 = severe

Visual analog scale
(average for the last
3 days or nights)

PRURITUS (0 to 10) 0 10

SLEEP LOSS (0 to 10)

The SCORAD index (derived from the report of European Task Force on Atopic Dermatitis).

Annexe 2



PROTOCOLE DE RECHERCHE BIOMÉDICALE NE PORTANT PAS SUR UN PRODUIT
MENTIONNÉ A L'ARTICLE L. 5311-1 DU CSP

PROTOCOLE PEC13157 - Version n°P1 – 18/08/2014

CONFIDENTIEL

**PROTOCOLE DE COLLECTE D'ÉCHANTILLONS BIOLOGIQUES HUMAINS A
DESTINATION DE LA BIOCOLLECTION XXXXXXX, DANS LE CADRE DU PROJET
SCIENTIFIQUE GOMMS.**

Protocole n° : PEC13157

Type de recherche : Protocole de collecte d'échantillons biologiques, monocentrique.

Numéro ID RCB : non applicable

APPROBATION DU PROTOCOLE	
PROMOTEUR	BIOFORTIS 3 Route de la Chatterie F-44800 Saint Herblain Phone: +33 (0)2 40 20 57 99 Fax: +33 (0)2 40 35 46 95 CHEF DE PROJET : <i>Date et signature :</i> Vergara Coralie DATA MANAGER : <i>Date et signature :</i> Desmars Manuel RESPONSABLE LABORATOIRE : <i>Date et signature :</i> Carton Thomas
INVESTIGATEUR COORDONNATEUR	Dr David GENDRE <i>Date et signature:</i> Fonction : Médecin Généraliste BIOFORTIS 3 Route de la Chatterie F-44800 Saint Herblain Phone: +33 (0)2 40 20 57 99 Fax: +33 (0)2 40 35 46 95
EXPERTS	Pr Jacques LE PENDU <i>Date et signature:</i> Fonction : Directeur du Centre de Recherche en Cancérologie Nantes-Angers (CRCNA) INSERM UMR 892/CNRS UMR 6299 Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes UMR Inserm 892/CNRS 6299 8 quai Moncousu BP 70721 F-44007 Nantes Cedex 1 Pr Pierre LE BARS <i>Date et signature:</i> Fonction : Odontologue 1, place Alexis Ricordeau BP 84215 44042 Nantes Cedex 1 Pr Francine JOTEREAU <i>Date et signature:</i> Fonction : Professeur à la Faculté des Sciences de Nantes - Responsable

	de l'équipe 3 de l'Unité 892 INSERM Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes UMR Inserm 892/CNRS 6299 8 quai Moncousu BP 70721 F-44007 Nantes Cedex 1 Dr Luc COLAS Fonction : Interne allergologie et immunologie clinique <i>Date et signature:</i>
--	--

LISTE DES ABREVIATIONS

Abréviations Signification

ARC	Attaché de Recherche Clinique
BPC	Bonnes Pratiques Cliniques
CPP	Comité de Protection des Personnes
CRF	Case Report Form (Cahier d'observation)
DCI	Dénomination Commune Internationale
EI	Effet Indésirable
EIG	Effet Indésirable Grave
EII	Effet Indésirable Inattendu
EvI	Evénement Indésirable
EvIG	Evénement Indésirable Grave
ID RCB	Identifiant Recherche Biomédicale
IMC	Indice de Masse Corporelle
ISO	International Organization for Standardization
N	Nombre
NS	Numéro de Screening
Vx	Visite x

Unités Signification

j	jour
g	gramme
kg	kilogramme
L	litre
m	mètre
mg	milligramme
mmol	millimole

μkat	microkatal
u.a	unités arbitraires

RESUME DU PROJET

Nom du Promoteur :	Nom du produit étudié :	Noms des ingrédients actifs :
BIOFORTIS	NA	NA
Titre de l'étude	Protocole de collecte d'échantillons biologiques humains à destination de la biocollection xxxxxxxx, dans le cadre du projet scientifique GOMMS.	
Protocole n°	PEC13157	
Centre	1 centre en France (CIC, Biofortis)	
Durée	Suivi	Une seule visite prévue.
	Soit une durée totale prévue par sujet	Une seule visite prévue.
Objectif	Objectif L'objectif de ce protocole est de collecter des échantillons de selles, de sang, de salive, de flore orale et de fluide gingival, ainsi que des données chez des volontaires sains, afin d'enrichir la biobanque XXXXXXXX. Ces échantillons pourront ensuite être utilisés dans le cadre du projet scientifique GOMMS (décrit dans la partie 1. du protocole).	
Méthodologie	Etude de collecte, monocentrique.	
Population étudiée	75 sujets sains de sexe masculin ou féminin.	
Critères d'inclusion	Le sujet doit satisfaire aux critères suivants : • Sujet âgé de 18 à 70 ans (bornes incluses); • Sujet ayant un IMC compris entre 18 kg/m² à 29.9 kg/m² (bornes incluses) ; • Sujet avec une fréquence de selles normale et régulière : au moins 3 selles par semaine et pas plus de 3 selles par jour ; • Sujet non fumeur ou fumeur de façon festive ; • Sujet présentant un examen clinique et buccal normal à la sélection ; • Sujet capable et désireux de se conformer au protocole et acceptant de donner leur consentement éclairé par écrit ; • Sujet affilié à un régime de sécurité sociale.	
Critères de non inclusion	Le sujet ne doit pas présenter l'un des critères de non-inclusion suivant : • Sujet ayant des antécédents ou des symptômes actuels d'allergie (rhinite allergique, conjonctivite allergique, asthme allergique, dermatite atopique, allergie alimentaire) ; • Sujet ayant un traitement immunosuppresseurs systémique actuel. • Sujet consommant ou ayant consommé des antimicrobiens (antibiotiques, antifongiques, antiviraux) dans les 3 mois précédents son inclusion dans l'étude ; • Sujet ayant consommé un probiotique y compris des yaourts dans les 7 jours précédents son inclusion dans l'étude ;	

	• Sujet suivant un régime alimentaire spécifique (végétarien, végétalien...) • Sujet souffrant de troubles du comportement alimentaire type boulimie, anorexie ; • Sujet ayant modifié sa consommation tabagique dans le mois précédent (arrêt du tabac, sujet ayant commencé à fumer...) • Sujet ayant consommé de l'alcool de façon excessive (plus de 2 verres par jour pour une femme, plus de 3 verres par jour pour un homme) dans les 7 jours précédents l'inclusion dans l'étude ; • Sujet consommant de la drogue sous quelque forme que ce soit ; • Femmes enceintes (ou susceptible de l'être) ou en période d'allaitement ; • Sujet allergique ou ayant un de ces parents, frères ou sœurs allergiques, quelque soit l'allergie. • Sujet souffrant d'une pathologie gastro-intestinale aiguë ou chronique • Sujet souffrant d'une affection chronique (cancer, HIV, insuffisance rénale, maladie inflammatoire chronique digestive, articulaire ou autre, insuffisance respiratoire chronique, diabète, hypertension artérielle etc.) • Sujet ayant un traitement de fond à l'exception des contraceptifs oraux ; • Sujet ayant eu un événement médical ou chirurgical majeur ayant nécessité une hospitalisation au cours des 3 derniers mois ; • Sujet ayant eu une anesthésie générale dans le mois précédent l'étude ; • Sujet refusant de donner son consentement par écrit • Ayant une incapacité linguistique ou psychique de signer le consentement éclairé ; • Privé de liberté par décision administrative ou judiciaire, sous tutelle ou curatelle.
--	--

SOMMAIRE

1	Introduction : justification scientifique de la recherche.....	10
2	Objectif(s) de la recherche	12
2.1	Objectif principal	12
3	Protocole de recherche	12
3.1	Méthodologie de la recherche	12
3.1.1	Type de recherche.....	12
3.2	Déroulement de la recherche.....	12
3.2.1	Calendrier des évaluations cliniques	12
3.2.2	Déroulement des visites	12
3.2.2.1	Visite unique de l'étude V1	12
3.2.2.2	Gestion des prélèvements et collectes.....	13
4	Durée de la recherche.....	14
4.1	Chronologie et durée des étapes de la recherche.....	14
4.2	Durée prévue de participation à la recherche.....	14
4.3	Fin de la recherche	14
4.3.1	Définition de la fin d'étude	14
5	Participants à la recherche.....	15
5.1	Population à étudier	15
5.2	Critères d'inclusion.....	15
5.3	Critères de non-inclusion	15
5.4	Modalités de recrutement	16
6	Traitements concomitants	16
6.1	Traitements et produits concomitants autorisés	16
6.2	Traitements et produits concomitants interdits	16
7	Évaluation de la sécurité	16
7.1	Sécurité de la recherche	Error! Bookmark not defined.
7.2	Définitions relatives à la vigilance	Error! Bookmark not defined.
7.2.1	Événement indésirable (EVI).....	Error! Bookmark not defined.
7.2.2	Effet indésirable (EI)	Error! Bookmark not defined.
7.2.3	Événement ou effet indésirable grave (EVIg ou EIG).....	Error! Bookmark not defined.
7.2.4	Effet indésirable inattendu (EII)	Error! Bookmark not defined.

7.3	Recueil, évaluation et traitement des évènements et effets indésirables, et des évènements et effets indésirables graves	Error! Bookmark not defined.
7.3.1	Recueil des événements indésirables	Error! Bookmark not defined.
7.3.2	Evaluation des événements indésirables	Error! Bookmark not defined.
7.3.3	Déclaration des événements, effets ou suspicions d'effets indésirables graves	Error! Bookmark not defined.
7.4	Suivi des évènements et effets indésirables	Error! Bookmark not defined.
8	Considérations éthiques.....	17
8.1	Conduite éthique de l'étude	17
8.2	Information et consentement	17
8.3	Lieu de la recherche	18
8.4	Confidentialité des données	18
9	Procédures administratives.....	18
9.1	Assurance	18
9.2	Amendement au protocole.....	18
9.3	Indemnisation des participants	18
10	Gestion des données	19
10.1	Recueil des données	19
10.2	Saisie et gestion des données	19
10.3	Conservation des données et documents relatifs à la recherche	19
10.4	Droits d'accès	20
11	Contrôle et assurance de la qualité	20
11.1	Considérations générales	20
11.2	Monitoring	20
11.3	Audit.....	20
11.4	Inspection.....	21
12	Bibliographie	22

1 Introduction

Outre son rôle dans la digestion, le tractus gastro-intestinal a des fonctions immunitaires importantes, participe à la protection contre les agents pathogènes et abrite également le microbiote intestinal. Les humains peuvent présenter des phénotypes différents dépendants des caractéristiques de leur tractus.

En premier lieu les sugartypes, phénotypes définis par les antigènes tissulaires de groupe sanguin (histo-HBGAs) exprimés sur le glycocalix des cellules épithéliales et des mucines de surface. Les HBGAs sont synthétisés par addition successive de monosaccharides par des glycosyltransférases spécifiques tels que ABO, FUT2 et FUT3. Les sugartypes résultent des combinaisons de polymorphismes aux loci des gènes ABO, FUT2 et FUT3, incluant des allèles nuls et récessifs. Les sous-groupes qui en résultent dans la population humaine se distinguent par la structure de la chaîne glycané terminale des HBGAs à la surface du tissu épithéliale.

Une relation entre ces HBGAs et des agents pathogènes est observée avec un nombre croissant de pathogènes entériques qui apparaissent utiliser les HBGAs comme facteurs d'attachement dans la phase initiale de l'infection. Cette relation a notamment été montrée pour les norovirus (NoV), responsables de la grande majorité des épidémies de gastro-entérites non bactériennes dans le monde. Plus intéressant, si toutes les souches de norovirus se lient aux HBGAs, ils montrent des liaisons spécifiques de ces structures. En conséquence, chaque souche ne reconnaît qu'une fraction de la population humaine sur la base des combinaisons de polymorphismes des HBGAs. Le sugartype détermine donc la sensibilité ou la résistance aux souches de norovirus, limitant la circulation et l'impact de chaque souche donnée au niveau de la population [1-4]. Des données récentes indiquent que cela pourrait également être le cas pour certaines souches de rotavirus [5].

En second lieu, la diversité de la flore intestinale humaine, découverte grâce aux développements des méthodes métagénomiques, a conduit à la description de trois phénotypes du microbiote, appelés entérotypes [6]. Les entérotypes sont définis par des différences de composition du microbiote intestinal permettant de différencier des groupes d'individu. Le microbiote intestinal a une forte influence sur le développement de l'immunité, des maladies auto-immunes et inflammatoires telles que le diabète de type 1, de la maladie de Crohn, de l'allergie, sur la sensibilité aux maladies infectieuses, ainsi que sur la nutrition, métabolisme et les désordres associés tels l'obésité [7-10]. Cette influence s'exerce notamment au niveau de l'épithélium intestinal, et notamment du glycocalix.

L'ensemble de ces données suggère ainsi une relation directe possible entre sugartypes et entérotypes. Plusieurs éléments de preuve appuient cette hypothèse et suggère que les polymorphismes HBGAs pourraient influencer la composition du microbiote intestinal.

Une association intéressante a ainsi été mise en évidence entre les polymorphismes de FUT2 et la composition en bifidobactéries dans l'intestin humain, ainsi que la sensibilité ou la résistance au diabète de type 1 ou à la maladie de Crohn [11-13].

Une liaison aux HBGAs par des adhésines spécifiques a été documentée pour des souches de *Campilobacter jejuni*, *Escherichia coli* et *Helicobacter pylori*. Dans ce dernier cas, les souches exprimant l'adhésine BabA qui reconnaît spécifiquement des motifs α 2fucosylés sont moins susceptibles d'infecter les individus de génotype FUT2 nul [14-17]. Il a également été récemment montré que plusieurs lectines provenant de divers autres micro-organismes pathogènes se fixent aux HBGAs et reconnaissent différenciellement les sugartypes. Cela suggère que de la même manière que les norovirus, ces pathogènes infecteront préférentiellement ou exclusivement des sous-groupes d'individu en fonction du sugartype. Un mécanisme d'adhésion similaire à la surface intestinale par adhésine HBGA-spécifique a été décrit récemment pour une souche de *Lactobacillus mucosae* [18].

Sur la base de ces observations, le but du **projet GOMMS**, *Gut and Oral Microbiota Mapping & Sugartypes: A new approach to personalized medicine*, est de tester le lien entre les entérotypes du microbiote intestinal et les sugartypes liées aux polymorphismes génétiques combinées aux loci ABO, FUT2 et FUT3.

Un entérotypage sera effectuée à partir de l'ADN bactérien total extrait à partir d'échantillons de selles par méthode de métagénomique à haut débit. A l'issue de cette analyse, les échantillons seront répartis dans les groupes d'entérotypes "Bacteroides", "Prevotella" et "Ruminococcus".

Des échantillons de salive, provenant des mêmes individus que les échantillons de selles, seront utilisés pour effectuer d'une part un génotypage des polymorphismes pertinents des gènes ABO, FUT2 et FUT3, et d'autre part un phénotypage des sugartypes selon les méthodes mises en place au sein de l'équipe du Pr Jacques Le Pendu pour l'étude de la susceptibilité aux norovirus. En cas de discordance entre génotypage et phénotypage, un reséquençage des gènes glycosyltransférases sera effectuée afin de rechercher la présence d'allèles moins fréquents.

Des échantillons de sang, toujours en provenance des mêmes individus, seront utilisés pour des recherches de biomarqueurs....

Les analyses biologiques de ce projet seront réalisées sur des échantillons provenant de la biobanque XXXXXX de BIOFORTIS.

Pour se faire, BIOFORTIS doit enrichir sa biobanque d'échantillons de selles, sang, salive et flore orale provenant de patients sains, et notamment sans allergie et intolérance.

Le protocole proposé intègre des prélèvements réalisés sur 75 sujets permettant ainsi d'accéder d'une part aux 4 sugartypes majeurs sur les 10 sugartypes référencés et d'autre part aux 3 entérotypes.

2 Objectif(s) de la recherche

2.1 Objectif principal

L'objectif de ce protocole est de collecter des échantillons de selles, de sang, de salive et de fluide gingival, ainsi que des données chez des volontaires sains.

3 Protocole de recherche

3.1 Méthodologie de la recherche

3.1.1 Type de recherche

Il s'agit d'une étude de collecte d'échantillons biologiques humains, monocentrique.

3.2 Déroulement de la recherche

3.2.1 Calendrier des évaluations cliniques

	Réunion d'informations	V1
Information des volontaires	x	x
Remise de la lettre d'information et des consentements	x	x
Remise du pot de collecte des selles et du mode opératoire de collecte	x	
Vérification des critères d'inclusion et de non-inclusion		x
Signature des consentements éclairés (au plus tard)		x
Inclusion dans l'étude		x
Examen clinique		x
Examen buccal		x
Recueil des données		x
Collecte échantillons biologiques		x

3.2.2 Déroulement des visites

3.2.2.1 Visite unique de l'étude V1

Le sujet, pré-sélectionné par téléphone, aura reçu en amont de la visite, la lettre d'information et un pot de collecte de selles. S'il est toujours d'accord pour participer, il devra

se présenter dans les locaux de BIOFORTIS. Il recevra alors deux exemplaires du consentement éclairé à signer. L'investigateur devra ensuite :

- Récupérer et signer les deux formulaires de consentement signé du sujet ;
- Vérifier les critères d'inclusion et de non-inclusion ;
- Attribuer un numéro d'identification (NS) au sujet dans l'ordre chronologique ;
- Pratiquer un examen clinique ;
- Recueillir les données démographiques dont l'âge, le sexe, la taille, le poids et l'origine ethnique ;

La composition du microbiote intestinal est très diversifiée d'un individu à l'autre. Une grande partie de cette diversité reste inexpliquée, bien que le régime alimentaire, l'environnement, la génétique de l'hôte et l'exposition microbienne soient tous impliqués (Nature 2012, The Human Microbiome Project Consortium).

De ce fait, l'origine ethnique étant inscrite dans la génétique de l'hôte, cette donnée doit être connue pour l'analyse finale des données.

- Recueillir les antécédents médicaux et chirurgicaux et les pathologies associées ;
- Recueillir les éventuels traitements concomitants ;

Si le sujet est éligible, un odontologue réalisera alors un examen buccal : s'il s'avère normal, le sujet sera alors inclus dans l'étude.

Pourront ensuite être réalisés :

- Le prélèvement sanguin ;
- Le prélèvement salivaire ;
- Le prélèvement de flore orale ;
- La collecte de selles (si elle n'a pas été faite au domicile du sujet) ;
- Le prélèvement de fluide gingival (si applicable).

3.2.2.2 Gestion des prélèvements et collectes

* prélèvement sanguin

Les prélèvements sanguins seront réalisés à Biofortis par le personnel habilité.

80 ml de sang seront prélevés.

Après réalisation du pré-analytique selon le mode opératoire, les échantillons seront inclus dans la biobanque.

* collectes de selles

Les collectes de selles devront être réalisées par le sujet soit à domicile, dans les 48 heures qui précèdent la visite, soit à Biofortis lors de la visite.

Après réalisation du pré-analytique selon le mode opératoire, les échantillons seront inclus dans la biobanque.

* prélèvement salivaire

Le prélèvement de salive sera réalisé à Biofortis grâce au système de Salivette, en présence de personnel habilité. 2 ml devront être prélevés (2 salivettes par sujets).

Après réalisation du pré-analytique selon le mode opératoire, les échantillons seront inclus dans la biobanque.

* prélèvement de flore orale

Les prélèvements de flore orale seront réalisés à Biofortis par le personnel habilité. 5 écouvillons seront prélevés (panoral et spécifiques). Après réalisation du pré-analytique selon le mode opératoire, les échantillons seront inclus dans la biobanque.

* prélèvement de fluide gingival

Les prélèvements de fluide gingival seront réalisés à Biofortis par le personnel habilité, si applicable puisqu'il faut que les sujets aient un sulcus gingival profond (ou des poches parodontales). 1 cône sera prélevé.

Après réalisation du pré-analytique selon le mode opératoire, les échantillons seront inclus dans la biobanque.

4 Durée de la recherche

4.1 Chronologie et durée des étapes de la recherche

La première et unique visite (V1) est la visite de sélection/inclusion. Si le sujet correspond aux critères de l'étude, il est inclus, et pourra procéder aux recueils des échantillons biologiques.

4.2 Durée prévue de participation à la recherche

L'étude ne comportant qu'une seule visite, la participation prévue d'un sujet durera le temps de celle-ci.

4.3 Fin de la recherche

4.3.1 Définition de la fin d'étude

La fin d'étude correspond à la date de la dernière visite du dernier volontaire participant à l'étude.

5 Participants à la recherche

5.1 Population à étudier

75 sujets sains de sexe masculin ou féminin seront recrutés dans le cadre de cette étude.

5.2 Critères d'inclusion

Pour être inclus dans la recherche, le sujet doit satisfaire aux critères suivants :

- Sujet âgé de 18 à 45 ans;
- Sujet ayant un IMC compris entre 18,5 kg/m² et 24.9 kg/m² ;
- Sujet avec une fréquence de selles normale et régulière : au moins 3 selles par semaine et pas plus de 3 selles par jour ;
- Sujet présentant un examen buccal normal à la sélection ;
- Sujet capable et désireux de se conformer au protocole et acceptant de donner leur consentement éclairé par écrit ;
- Sujet affilié à un régime de sécurité sociale ;
- Sujet acceptant d'être inscrit au fichier national des volontaires qui se prêtent à des recherches biomédicales.

5.3 Critères de non-inclusion

Le sujet ne pourra pas entrer dans la recherche s'il présente l'un des critères de non-inclusion suivant :

- Sujet diabétique ;
- Sujet consommant ou ayant consommé des antibiotiques ou probiotiques dans les XX semaines précédents son inclusion dans l'étude ;
- Pathologies gastro-intestinales ;
- Sujet immunodéprimé ;
- Sujet fumeur consommant plus de 20 cigarettes par jour ;
- Femmes enceintes ou allaitantes ;
- Sujet allergique ou ayant un de ces parents allergiques
- Sujet souffrant d'une affection chronique sévère (cancer, HIV, insuffisance rénale, maladie inflammatoire chronique digestive, articulaire ou autre, insuffisance respiratoire chronique, etc.) jugée incompatible avec la réalisation de l'étude par l'investigateur ;
- Sujet ayant eu un événement médical ou chirurgical majeur ayant nécessité une hospitalisation au cours des 3 derniers mois ;
- Sujet ayant eu une anesthésie générale dans le mois précédent l'étude ;

- Participant à une étude clinique ou en période d'exclusion d'une précédente étude clinique ;
- Sujet refusant de donner son consentement par écrit
- Ayant une incapacité linguistique ou psychique de signer le consentement éclairé ;
- Privé de liberté par décision administrative ou judiciaire, sous tutelle ou curatelle.

5.4 Modalités de recrutement

Les participants seront sélectionnés :

- via une réunion d'information mise en place à la faculté dentaire de Nantes, auprès des étudiants,
- via la base de données volontaires de la société Biofortis.

6 Traitements concomitants

L'utilisation d'un traitement concomitant par le sujet devra être mentionnée sur le formulaire « formulaire de traitement concomitant » figurant dans les cahiers d'observation.

Le nom commercial du traitement concomitant sera codé par la DCI.

6.1 Traitements et produits concomitants autorisés

La prise des produits ou traitements suivants est autorisée :

- Contraceptif ;
- Tout traitement non interdit par les critères de non-inclusion et non pris le jour de la visite.

6.2 Traitements et produits concomitants interdits

Les principaux produits et traitements interdits sont des critères de non-inclusion (cf. § 6.3).

Ces produits ou traitements ainsi que tout produit administré par voie générale ou locale, qui est, de l'avis de l'investigateur, susceptible d'interférer avec l'évaluation des paramètres étudiés, sont interdits pendant toute la durée de l'étude.

Les sujets devront, dans la mesure du possible, s'abstenir de prendre, sans autorisation préalable de l'un des médecins investigateurs, tout médicament, complément alimentaire ou vitaminique, même considéré comme anodin, pendant toute la durée de la recherche biomédicale.

7 Évaluation de la sécurité

Non applicable

8 Considérations éthiques

8.1 Conduite éthique de l'étude

Cette étude sera réalisée chez des sujets volontaires, en application des règles de Bonnes Pratiques Cliniques (directive ICH E6, Décision du 24 novembre 2006 fixant les règles de bonnes pratiques cliniques pour les recherches biomédicales portant sur les médicaments à usage humain en France) et en accord avec la Déclaration d'Helsinki.

L'étude se déroulera, également en conformité avec le Code de Santé Publique, Livre 2 de la première partie, relatif au Don et utilisation des éléments et produits du corps humain.

Avant le démarrage de l'essai, le protocole, le formulaire d'information et de consentement éclairé ainsi que les autres documents requis seront soumis par le promoteur pour revue et approbation par le Comité de Protection des Personnes (CPP) Ouest IV, siégeant à Nantes. Les amendements au protocole seront soumis, selon leur nature, au CPP pour avis. L'essai ne pourra commencer avant l'obtention de l'avis favorable du CPP.

8.2 Information et consentement

Lors de la réunion qui se déroulera à la faculté et lors de la visite V1, des informations orales et écrites concernant la recherche biomédicale seront fournies aux volontaires. La lettre d'information précisant l'objectif, la méthodologie, la durée, les contraintes et les bénéfices de cette recherche, sera fournie lors de la réunion à la faculté. Après avoir bénéficié d'un délai de réflexion, si le sujet est intéressé, il se rendra au CIC BIOFORTIS où il pourra poser toutes les questions qui lui semblent utiles au médecin investigateur puis signera le consentement éclairé s'il est d'accord pour participer à la recherche.

Lors de la première visite au sein du centre d'expérimentation, des informations orales et écrites concernant la recherche biomédicale seront fournies aux volontaires, notamment la lettre d'information précisant l'objectif, la méthodologie, la durée, les contraintes et les bénéfices de cette recherche. Le sujet pourra poser toutes les questions qui lui semblent utiles au médecin investigateur. Il bénéficiera ensuite d'un temps de réflexion qui lui semblera nécessaire, puis signera le consentement éclairé s'il est d'accord pour participer à la recherche.

Le sujet pourra retirer son consentement à tout moment, sans avoir à justifier son acte et sans conséquences sur la qualité des soins dont il fera l'objet. Le consentement ne décharge pas l'investigateur et le promoteur de leurs responsabilités à l'égard du participant à la recherche.

8.3 Lieu de la recherche

Le lieu d'expérimentation est le CIC de la société BIOFORTIS située au 3 route de la Chatterie – 44800 Saint Herblain.

BIOFORTIS est un centre agréé par le Ministère de la Santé pour effectuer des recherches biomédicales dans les domaines de la nutrition humaine et de la physiologie.

Chaque volontaire sera suivi par médecin investigateur de l'étude. En outre, les prélèvements sanguins et la pose du matériel de prélèvement seront effectués soit par un médecin, soit par un infirmier diplômé d'état sous la responsabilité du médecin investigateur.

8.4 Confidentialité des données

Afin de protéger les données et les sujets recrutés, les seules clés d'identification seront le numéro séquentiel attribué au volontaire lors de la visite de sélection, s'il satisfait aux critères d'inclusion et ses initiales.

Les données seront traitées de manière confidentielle grâce à ce codage et en aucun cas il ne sera possible au promoteur de connaître ou de deviner l'identité du sujet.

Les investigateurs conserveront pour leur usage une liste associant les identités, adresses, numéros de téléphone des sujets aux initiales sous lesquelles ils apparaissent sur le cahier d'observation.

9 Procédures administratives

9.1 Assurance

Le promoteur de la recherche a souscrit une assurance couvrant sa responsabilité civile dans le cadre d'un essai clinique conformément au Code de la Santé Publique, auprès de

9.2 Amendement au protocole

Ni l'investigateur ni le promoteur ne peuvent modifier le protocole sans l'autorisation de l'autre partie.

Tout changement au protocole doit faire l'objet d'un amendement qui doit être daté et signé par les deux parties et doit apparaître comme amendement au protocole.

Les amendements substantiels sont soumis pour approbation au comité d'éthique.

9.3 Indemnisation des participants

Aucune indemnisation ne peut être donnée aux participants conformément à l'article L.1211-4 du Code de la Santé Publique, néanmoins, les frais afférents aux prélèvements doivent être pris en charge.

Dans le cadre de notre protocole de collecte, les participants doivent se déplacer à Biofortis. Un défraiement de 30 euros pour le déplacement sera pris en charge par Biofortis.

10 Gestion des données

10.1 Recueil des données

L'ensemble des données relatives à ce protocole sera recueilli :

- soit par le médecin qui les saisira dans le cahier d'observation électronique (e-CRF) prévu à cet effet.

Il existe un cahier d'observation pour chaque sujet inclus dans le protocole.

- soit par les volontaires qui les recueilleront dans des questionnaires informatiques prévus à cet effet.

Les données sources sont l'ensemble des informations figurant dans les documents originaux ou dans les copies identifiées de ces documents.

10.2 Saisie et gestion des données

Les données provenant d'e-CRF ou des questionnaires informatiques seront transférées directement dans la base de données sous la responsabilité de BIOFORTIS.

Les résultats d'analyses de biologie seront ajoutés à cette base de données par transmission télématique ou par double saisie.

Les résultats d'enquête alimentaire seront ajoutés à cette base de données par transmission télématique ou par double saisie.

Toutes les données seront soumises à un contrôle informatique destiné à détecter les données manquantes, hors bornes ou pouvant poser un problème de cohérence.

Les données erronées ou manquantes feront l'objet de demandes de corrections. Les corrections évidentes (ex : orthographe) pourront être faites par le data manager en accord avec le promoteur et seront documentées.

La base de données sera gelée après que toutes les demandes de corrections auront été résolues.

10.3 Conservation des données et documents relatifs à la recherche

Les investigateurs doivent conserver les documents liés à l'étude pendant 15 ans après l'interruption ou la fin de l'étude. Les dossiers des sujets ainsi que les autres documents

sources doivent être gardés aussi longtemps que l'autorise l'institution, mais pas moins de 15 ans.

Seront archivés par BIOFORTIS pendant au moins 15 ans après la fin de l'étude : le protocole, les CRF, les données de l'étude, les demandes de correction, les consentements des sujets, les copies des approbations du CPP et autres autorités, les correspondances relatives à l'essai, et tout autre document pertinent relatif à l'étude.

10.4 Droits d'accès

Les données concernant les sujets recueillies lors de cette recherche, resteront strictement confidentielles. Elles ne seront consultables que par l'investigateur, les personnes mandatées par le promoteur et astreintes au secret professionnel et éventuellement, un représentant des autorités de santé. Ces personnes prennent toutes les précautions nécessaires en vue d'assurer la confidentialité des informations relatives aux produits expérimentaux, aux essais, aux personnes qui s'y prêtent et notamment en ce qui concerne leur identité ainsi que les résultats obtenus.

Le traitement des données relatives à la présente recherche clinique est conforme aux dispositions de la loi n°2004-801 du 06 août 2004 relative à la protection des personnes physique à l'égard des traitements des données à caractères personnels et modifiant la loi n°78-17 du 06 janvier 1978 relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés (PR-INFO-007).

11 Contrôle et assurance de la qualité

11.1 Considérations générales

Cette recherche biomédicale sera conduite conformément aux BPC dans un centre de recherche agréé (cf. paragraphe 11).

Par ailleurs, la société BIOFORTIS est certifiée ISO 9001:2008 pour son activité de conception, de suivi et d'interprétation des études cliniques, ainsi que pour la réalisation d'analyses spécialisées dans le domaine de l'exploration des désordres métaboliques.

11.2 Monitoring

Non applicable

11.3 Audit

Le promoteur est responsable de s'assurer que ses représentants et l'investigateur remplissent les conditions comme indiquées par les BPC.

Toute la documentation d'étude doit être directement accessible aux auditeurs.

Les conditions pratiques pour l'audit sont discutées entre l'investigateur et le service qualité.

Des informations orales sur les résultats d'audit sont fournies aux investigateurs.

11.4 Inspection

Une autorité de tutelle peut également décider de faire une inspection (pendant l'étude ou une fois celle-ci achevée). L'investigateur devra permettre l'accès direct aux documents source.

12 Bibliographie

1. Marionneau, S., B. Le Moullac-Vaidye, and J. Le Pendu, *Expression of histo-blood group A antigen increases resistance to apoptosis and facilitates escape from immune control of rat colon carcinoma cells*. Glycobiology, 2002. **12**(12): p. 851-6.
2. Le Pendu, J., et al., *Mendelian resistance to human norovirus infections*. Semin Immunol, 2006. **18**(6): p. 375-86.
3. Marionneau, S., et al., *Influence of the combined ABO, FUT2, and FUT3 polymorphism on susceptibility to Norwalk virus attachment*. J Infect Dis, 2005. **192**(6): p. 1071-7.
4. Lindesmith, L., et al., *Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection*. Nat Med, 2003. **9**(5): p. 548-53.
5. Hu, L., et al., *Cell attachment protein VP8* of a human rotavirus specifically interacts with A-type histo-blood group antigen*. Nature, 2012. **485**(7397): p. 256-9.
6. Arumugam, M., et al., *Enterotypes of the human gut microbiome*. Nature, 2011.
7. Ley, R.E., et al., *Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity*. Nature, 2006. **444**(7122): p. 1022-3.
8. Packey, C.D. and R.B. Sartor, *Commensal bacteria, traditional and opportunistic pathogens, dysbiosis and bacterial killing in inflammatory bowel diseases*. Curr Opin Infect Dis, 2009. **22**(3): p. 292-301.
9. Round, J.L. and S.K. Mazmanian, *The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(5): p. 313-23.
10. Wardwell, L.H., C. Huttenhower, and W.S. Garrett, *Current concepts of the intestinal microbiota and the pathogenesis of infection*. Curr Infect Dis Rep, 2011. **13**(1): p. 28-34.
11. Rausch, P., et al., *Colonic mucosa-associated microbiota is influenced by an interaction of Crohn disease and FUT2 (Secretor) genotype*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(47): p. 19030-5.
12. Smyth, D.J., et al., *FUT2 nonsecretor status links type 1 diabetes susceptibility and resistance to infection*. Diabetes, 2011. **60**(11): p. 3081-4.
13. Wacklin, P., et al., *Secretor genotype (FUT2 gene) is strongly associated with the composition of Bifidobacteria in the human intestine*. PLoS ONE, 2011. **6**(5): p. e20113.
14. Aspholm-Hurtig, M., et al., *Functional adaptation of BabA, the H. pylori ABO blood group antigen binding adhesin*. Science, 2004. **305**(5683): p. 519-22.
15. Azevedo, M., et al., *Infection by Helicobacter pylori expressing the BabA adhesin is influenced by the secretor phenotype*. J Pathol, 2008. **215**(3): p. 308-16.
16. Ruiz-Palacios, G.M., et al., *Campylobacter jejuni binds intestinal H(O) antigen (Fuc alpha 1, 2Gal beta 1, 4GlcNAc), and fucosyloligosaccharides of human milk inhibit its binding and infection*. J Biol Chem, 2003. **278**(16): p. 14112-20.
17. Stapleton, A., et al., *Binding of uropathogenic Escherichia coli R45 to glycolipids extracted from vaginal epithelial cells is dependent on histo-blood group secretor status*. J Clin Invest, 1992. **90**(3): p. 965-72.

18. Watanabe, M., et al., *Identification of a new adhesin-like protein from Lactobacillus mucosae ME-340 with specific affinity to the human blood group A and B antigens.* J Appl Microbiol, 2010. **109**(3): p. 927-35.

TEMPORARY VERSION

Annexe 3



Contrat de Collaboration

N° RC14_0372

N° DAF : 16826/16

Entre

CHU de Nantes

Le Centre Hospitalier Universitaire de Nantes dont le siège est 5, allée de l'Île Gloriette, 44093 Nantes Cedex, représenté par Monsieur Philippe SUDREAU, Directeur Général du CHU, et désigné dans les présentes « **CHU de Nantes** »,

agissant pour le compte de la Plateforme Transversale d'Allergologie et en présence du Dr Claire BERNIER

d'une Part,

Et

BIOFORTIS SAS, dont le siège est 3 route de la Chatterie, 44800 Saint-Herblain, représentée par Madame Murielle CAZAUBIEL, Managing Director Europe et désignée dans les présentes « **Biofortis** »,

d'autre Part,

Conjointement désignés « les Parties », et individuellement « la Partie ».

Article 1. PREAMBULE

Le CHU de Nantes est un établissement public de santé ayant pour missions : le soin, l'enseignement et la recherche, ainsi qu'à titre subsidiaire, la réalisation de prestations de service, la valorisation des activités de recherche et leurs résultats, l'exploitation des brevets et des licences.

Parmi de multiples thématiques de recherche, le CHU de Nantes développe des activités relatives au microbiote intestinal. Le Dr Claire BERNIER exerçant à la Plateforme Transversale d'Allergologie est l'investigateur principal d'une recherche portant sur l'évaluation des soins courants intitulée « Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique » (titre abrégé : Prévall-DP) et qui est décrite en Annexe 1.

Le CHU de Nantes déclare agir en tant que promoteur de la recherche au sens de l'article L. 1121-1, 2° du CSP.

Biofortis dans le cadre de son activité effectue des prélèvements d'échantillons biologiques humains notamment de sang. Les services que propose Biofortis en matière de prélèvement intéressent le CHU de Nantes dans le cadre de la réalisation du Projet Prévall-DP. Biofortis souhaite contribuer à la réalisation du Projet Prévall-DP par la mise à disposition d'échantillons biologiques humains et des données médicales associées (ci-après la « Mise à Disposition ») au CHU de Nantes dont le descriptif et les modalités sont détaillés dans les Annexes 2 et 3. Cette Mise en Disposition se fait contre une contrepartie décrite dans le présent contrat à l'article 7.

Les Parties ont donc décidé de collaborer dans le cadre de ce Projet et de définir les modalités de cette collaboration dans le présent contrat (ci-après le « Contrat »)

Ceci exposé, il est convenu et arrêté ce qui suit.

Article 2. DEFINITIONS

Les termes ci-après identifiés auront le sens défini ci-après au sein du présent Contrat.

TERME	SIGNIFICATION DU TERME AU SEIN DU PRESENT CONTRAT
DENOMINATION DES PARTIES	
CHU DE NANTES	Centre Hospitalier Universitaire de Nantes.
DEFINITIONS RELATIVES AU(X) PROJET(S)	
PROJET	Désigne le projet de recherche Prévall-DP exprimé à l'annexe 1, proposé par l'une des Parties à l'autre qui l'a pleinement accepté et qui fait l'objet du présent Contrat.
PORTEUR DU PROJET	Désigne la ou les personnes physiques agissant pour le compte d'une Partie et sur l'initiative de laquelle un Projet est proposé à l'autre Partie. Le Porteur de Projet devient responsable scientifique du Projet pour la Partie dont il relève lors de l'exécution du présent Contrat. Le Porteur du Projet est le Dr Claire BERNIER.
DEFINITION RELATIVE A LA PROPRIETE INTELLECTUELLE	
RESULTATS	Ce terme désigne toute information, connaissance, invention, découverte, savoir-faire ou donnée de nature intellectuelle, technique, scientifique ou industrielle créés ou mis en évidence à l'occasion du PROJET.
DEFINITIONS RELATIVES AUX CONTRATS	
CONTRAT	Désigne le présent Contrat
DEFINITIONS RELATIVES A LA PERSONNE HUMAINE	
ECHANTILLON BIOLOGIQUE HUMAIN (EBH)	Ces termes désignent tout produit ou élément du corps humain ayant fait l'objet d'un prélèvement et qui se trouve isolé totalement ou partiellement dans un but précis : médical, thérapeutique ou scientifique. Plusieurs Echantillons biologiques humains pourront faire l'objet de Collections d'échantillons biologiques humains.
COLLECTION D'ECHANTILLONS BIOLOGIQUES HUMAINS (CEBH)	Ces termes désignent la réunion à des fins scientifiques, d'Echantillons Biologiques humains provenant d'un groupe de personnes identifiées et sélectionnées en fonction des caractéristiques cliniques et biologiques d'un ou plusieurs membres du groupe. Les Dérivés des Echantillons Biologiques humains considérés comme pleinement intégrés à la CEBH au sein de laquelle les EBH sont rassemblés.
PERSONNE CONCERNEE	Désigne toute personne dont serait issu un Echantillon Biologique humain intégré ou non au sein d'une Collection Echantillons Biologiques humains, et/ou toute personne à laquelle se rapportent des Données à caractère personnel ou des Données associées.

TERME	SIGNIFICATION DU TERME AU SEIN DU PRESENT CONTRAT
DEFINITIONS RELATIVES AUX INFORMATIONS ET A LEUR TRAITEMENT	
INFORMATIONS CONFIDENTIELLES	Ces termes désignent toutes informations communiquées par une Partie à l'autre Partie, que ces informations soient écrites, orales, numériques ou graphiques, quel que soit leur support ou leur mode de transmission, à l'occasion de la conclusion et/ou l'exécution du présent Contrat et de ses éventuels annexes ou avenants, non publiquement et légitimement disponibles. Ces informations incluent toute information, œuvre, connaissance, invention, découverte, savoir faire, brevet, dessin, modèle ou donnée de nature intellectuelle, technique, scientifique, commerciale, financière ou industrielle ou encore toute information relative à l'organisation de l'une des Parties, sa politique, sa gestion administrative et financière, toutes informations internes, comptables, sociales ou juridiques d'une Partie comprise soit dans un document écrit ou électronique, soit oralement ou visuellement, par inspection des pièces ou équipement. Elles incluent a fortiori les divers comptes-rendus, ainsi que l'ensemble des informations afférentes aux études et travaux, et les résultats encore non publiés issus de ceux-ci.
DONNEES A CARACTERE PERSONNEL	Désigne toute information relative à une personne physique identifiée ou qui peut être identifiée, directement ou indirectement, par référence à un numéro d'identification ou à un ou plusieurs éléments qui lui sont propres. Pour déterminer si une personne est identifiable, il convient de considérer l'ensemble des moyens en vue de permettre son identification dont dispose ou auxquels peut avoir accès le responsable du traitement informatique y afférent ou toute autre personne. Les Données à caractère personnel sont susceptibles de constituer des Données à caractère personnel. En tout état de cause, les Données à caractère personnel sont entendues au sein du le présent Contrat comme des Informations Confidentielles.
DONNEES ASSOCIEES	Désigne toute donnée susceptible de se rattacher directement ou indirectement à un Echantillon biologique humain, pris isolément ou intégré au sein d'une Collection d'échantillons biologiques humains, et susceptible de faire l'objet d'un fichier ou d'un traitement informatisé. Les données associées peuvent être de nature clinique, biologique, anatomopathologique Les Données associées sont susceptibles d'être constituées de Données à caractère personnel. En tout état de cause, les Données associées sont entendues au sein du présent Contrat comme des Informations Confidentielles.
FICHIER	Désigne tout ensemble structuré et stable de Données à caractère personnel ou de Données associées accessibles selon des critères déterminés.
TRAITEMENT	Désigne toute opération ou tout ensemble d'opérations portant sur des Données à caractère personnel ou des Données associées, quel que soit le procédé utilisé, et notamment : - la collecte, l'enregistrement, l'organisation, la conservation, l'adaptation ou ; - la modification, l'extraction, la consultation, l'utilisation, la communication par transmission, diffusion, ou ; - toute autre forme de mise à disposition, le rapprochement ou l'interconnexion, ainsi que le verrouillage, l'effacement ou la destruction

Article 3. OBJET DU CONTRAT

Le présent Contrat a pour objet de définir:

- les conditions dans lesquelles les Parties collaborent dans le cadre du Projet;
- les droits et obligations de chaque Partie.

Article 4. OBLIGATIONS DES PARTIES

• 4.1. Obligations relative à la conduite du Projet/des travaux.

Le CHU de Nantes est l'établissement au sein duquel l'initiative du Projet a été prise, notamment au regard des travaux et propositions du Porteur du Projet. Le Porteur du Projet s'assure de la bonne conduite scientifique du Projet. Il conseille et informe les Parties de tout élément permettant de mener le Projet dans les meilleures conditions. Le responsable scientifique du Projet pour Biofortis est Madame Françoise Le Vacon.

Les Parties s'assurent de la conduite, la bonne gestion et l'aboutissement du Projet en collaboration avec les responsables scientifiques.

Chaque Partie s'engage à réaliser la part du Projet la concernant (ci-après les « Travaux ») telle qu'elle est détaillée dans les annexes, dans le respect des règles de l'art, en mettant en œuvre toute la diligence requise et les moyens nécessaires à la réalisation des travaux. Le CHU de Nantes ne saurait tenir Biofortis responsable de l'échec de la réalisation des Travaux étant donné leur nature expérimentale et donc aléatoire, dans la mesure où Biofortis aurait fait toute diligence pour réaliser les dits Travaux.

• 4.2. Obligation d'information/conseil

Chaque Partie s'engage à informer l'autre Partie de toute information scientifique ou technique nécessaire à la bonne réalisation des Travaux, ainsi qu'à apporter son concours aux fins des présentes. Aucune Partie ne pourra être tenue responsable de l'échec des Travaux par l'autre Partie dans le cas où cette dernière ne lui a pas communiqué les informations nécessaires à leur réalisation.

• 4.3. Obligation relative au calendrier/délais

Les Parties s'engagent à faire tout leur possible pour respecter les délais d'exécution des étapes prévues au Projet.

• 4.4. Obligation d'exclusivité – réalisation personnelle

Les Travaux doivent être accomplis par les Parties elles-mêmes, qui ne peuvent pas sous-traiter sans l'accord préalable écrit de l'autre Partie (intuitu personae).

• 4.5. Obligation relative au respect de la réglementation

Chaque Partie s'engage à mettre en œuvre toutes les démarches réglementaires nécessaires permettant d'assurer la conformité du Projet au Droit français, et ainsi solliciter tous les avis, déclarations, autorisations et décisions requises par la conduite du Projet en son sein.

Les Parties sont responsables de l'information des Personnes Concernées et du recueil de leur consentement à la réalisation du Projet. Les Parties sont respectivement, individuellement et non solidairement responsables de l'information des Personnes concernées prises en charge en leur sein et du recueil de leur consentement à la réalisation du Projet.

• 4.6. Obligation relative au financement/paiement

Sauf stipulation contraire au sein du présent Contrat, chaque Partie supporte le financement de ses propres dépenses notamment s'agissant de la constitution de la collection témoin (Biofortis) et de la réalisation de la recherche en soins courants (CHU de Nantes).

Il est cependant précisé que :

- Le CHU de Nantes remboursera à Biofortis, les réactifs et consommables nécessaires à la réalisation des Travaux incombant à Biofortis pour un montant total maximum de 34.90 euros TTC.
- Le CHU de Nantes assumera également le coût de transport des échantillons biologiques humains transférés depuis les locaux de Biofortis jusqu'au site de réalisation du Projet, pour un montant total maximum de 850 euros TTC.

• 4.7. Obligation de non-sollicitation de personnel

Chacune des Parties s'interdit d'engager, ou de faire travailler d'aucune manière, tout collaborateur présent de l'autre Partie participant au Projet. La présente clause vaudra, quelle que soit la spécialisation du collaborateur en cause, et même dans l'hypothèse où la sollicitation serait à l'initiative dudit collaborateur. La présente clause développera ses effets pendant toute l'exécution du présent Contrat, et pendant une durée équivalente à compter de son échéance. Cette interdiction ne joue pas en cas d'offre formulée en toute bonne foi au public par l'une des Parties.

• 4.8. Obligations relatives aux Echantillons Biologiques Humains

Le CHU de Nantes s'engage :

- à utiliser les Echantillons Biologiques Humains fournis et les données associées, en accord avec la législation et la réglementation en vigueur en France et en Europe ;
- à ne pas utiliser les Echantillons Biologiques Humains mis à disposition à d'autres fins scientifiques que le Projet Prévall-DP sans l'accord préalable et écrit de Biofortis ;

- à ne pas procéder à l'examen des caractéristiques génétiques de l'hôte donneur des Echantillons Biologiques Humains mis à disposition; les analyses ponctuelles de transcriptomique sur les cultures cellulaires a des fins de confirmation de résultats peuvent être autorisées ;
- à ne pas utiliser ces Echantillons Biologiques Humains, ni à des fins thérapeutiques, ni à des fins d'expérimentation sur l'homme ;
- à ne céder ni les Echantillons Biologiques Humains mis à disposition et ni les données qui y sont associées.

Le CHU de Nantes accepte les Echantillons Biologiques Humains en l'état et sous sa seule responsabilité.

Article 5. AUDITS/INSPECTIONS

Afin d'évaluer la qualité des travaux, chaque Partie s'engage à accepter un audit éventuel à la demande de l'autre Partie. Un tel audit pourra être réalisé par un représentant des autorités nationales ou internationales. La Partie étant à l'initiative d'un tel audit devra en informer l'autre Partie au moins deux (2) semaines avant la réalisation dudit audit.

La Partie qui diligente l'audit/l'inspection en assume la charge financière. La Partie auditée/inspectée s'engage à ne pas facturer à celle-ci les surcoûts liés au temps passé pour la réalisation dudit audit/inspection. Les modalités de déroulement de l'audit/inspection, ainsi que de prise en charge des frais afférents, seront discutées de bonne foi entre les Parties le cas échéant.

Article 6. CONFIDENTIALITE

Chaque Partie s'engage à prendre toute mesure nécessaire à la protection des informations de nature confidentielle relatives à l'autre Partie et dont la divulgation serait rendue nécessaire afin de satisfaire à l'exécution du présent Contrat. Aux termes du présent Contrat, les Parties conviennent que de telles informations peuvent être écrites, orales, numériques ou graphiques, quel que soit leur support ou leur mode de transmission et sont considérées comme non publiquement et légitimement disponibles. Ces Informations Confidentielles sont définies à l'article 2 du présent Contrat.

Chaque Partie reconnaît et convient qu'elle pourra être amenée à, dans la limite où l'exécution du présent Contrat le requiert, avoir accès aux Informations Confidentielles de l'autre Partie et s'engage à (i) ne pas divulguer, discuter, fournir, transmettre, copier, rendre disponible ou communiquer d'une manière ou d'une autre, directement ou indirectement, tout ou partie les Informations Confidentielles de cette Partie à un tiers, sans obtenir au préalable le consentement de cette Partie et (ii) ne pas utiliser les Informations Confidentielles de cette Partie dans un but autre que celui d'exercer ses droits et d'exécuter ses obligations en vertu du présent Contrat.

Nonobstant ces stipulations, chaque Partie peut communiquer les Informations Confidentielles dont elle peut apporter la preuve :

- qu'elles étaient disponibles publiquement préalablement à leur communication ou postérieurement à celle-ci, mais en l'absence de toute faute qui lui soit imputable ;
- qu'elles ont été reçues d'un tiers de manière licite ;
- qu'elles étaient déjà en sa possession avant la conclusion du Contrat mais en l'absence de toute faute qui lui soit imputable;
- qu'elles ont été développées de manière indépendante et de bonne foi par des membres de son personnel n'ayant pas eu accès à ces Informations Confidentielles.

D'autre part, chaque Partie s'engage à :

- prendre toutes les mesures et précautions nécessaires et raisonnables afin d'éviter que ne soient divulguées à un tiers les Informations Confidentielles de l'autre Partie échangées entre elles ;
- ne transmettre les Informations Confidentielles communiquées par l'autre Partie qu'aux membres de son personnel ou à ses sous-traitants seulement si ces derniers sont amenés à en avoir besoin pour l'accomplissement de leur mission afférente au présent Contrat, et sous réserve que ces personnels soient soumis au secret professionnel, et que ces sous-traitants soient soumis à un accord de confidentialité, reprenant les obligations stipulées aux présentes et garantissant le secret et la confidentialité des Informations Confidentielles des Parties ;
- prendre toutes les mesures raisonnables pour éviter que le personnel n'utilise les Informations Confidentielles de l'autre Partie à des fins autres que l'objet du présent Contrat ;
- avertir l'autre Partie, dès que possible, de la réalisation de tout évènement ou la constatation d'une quelconque activité qui serait de nature à porter atteinte à la confidentialité des Informations confidentielles, afin que les Parties puissent convenir actes conservatoires ou autres mesures de prévention à diligenter afin de maintenir le secret des Informations Confidentielles.

L'obligation de confidentialité faisant l'objet du présent article doit être respectée réciproquement par les Parties pendant toute la durée du présent Contrat et pendant une durée de quinze (15) ans à compter de la date de prise d'effet du présent Contrat, à l'exception des Données à caractère personnel qui sont gardées confidentielles sans limitation de durée. A l'expiration du présent Contrat, chaque Partie s'engage à restituer à l'autre Partie, l'intégralité des Informations Confidentielles qui lui auront été communiquées ou échangées, sans en garder copie, ce à la demande simple de la Partie concernée, et dans tous les cas, dans trente (30) jours qui suivront le terme du contrat ou la résiliation. Les Parties s'engagent à se fournir mutuellement des certificats de destruction. Toutefois, chaque Partie peut conserver les Informations Confidentielles nécessaires à l'accomplissement de ses obligations réglementaires de suivi et d'archivage. Dans ce cas, lesdites Informations confidentielles sont conservées dans des conditions garantissant leur stricte confidentialité.

Dans tous les cas, chaque Partie est tenue d'observer les dispositions de l'article L. 1110-4 du Code de la santé publique, relatives à la vie privée et au secret des informations relatives aux personnes prises en charge au sein d'un établissement public de santé, et autres principes relatifs à la protection des personnes contenus au sein de la loi dite « Informatique et Libertés » du 6 janvier 1978 notamment modifiée par la loi n° 2004-801 du 6 août 2004 et ses textes d'application, et ce, quel que soit le lieu d'exécution du présent Contrat ou encore le lieu d'utilisation des données à caractère personnel.

Article 7. PUBLICATIONS

En tant que porteur initial du Projet, le CHU de Nantes bénéficie du droit d'effectuer la première publication.

En contrepartie de la contribution de Biofortis à la réalisation du Projet, deux personnes de Biofortis apparaîtront dans la liste des auteurs de la publication princeps portant sur les résultats du Projet.

Les stipulations du présent article et celles de l'article 6 ne font pas obstacle à l'obligation qui incombe à chacune des personnes participant au Projet de produire un rapport d'activité à l'établissement dont elle relève, ainsi qu'à la soutenance de thèse des chercheurs ou de rapports/mémoires des étudiants dont l'activité scientifique est en relation avec l'objet du présent Contrat. Ces divulgations pourront être organisées à huis clos à chaque fois que cela est nécessaire.

Article 8. PROPRIETE INTELLECTUELLE

• 8.1. Titularité des droits de propriété intellectuelle issus du Projet

Les Résultats du Projet sont la propriété exclusive du CHU de Nantes.

Si les Travaux effectués au cours du Projet donnent lieu à des inventions brevetables ou autres mesures de protections conférées par le droit de la propriété intellectuelle, les demandes titres ou titres (notamment de brevet) en résultant seront pris au nom et aux frais du CHU de Nantes.

• 8.2. Modalités d'exploitation des droits de propriété intellectuelle

Le présent Contrat n'entraîne aucune cession de droit de propriété intellectuelle ou de tout autre droit de propriété détenu par une Partie avant la conclusion du Contrat, à l'autre Partie. Restent notamment la propriété de chacune des Parties son savoir-faire, ses connaissances et méthodes mis en œuvre pour assurer ses obligations.

En tant que propriétaire exclusif, le CHU de Nantes est libre d'exploiter les résultats du Projet sous quelque forme que ce soit.

Article 9. RESPONSABILITE

• 9.1. Responsabilité relative à la réalisation du Projet

Chaque Partie est responsable du bon accomplissement des obligations qui lui incombent dans le cadre du Projet. Chaque Partie répondra des dommages directs qu'elle pourrait causer dans le cadre des Travaux qu'elle réalise.

• 9.2. Responsabilité du fait des personnels

Dans le cadre du Projet, du personnel d'une Partie restant payé par son employeur, peut être amené à se déplacer dans les locaux de l'autre Partie. Le personnel doit alors se conformer au règlement intérieur de l'établissement d'accueil et aux instructions techniques concernant les matériels. Chaque Partie continue toutefois d'assumer à l'égard de son personnel qu'elle rémunère, toutes les obligations sociales et fiscales de l'employeur et d'exercer envers lui toutes les prérogatives administratives de gestion. Chaque Partie assure la couverture de ses personnels respectifs en matière d'accidents du travail et de maladies professionnelles sans préjudice d'éventuels recours contre les tiers responsables.

• 9.3. Responsabilité du fait des Echantillons biologiques humains et des données médicales.

Les Echantillons biologiques humains et les données médicales étant de nature expérimentale, les Parties ne donnent aucune garantie, quant à leur état, activité, utilité, efficacité, pureté, innocuité, non-toxicité, sécurité, quant à leur utilisation, ou conformité à un quelconque but. Le CHU de Nantes en tant que Promoteur du Projet assume la responsabilité des conséquences dommageables du Projet Prévall-DP. Les Parties sont individuellement et non solidairement responsables des dommages directs qu'elles causent respectivement aux personnes dont sont issues les échantillons biologiques et les données (Personnes concernées), ainsi qu'aux biens et aux personnes autres que les Personnes concernées, du fait de la conservation, la préparation et/ou l'utilisation des Echantillons biologiques et/ ou du fait de la constitution de fichiers ou de Traitements de données médicales.

A l'issue du Projet, s'ils ne sont pas épuisés par leurs diverses manipulations, le CHU de Nantes devra détruire les Echantillons biologiques humains mis à disposition par Biofortis selon les règles d'élimination des déchets d'activités de soin à risque infectieux (DASRI) en place au sein de son établissement. A la demande de Biofortis, il devra fournir une attestation de destruction des Echantillons biologiques humains au Responsable de la recherche.

Le CHU devra également détruire toutes les données médicales associées à ces Echantillons biologiques humains dans un délai maximal de 15 ans à compter de la fin de la recherche selon l'autorisation délivrée par la Cnil au CHU de Nantes.

Article 10. Assurance

Chaque Partie déclare être titulaire d'une police responsabilité civile couvrant la réalisation des activités du présent Contrat auprès d'une compagnie d'assurance notoirement connue et solvable contre toute action en responsabilité et en justifiera sur simple demande de l'autre Partie.

Article 11. Durée - résiliation

• 11.1. Durée

Le présent Contrat est conclu pour une durée de trois (3) ans à compter rétroactivement du 1^{er} octobre 2014. Il peut être renouvelé à la fin de cette période par un avenant, signé par les deux (2) Parties, précisant notamment l'objet de cette prolongation.

• 11.2. Résiliation

Résiliation pour cause scientifique, réglementaire ou de force majeure

Le présent Contrat pourra être résilié de plein droit en cas d'arrêt du Projet pour des motifs scientifiques ou thérapeutiques, en cas de demande formulée par les autorités de santé compétentes ou toute cause susceptible de relever de la force majeure.

Résiliation pour inexécution

En cas de manquement, par une Partie à l'une quelconque de ses obligations générées par le présent Contrat, non corrigé dans les trente (30) jours de la première présentation d'une lettre recommandée avec avis de réception envoyée par l'autre Partie lui signifiant ce manquement, la Partie plaignante pourra résilier de plein droit le présent Contrat par l'envoi d'une nouvelle lettre recommandée avec avis de réception signifiant la résiliation à la Partie défaillante. La résiliation prendra effet à compter de la première présentation de cette seconde lettre.

Résiliation en cas de procédure collective

Le contrat est résilié de plein droit si Biofortis fait l'objet d'une liquidation judiciaire avec cessation de l'activité. En vertu de l'article L 622-13 du Code de Commerce, si Biofortis fait l'objet d'une procédure de sauvegarde, de redressement judiciaire ou de liquidation judiciaire avec maintien de l'activité, la résiliation du présent Contrat aura lieu, si le CHU de Nantes adresse une mise en demeure à l'administrateur (ou liquidateur) et que ce dernier soit ne répond pas dans le délai d'un mois, soit décide que les moyens financiers de Biofortis ne lui permettent plus de remplir ses obligations contractuelles.

Effet de la résiliation

L'exercice de la faculté de résiliation ne dispense pas les Parties de remplir les obligations contractées jusqu'à la date de prise d'effet de la résiliation et ce, sous réserve des dommages éventuellement subis par la Partie plaignante du fait de la résiliation anticipée du Contrat. Les Parties s'engagent à se communiquer un résumé des résultats obtenus à ce stade.

Article 12. INDEPENDANCE

Le présent Contrat ne saurait en aucun cas s'étendre, directement ou indirectement, à d'autres opérations industrielles, commerciales ou financières de Biofortis ou du CHU de Nantes, y compris lors de la durée d'exécution du présent Contrat. Hormis ce qui est expressément mentionné dans le présent Contrat, celui-ci ne lie en aucun cas, ni les membres du personnel des services participant au Projet, ni le CHU de Nantes, à Biofortis pour quelque prestation ou avantage que ce soit.

Article 13. CESSION – SOUS TRAITANCE

En qualité d'établissement porteur du Projet, le CHU de Nantes a la faculté de céder toute ou partie des obligations qu'il tient du présent Contrat à un tiers, ou solliciter les prestations d'un sous-traitant. Afin d'assurer la continuité du Projet et son bon déroulement, Biofortis ne pourra en aucune circonstance céder à un tiers les droits et obligations qu'il tient du présent Contrat sans le consentement préalable et écrit du CHU de Nantes et, de la même manière, ne pourra pas sous-traiter tout ou partie des prestations lui incombant sans le consentement préalable et écrit du CHU de Nantes.

Article 14. INTEGRALITE ET LIMITE DU CONTRAT

Le présent Contrat, assorti de ses annexes, exprime l'intégralité des obligations des Parties. Aucune des stipulations des présentes ne peut être modifiée, altérée, complétée, modifiée, ni aménagée, que ce soit en totalité ou en partie, sauf par un écrit signé par les Parties.

Article 15. INVALIDITE D'UNE CLAUSE

Si une ou plusieurs stipulations du présent Contrat étaient tenues pour non valides ou déclarées telles en application d'un traité, d'une loi ou d'un règlement, ou encore à la suite d'une décision définitive d'une juridiction compétente, les autres stipulations garderont toute leur force et leur portée. Les Parties procéderont alors sans délai aux modifications nécessaires en respectant, dans toute la mesure du possible, l'accord de volonté existant au moment de la signature du présent Contrat.

Article 16. LITIGE

Le présent Contrat est soumis au Droit français. Lorsque le Contrat fait l'objet d'une traduction dans une langue étrangère, la version française fait foi. Dans l'hypothèse d'un différend entre les Parties quant à l'application du présent Contrat, à son interprétation ou à son exécution, la Partie demanderesse s'engage à le notifier à l'autre Partie par lettre recommandée avec avis de réception. Si au-delà d'un délai de trente (30) jours, sauf prorogation dudit délai par les Parties, aucune solution amiable n'a abouti, la Partie la plus diligente pourra saisir les juridictions compétentes de Nantes.

En tout état de cause, tout litige s'élevant dans le cadre du présent Contrat ne pourra être porté que devant des juridictions françaises.

Article 17. NOTIFICATION

Toute notification concernant le présent Contrat doit être adressée par une Partie à l'autre Partie par lettre recommandée avec avis de réception et contenir les références du Projet et du Contrat. La date de réception fait foi. Pour rappel, la notification doit être adressée à l'adresse suivante, à savoir :

- Pour le Centre Hospitalier Universitaire de Nantes :
 - CHU de Nantes, Direction des Affaires Médicales et de la Recherche, Département promotion, à l'attention du chef de projet responsable de l'étude RC15_0372, 5 allée de l'Ile Gloriette, 44093 Nantes Cedex 1 et ;
 - Copie au Dr Claire Bernier, Plateforme Transversale d'Allergologie, CHU de Nantes, Hôtel Dieu, place Ricordeau 44093 Nantes Cedex.
- pour Biofortis :

- à l'attention de Mme Cazaubiel, Biofortis, 3 route de la Chatterie, 44800 Saint-Herblain.

Article 18. SIGNATURES

Fait à Nantes en deux exemplaires le 15 octobre 2015

Pour le Centre Hospitalier
Universitaire de Nantes

Pour le Directeur Général
et par délégation,

la Directrice des Affaires
Médicales et de la Recherche

Mme Anne-Claire de REBOUL

Pour Biofortis SAS

Mme Murielle CAZAUBIEL
Managing Director Europe

En présence du Dr Claire BERNIER

Annexe 1 : description du Projet Prévall-DP (résumé)

Titre de l'étude	Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique.
Mots clés	Lymphocyte T régulateur, lymphocyte T double positif, <i>F Prausnitzii</i> , sang périphérique, asthme allergique, rhinite allergique, dermatite atopique.
Promoteur de l'étude	CHU DE NANTES
Investigateur coordonnateur	Dr Bernier Claire
Nombre de centres prévus	1 : CHU de Nantes
Type d'étude	Physiologie, physiopathologie
Planning de l'étude	☐ Durée totale : 2 ans ☐ Démarches réglementaires : 4 mois ☐ Période de recrutement : 1 an ☐ Durée de suivi par patient : 1 jour ☐ Durée des analyses : 8 mois
Design de l'étude	☐ Monocentrique ☐ Transversale ☐ Contrôlée ☐ Non Randomisée ☐ Simple insu
Objectifs de l'étude	<u>Objectif principal</u> : Mise en évidence d'une diminution quantitative des lymphocytes T doubles positifs (CD4+/CD8+) du sang périphérique spécifique de <i>F prausnitzii</i> chez les patients atteints d'asthme allergique, de rhinite allergique et de dermatite atopique ainsi que par rapport aux échantillons contrôles. <u>Objectifs secondaires</u> : - existe-t-il une corrélation entre les taux de lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique et le niveau de contrôle de la maladie allergique ? - la mise en évidence d'un phénotype régulateur après prolifération avec <i>F prausnitzii</i> - existe-t-il une corrélation entre le taux de prolifération des lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique spécifiques de <i>F prausnitzii</i> et le niveau de contrôle de la maladie allergique ? - existe-t-il une prolifération des lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique en présence d'acariens (<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>) ?
Nombre de cas prévisionnel	90 (30 patients par groupes = asthme allergique, dermatite atopique, rhinite allergique)
Calendrier des visites et examens	1 journée à la plateforme transversale d'allergologie pour l'inclusion et le prélèvement, Hôtel Dieu, CHU de Nantes
Critères d'inclusion	<u>Critères d'inclusion communs</u> : • Patient âgé de 18 à 70 ans • Le patient est non-fumeur • Le patient présente un BMI inférieur à 30 kg/m² Le patient ne présente pas de contre-indication à la réalisation de prick test. • Le sujet a donné son accord pour participer à l'étude et la collection • Le sujet est affilié à un régime de sécurité sociale

	<u>Critères d'inclusion spécifiques des patients avec rhinite allergiques :</u> • Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique dûment diagnostiquée selon les critères ARIA (cf annexe 7) • Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique classée persistante légère ou persistante modérée à sévère selon les critères ARIA (cf annexe 7) • Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique non contrôlée selon les critères ARIA avec ou sans traitement. (cf annexe 7) • Le patient présente une rhinite et/ou une conjonctivite imputable à la présence d'acariens • Le patient présente une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif pour le laboratoire <u>Critères d'inclusion spécifiques des patients avec dermatite atopique :</u> • Le patient présente une dermatite atopique (cf grille diagnostique) classée modérée (SCORAD entre 25 et 50) ou sévère (SCORAD > 50). (cf annexe 8) • Le patient doit présenter une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif pour le laboratoire <u>Critères d'inclusion spécifiques des patients avec asthme allergique :</u> • Le patient présente un asthme allergique diagnostiqué selon les critères GINA²¹ (cf annexe 6) • Le patient présente un asthme classé persistant léger à persistant sévère selon les critères GINA²¹ (cf annexe 6) • Le patient présente un asthme partiellement contrôlé ou non contrôlé selon l'ACQ²⁴⁻²⁵ (ACQ>1) avec ou sans traitement. (cf annexe 6) • Le patient doit présenter une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif pour le laboratoire
Critères de non-inclusion	• Le patient est incapable majeur ou majeur protégé • Le patient prend un traitement antimicrobien (antibiotique, antifongique ou antiviral) au long cours pour quelque raison que ce soit • Le patient a été en contact avec une bactérie multi-résistante • Le patient a bénéficié ou bénéficie d'une immunothérapie spécifique • Antécédent de cancer du système hématopoïétique (mastocytose incluse) • Antécédent de déficit immunitaire acquis par le virus HIV. • Le patient présente un déficit immunitaire congénital • Le patient présente une maladie inflammatoire du tube digestif • Le patient présente une maladie auto-immune et/ou inflammatoire qu'elle soit traitée ou non • Le patient a bénéficié d'une transplantation d'organe solide ou d'une greffe de cellules hématopoïétiques • Le patient est toxicomane • Le patient est une femme enceinte ou en âge de procréer sans contraception efficace • Le patient présente une défaillance d'organe sévère aigue ou chronique (insuffisance cardiaque, insuffisance respiratoire, insuffisance hépatique, insuffisance rénale, malabsorption). • Le patient parle difficilement français et/ou comprend difficilement le français • Le patient est dans l'incapacité de suivre le protocole • Le patient refuse la réalisation des prick-test
Critère de jugement principal	Le critère de jugement principal est le pourcentage moyen de lymphocytes T doubles positifs CD4+/CD8+ par rapport aux pourcentages moyen des lymphocytes T totaux (CD3+), des lymphocytes CD4+ et du nombre total d'éléments figurés du sang périphérique par rapport aux échantillons contrôles.

Critères de jugement secondaires	- La présence ou non d'une prolifération en présence de <i>F prausnitzii</i>. - la mise en évidence de marqueurs régulateurs tels que CTLA4, LAG3, CD25 et GITR sur les DP8 après prolifération avec <i>F prausnitzii</i> - Le taux de prolifération moyen des lymphocytes T doubles positifs spécifiques de <i>F prausnitzii</i> en présence de différentes espèces bactériennes dont <i>F prausnitzii</i>. - Evaluation du degré de sévérité de la maladie allergique : - SCORAD pour la dermatite atopique²³ - Sévérité de l'asthme selon l'ACQ²⁴⁻²⁵ - Sévérité de la rhinite allergique selon l'ARIA²² - Le taux de prolifération moyen des lymphocytes T doubles positifs spécifiques d'acariens (<i>Dermatophagoïdes ptérynyssinus</i>).
Etude ancillaire :	Non applicable
Autres évaluations	Non applicable
Analyse statistiques	Les analyses statistiques porteront sur des analyses descriptives de chaque population de lymphocytes T double positifs CD4+/CD8+. Une comparaison des moyennes de ces populations sera effectuée entre les trois groupes de patients et les échantillons contrôles. Des t-tests et des ANOVA permettront de tester les différences entre les groupes.

Annexe 2 : Descriptif des échantillons mis à disposition par Biofortis

Les échantillons fournis par Biofortis proviendront de sa CEBH AC-2013-1792,

Les échantillons proviendront de sujets sains féminins et masculins correspondant aux critères suivants :

Le sujet doit satisfaire aux critères suivants :

- Sujet âgé de 18 à 30 ans (bornes incluses);
- Sujet ayant un IMC compris entre 18 kg/m² à 29.9 kg/m² (bornes incluses) ;
- Sujet avec une fréquence de selles normale et régulière : au moins 3 selles par semaine et pas plus de 3 selles par jour ;
- Sujet non fumeur ou fumeur occasionnel ;
- Sujet présentant un examen clinique et buccal normal à la sélection ;

Le sujet ne doit pas présenter l'un des critères de non-inclusion suivant :

- Sujet ayant des antécédents ou des symptômes actuels d'allergie (rhinite allergique, conjonctivite allergique, asthme allergique, dermatite atopique, allergie alimentaire) ;
- Sujet consommant ou ayant consommé des antimicrobiens (antibiotiques, antifongiques, antiviraux) dans les 3 mois précédents son inclusion dans l'étude ;
- Sujet ayant consommé des prébiotiques et/ou probiotique y compris des yaourts enrichis dans les 3 semaines précédents son inclusion dans l'étude ;
- Sujet suivant un régime alimentaire végétalien.
- Sujet souffrant de troubles du comportement alimentaire type boulimie, anorexie ;
- Sujet ayant modifié sa consommation tabagique dans le mois précédent (arrêt du tabac, sujet ayant commencé à fumer...) ;
- Sujet ayant modifié ses habitudes alimentaires, de vie ou sportives dans les 3 mois précédents l'étude ;
- Sujet ayant consommé de l'alcool de façon excessive (plus de 2 verres par jour pour une femme, plus de 3 verres par jour pour un homme) dans les 7 jours précédents l'inclusion dans l'étude ;
- Sujet consommant de la drogue sous quelque forme que ce soit ;
- Femmes enceintes (ou susceptible de l'être) ou en période d'allaitement ;
- Sujet souffrant d'une pathologie chronique ;
- Sujet souffrant d'une pathologie aiguë au moment de la visite (l'inclusion pourra être décalée) ;
- Sujet ayant un traitement chronique ou aiguë au moment de la visite à l'exception des contraceptifs oraux ;
- Sujet ayant eu un événement médical ou chirurgical majeur ayant nécessité une hospitalisation au cours des 3 derniers mois ;
- Sujet ayant eu une anesthésie générale dans le mois précédent l'étude ;

Annexe 3 : MODALITE DE MISE A DISPOSITION DES ECHANTILLONS DANS LE CADRE DU PROJET

Conditions de la mise à disposition: codage des EBH et Données associées.

Echantillons biologiques mis à disposition pour le Projet :

Nature	Dosage	Forme	Quantité
Sang total	pBMC	Tube EDTA 9ml	2 tubes * 30 sujets
Sang total	Phadiatop	Tube SEC 4ml	1 tube * 75 sujets

Les EBH seront prélevés par Biofortis dans le cadre de son activité et mis à la disposition du CHU de Nantes selon les modalités prévues au présent Contrat et ci-dessous.

Les EBH transmis au CHU de Nantes seront utilisés uniquement dans le cadre du Projet Prévall-DP au CHU de Nantes par l'équipe du Dr Claire BERNIER.

Le transfert ou transport des EBH s'effectuera sous la responsabilité du CHU de Nantes et selon les modalités suivantes :

- moment du transfert (plusieurs dates successives possibles):
 - > Les transferts d'échantillons seront réalisés après chaque visite de sujet, de préférence en début d'après midi, de façon à grouper tous les prélèvements collectés lors des visites du matin.
- conditionnement et acheminement :
 - > Les tubes sont disposés dans un sachet par sujet
 - L'acheminement des sachets vers les laboratoires académiques impliqués dans le projet est organisé par Biofortis:
 - Température de transport: [+2;+8°C]
 - Transporteur: Hemoservices - selon les exigences de la norme UN3373
- adresse du destinataire :
 - > Livraison à l'Institut de Recherche en Santé de l'Université de Nantes
CRCNA IRS-UN UMR Inserm 892/CNRS 6299 8 quai Moncousu BP 70721
44007 Nantes Cedex 1 4ème étage pièce 405
Contact : Mme Vaidye/Adrien Breiman, Pr Lependu et Pr Jottreau
- Rappel des règles de traçabilité :
 - > Chaque sachet contient 2 fiches de liaison - une pour chaque prélèvement/analyse à réaliser.
 - fiche de liaison PBMC : à compléter par l'équipe du Dr Colas à **réception des tubes dans leur laboratoire et à retourner à Biofortis**
 - fiche de liaison Phadiatop : à compléter par l'équipe du Dr Marie Rimbert à **réception des tubes dans leur laboratoire et à retourner à Biofortis**
- **La réception de ces documents permet de s'assurer de la bonne livraison des échantillons dans les laboratoires partenaires.**

Annexe 4

PÔLE DIRECTION GÉNÉRALE ET STRATÉGIE

5, allée de l'Île-Gloriette
44093 Nantes cedex 1

T. 02 40 08 72 42
F. 02 40 08 71 57
direction.generale@chu-nantes.fr

DIRECTEUR GÉNÉRAL
Philippe Sudreau

DIRECTEUR GÉNÉRAL ADJOINT
Hubert Jaspard



Docteur BERNIER Claire
Plateforme transversale d'allergologie
Hôtel Dieu
CHU de Nantes

AFFAIRES MÉDICALES
ET RECHERCHE
Sandrine Delage
DIRECTRICE

T. 02 40 08 72 45
F. 02 40 08 71 58

COMMUNICATION
ET AFFAIRES GÉNÉRALES
Marie Lapostolle
DIRECTRICE

T. 02 40 08 72 42
F. 02 40 08 71 57

PLAN
Gaëlle Néron de Surgy
DIRECTRICE

T. 02 40 08 72 28
F. 02 40 08 72 33

PILOTAGE « ACTIVITÉS -
RESSOURCES » ET
CONTRACTUALISATION INTERNE
Sophie Douté
DIRECTRICE

T. 02 40 08 70 20
F. 02 40 08 71 57

USAGERS, RISQUES ET QUALITÉ
Benjamin Lapostolle
DIRECTEUR

T. 02 40 08 70 90
F. 02 40 08 70 64

Objet : Appel d'offres interne 2014

Affaire suivie par

Anne Omnès

Email : anne.omnes@chu-nantes.fr

Direction des Affaires Médicales et de la Recherche
Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation

Tél. 02.53.48.28.35

Fax. 02.53.48.28.36

PJ : 4

Nantes, le 29 septembre 2014

Chère Consoeur,

Le conseil scientifique s'est réuni le 25 septembre dernier afin d'étudier les projets soumis dans le cadre de l'appel d'offres interne 2014. 17 projets ont été soumis pour une dotation d'environ 500 K€. 14 ont été pré-sélectionnés et 8 ont été retenus.

J'ai le plaisir de vous informer que votre protocole de recherche intitulé :

« Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8αα (DP8α) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique ».

a été retenu par le conseil scientifique avec une dotation de 33 135 €.

Avant d'initier votre projet, vous voudrez bien contacter la DRCI afin de prendre en compte les remarques faites par les experts et les rapporteurs dont vous trouverez les comptes rendus ci-joints.

Je reste à votre disposition et vous prie de croire, Chère Consoeur, en l'assurance de ma considération la meilleure.

S. LE GOUILL
Délégué à la recherche clinique

RAPPORT D'EVALUATION D'UN PROJET DE RECHERCHE CLINIQUE soumis dans le cadre de l'AOI 2014

DELEGATION A LA RECHERCHE CLINIQUE ET A L'INNOVATION DU CHU DE NANTES

Rapport d'évaluation à compléter et à retourner à annick.coulon@chu-nantes.fr pour le **23/09/2014**

INVESTIGATEUR COORDONNATEUR

Nom : BERNIER

Prénom : CLAIRE

Titre du projet de recherche :

Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique.

EVALUATION DES EXPERTISES

Notations :

	Originalité/10	Méthodologie/10	Faisabilité/10	Pertinence & retombées/10	Total/40
Expert 1	9.5	8	9	9.5	36
Expert 2	8	8	8	8	32

Les expertises sont-elles de bonne qualité ?

oui

- les expertises sont-elles concordantes ?

oui

Commentaires

2 expertises d'immunologie de très bonnes qualités avec des remarques très pertinentes et constructives pour une éventuelle amélioration du projet

ETHIQUE

- Le projet soulève-t-il des problèmes éthiques ?

non

Commentaires

Aucun commentaire particulier

MOYENS DEMANDES

Les moyens nécessaires sont-ils correctement identifiés, argumentés, justifiés et adéquats qualitativement et quantitativement ?

- personnels oui

- matériels oui

- fonctionnement oui

Commentaires :

Les moyens mis en œuvre sont parfaitement cohérents, réalistes et argumentés.

1. Originalité et caractère innovant : les résultats escomptés et/ou la méthodologie liée à ce projet peuvent-ils apporter des informations réellement originales par rapport à celles issues des projets déjà publiés et/ou par rapport à des projets déjà existants ?

Note / 10 **9**

Commentaires : (l'absence de justification de la note risque de pénaliser le projet)

Caractère très novateur de cette voie de recherche dans le domaine de l'allergologie (mécanistique de la genèse des maladies atopiques).
Participation active d'une équipe reconnue sur le sujet.

2. Méthodologie: la méthodologie envisagée permettra-t-elle de répondre à la question posée ? Les critères d'inclusion/exclusion, les critères de jugement, le plan expérimental, le calcul d'effectif et le plan d'analyse statistique sont-ils valides ?

Note / 10 **9**

Commentaires : (l'absence de justification de la note risque de pénaliser le projet)

La méthodologie envisagée paraît parfaitement appropriée, tant dans la partie clinique du projet que dans sa partie biologique qui est assurée par une équipe experte de ce domaine. Quelques améliorations possibles, en particulier le nombre de sujets nécessaires serait peut être à augmenter.

3. Faisabilité : Les moyens mis en œuvre sont-ils cohérents et réalistes ? La logistique de ce projet est-elle bien étudiée ? L'équipe dispose-t-elle du background scientifique, des moyens logistiques, humains et matériels et du recrutement suffisants ? Le calendrier est-il détaillé et réaliste ?

Note / 10 **9**

Les moyens mis en œuvre sont parfaitement cohérent et réalistes. La logistique et le calendrier sont réalistes et appropriés.

L'équipe a les moyens et les compétences nécessaires, ainsi qu'un excellent background scientifique.

4. Pertinence/retombées attendues : La question posée a-t-elle un intérêt clinique ? Ce projet pourra-t-il être valorisé par le biais de publications de rang A ou B (SIGAPS) en moins de 5 ans ?

Note / 10 **9**

Commentaires : (l'absence de justification de la note risque de pénaliser le projet)

Grand intérêt clinique avec la compréhension de la genèse des maladies atopiques et donc une amélioration des stratégies de prises en charges de ces maladies en constante augmentation.

En termes de publication, en fonction des résultats obtenus, devrait être valorisé par une ou des publications de rang A ou B.

Quelles principales modifications vous semblent susceptibles d'améliorer ce projet ?

Cf. commentaires expert 2 : commentaire hyperspécialisé en immunologie et très probablement très pertinent pour améliorer le projet

Date du rapport : 19/09/2014

Total : 36 /40

Pondération (/2) par rapport aux expertises externes : 18 /20

Rapport d'évaluation à compléter et à retourner à annick.coulon@chu-nantes.fr pour le 23/09/2014

INVESTIGATEUR COORDONNATEUR :

Nom : BERNIER
Prénom : CLAIRE

Titre du projet de recherche :

Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa(DP8a) spécifique d'une bactérie du microbiote intestinal (Faecalibacterium prausnitzii) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique

EVALUATION DES EXPERTISES

Notations :

	Originalité/10	Méthodologie/10	Faisabilité/10	Pertinence & retombées/10	Total/40
Expert 1	9.5	8	9	9.5	36
Expert 2	8	8	8	8	32

Les expertises sont-elles de bonne qualité ?

☒ oui ☐ non

- les expertises sont-elles concordantes ?

☒ oui ☐ non

Commentaires

Les 2 expertises concordent sur la majorité des commentaires et des notations :
-les compétences et le background scientifique de l'équipe
-la faisabilité et la capacité à mener le projet à son terme
-l'intérêt clinique de la recherche
-les moyens demandés cohérents et réalistes

ETHIQUE

- Le projet soulève-t-il des problèmes éthiques ?

☐ oui ☒ non

Commentaires

MOYENS DEMANDES

Les moyens nécessaires sont-ils correctement identifiés, argumentés, justifiés et adéquats qualitativement et quantitativement ?

- personnels

☒ oui ☐ non

- matériels

☒ oui ☐ non

- fonctionnement

☒ oui ☐ non

Commentaires :

1. Originalité et caractère innovant : les résultats escomptés et/ou la méthodologie liée à ce projet peuvent-ils apporter des informations réellement originales par rapport à celles issues des projets déjà publiés et/ou par rapport à des projets déjà existants ?

Note / 10 **9**

Commentaires : (l'absence de justification de la note risque de pénaliser le projet)

Etude originale dans la mesure où ce type d'étude n'a encore jamais été réalisé. Les DP8 induits par F. prausnitzii sont d'identification récente chez l'homme.
Ce travail permettra une première approche de l'effet d'une dysbiose sur le développement de maladies allergiques.

2. Méthodologie : la méthodologie envisagée permettra-t-elle de répondre à la question posée ? Les critères d'inclusion/exclusion, les critères de jugement, le plan expérimental, le calcul d'effectif et le plan d'analyse statistique sont-ils valides ?

Note / 10 **8**

Commentaires : (l'absence de justification de la note risque de pénaliser le projet)

La méthodologie est en adéquation avec la question posée, tant sur le plan clinique que biologique.
Les critères d'évaluation principal et secondaires sont en cohérence avec les objectifs.
La différence attendue semble très élevée, est-ce pour limiter le NSN pour des pbs de faisabilité ? Et si la différence observée est finalement plus faible, risque de ne pas être en capacité de conclure
Les analyses multivariées seront peut-être difficiles à réaliser au regard des effectifs

3. Faisabilité : Les moyens mis en œuvre sont-ils cohérents et réalistes ? La logistique de ce projet est-elle bien étudiée ? L'équipe dispose-t-elle du background scientifique, des moyens logistiques, humains et matériels et du recrutement suffisants ? Le calendrier est-il détaillé et réaliste ?

Note / 10 **9**

Le projet est clair et détaillé, les moyens demandés et l'organisation du projet sont réalistes.
L'équipe possède un background scientifique et un environnement propices à la bonne réalisation du projet

4. Pertinence/retombées attendues : La question posée a-t-elle un intérêt clinique ? Ce projet pourra-t-il être valorisé par le biais de publications de rang A ou B (SIGAPS) en moins de 5 ans ?

Note / 10 **8**

Commentaires : (l'absence de justification de la note risque de pénaliser le projet)

Intérêt clinique indéniable. Nouvelles possibilités thérapeutiques potentielles en modulant le microbiote intestinal
Nécessiterait la réalisation d'une étude multicentrique plus puissante
Publication de rang A ou B tout à fait possible en fonction des résultats obtenus

Quelles principales modifications vous semblent susceptibles d'améliorer ce projet ?

Date du rapport : /_22_/_09/_2014___ /

Total : 34 /40

Pondération (/2) par rapport aux expertises externes : 34 ? /20



FICHE D'EXPERTISE SCIENTIFIQUE D'UN PROJET DE RECHERCHE CLINIQUE

DELEGATION A LA RECHERCHE CLINIQUE ET A L'INNOVATION DU CHU DE NANTES

Fiche d'expertise AOI 2014 - A compléter et à retourner à annick.coulon@chu-nantes.fr pour le 5 septembre 2014

Titre du projet	Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique »
Référence du projet / date de version	Protocole Prevall DP /BRD
Nom du porteur du projet	Dr Claire Bernier
Nom de l'expert	Expert n° 1
Domaine d'expertise	immunité

Ce formulaire est disponible en version informatique ; vous pouvez agrandir chaque case selon vos besoins.

Nous vous demandons de bien vouloir donner une note de 0 à 10 pour chacun des 4 items que vous trouverez ci-dessous, en argumentant avec des réponses dans les encadrés réservés à cet effet.

1. Originalité et caractère innovant : les résultats escomptés et/ou la méthodologie liée à ce projet peuvent-ils apporter des informations réellement originales par rapport à celles issues des projets déjà publiés et/ou par rapport à des projets déjà existants ?

Note / 10 **9,5**

Commentaires : (l'absence de justification de la note risque de pénaliser le projet)

Les lymphocytes T régulateurs sont impliqués dans le développement des maladies inflammatoires ou allergiques, mais les mécanismes de leur induction sont encore mal connus. L'équipe demandeuse est à l'origine de la description *princeps* d'une sous-population de lymphocytes T régulateurs induits (les DP8a) au contact d'une bactérie intestinale commensale (*F. prausnitzii*) et a montré en 2014 son implication dans le développement des maladies inflammatoires du tube digestif (MICI). Le projet proposé ici vise à rechercher la fréquence et la fonction régulatrice de ces sous-populations DP8 dans des pathologies allergiques. Il s'agit d'un projet très original et dont le caractère innovant pourrait avoir des conséquences thérapeutiques majeures. L'équipe détient l'expertise et l'antériorité dans le domaine.

2. Méthodologie : la méthodologie envisagée permettra-t-elle de répondre à la question posée ? Les critères d'inclusion/exclusion, les critères de jugement, le plan expérimental, le calcul d'effectif et le plan d'analyse statistique sont-ils valides ?

Note / 10 **8**

Commentaires : (l'absence de justification de la note risque de pénaliser le projet)

La méthodologie est en adéquation avec la question posée. Le recueil du sang et les analyses de sous-populations dans les 24h qui suivent le prélèvement devraient permettre de disposer de résultats fiables sur le plan biologique. Les critères cliniques d'inclusion/exclusion sont bien décrits. Les critères de jugement du niveau de contrôle de la maladie (critères de sévérité de la maladie) semblent standards en allergologie (GINA, ARIA, SCORAD). Le plan expérimental, l'effectif à inclure et les analyses statistiques sont en adéquation avec la différence importante (de 40%) qui est attendue entre les patients et les sujets sains. Un nombre de sujets plus important aurait permis de baisser ce seuil de 40% attendu, mais nécessiterait des moyens matériels supplémentaires.



FICHE D'EXPERTISE SCIENTIFIQUE D'UN PROJET DE RECHERCHE CLINIQUE

DELEGATION A LA RECHERCHE CLINIQUE ET A L'INNOVATION DU CHU DE NANTES

3. Faisabilité : Les moyens mis en œuvre sont-ils cohérents et réalistes ? La logistique de ce projet est-elle bien étudiée ? L'équipe dispose-t-elle du background scientifique, des moyens logistiques, humains et matériels et du recrutement suffisants ? Le calendrier est-il détaillé et réaliste ?

Note / 10 **9**

L'équipe de recherche sur laquelle se base l'étude a une antériorité dans le domaine des Treg induits DP8 et son *background* scientifique dans le domaine de l'immunologie clinique est de renommée internationale (Pr. F. Jotereau, U892). L'équipe clinique s'engage à inclure 30 patients par groupe clinique (rhinite allergique, dermatite atopique, asthme allergique) en une année. Ces moyens ainsi que la somme demandée pour l'étude sont réalistes. Le calendrier détaillé et les précisions du protocole montrent que l'étude a été bien anticipée (transport, conservation pour une biocollection, âge des sujets sains, confidentialité de eCRF). Les questions sont claires et simples.

4. Pertinence/retombées attendues : La question posée a-t-elle un intérêt clinique ? Ce projet pourra-t-il être valorisé par le biais de publications de rang A ou B (SIGAPS) en moins de 5 ans ?

Note / 10 **9,5**

Commentaires : (l'absence de justification de la note risque de pénaliser le projet)

La question de l'influence de cellules T régulatrices spécifiques d'une bactérie de la flore commensale intestinale (*F. Prauznitzii*), d'autres bactéries (autres DP8) ou encore d'acariens (*D. pteronyssinus*) dans le développement des pathologies allergiques présente un réel intérêt clinique : i) pour la connaissance du mécanisme d'induction de la maladie, ii) pour concevoir des thérapeutiques ciblées sur l'agent responsable, iii) pour concevoir des thérapeutiques ciblées sur les cellules immunitaires responsables. Si les résultats attendus sont obtenus, le score de publication devrait être bon.

Quelles principales modifications vous semblent susceptibles d'améliorer ce projet ?

Des tests comparatifs des capacités prolifératives des DP8 PBMC frais ou décongelés pourraient être cités ou montrés pour justifier de la faisabilité des analyses un an après congélation.

Si la différence entre les taux de DP8 des patients et les sujets sains n'atteint pas la diminution de 40% attendue, il serait souhaitable d'augmenter le nombre de 30 patients initialement prévus dans chaque groupe ou de privilégier un groupe homogène quant à la gravité de l'atteinte.

Il manque les coordonnées du médecin BioFortis.

Harmoniser dans le texte : on trouve parfois 1 journée par patient et parfois 2 journées.

Les annexes concernant le *Prick test* et le logiciel *FlowJo* annoncés respectivement en pages 22 et 23, ne sont pas fournies.

Date de l'expertise : / 23 / 07 / 2014 /

Total : 36 /40

	FICHE D'EXPERTISE SCIENTIFIQUE D'UN PROJET DE RECHERCHE CLINIQUE DELEGATION A LA RECHERCHE CLINIQUE ET A L'INNOVATION DU CHU DE NANTES
--	--

Fiche d'expertise AOI 2014 - A compléter et à retourner à annick.coulon@chu-nantes.fr pour le 5 septembre 2014

Titre du projet	Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa(DP8a) spécifique d'une bactérie du microbiote intestinal (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique
Référence du projet / date de version	Non renseigné
Nom du porteur du projet	Claire BERNIER
Nom de l'expert	Expert n° 2
Domaine d'expertise	IMMUNOLOGIE

Ce formulaire est disponible en version informatique ; vous pouvez agrandir chaque case selon vos besoins.

Nous vous demandons de bien vouloir donner une note de 0 à 10 pour chacun des 4 items que vous trouverez ci-dessous, en argumentant avec des réponses dans les encadrés réservés à cet effet.

1. Originalité et caractère innovant : les résultats escomptés et/ou la méthodologie liée à ce projet peuvent-ils apporter des informations réellement originales par rapport à celles issues des projets déjà publiés et/ou par rapport à des projets déjà existants ?

Note / 10

8

Ce projet est susceptible d'apporter des arguments, chez l'homme, en faveur du rôle, dans le contrôle des maladies atopiques, d'une population de lymphocytes T régulateurs (Treg) CD4+CD8αα+ (DP8a). Cette population a été récemment décrite par l'équipe d'un des investigateurs de ce projet (F Jotereau) (Sarabayrouse *et al.*, PlosBiol, 2014).

De plus, ce travail pourrait apporter un élément original concernant l'effet du microbiome digestif sur la propension à développer des maladies allergiques et du rôle de ce microbiome dans la génération des lymphocytes T DP8a. Enfin, ce travail apporterait des arguments en faveur d'un rôle systémique de ces cellules T DP8a. En effet, le groupe de F Jotereau avait montré que les lymphocytes T DP8a sont générés dans la muqueuse colique et mis en évidence l'implication de ces cellules dans le déterminisme des maladies inflammatoires de l'intestin et du colon. Il reste donc à identifier d'autres affections inflammatoires ou autoimmunes où ces cellules sont susceptibles d'intervenir. L'ensemble de ces éléments permet de conclure que l'hypothèse du rôle des lymphocytes T DP8a dans le déterminisme des maladies allergiques est très séduisante.

FICHE D'EXPERTISE SCIENTIFIQUE D'UN PROJET DE RECHERCHE CLINIQUE

DELEGATION A LA RECHERCHE CLINIQUE ET A L'INNOVATION DU CHU DE NANTES

2. Méthodologie: la méthodologie envisagée permettra-t-elle de répondre à la question posée ? Les critères d'inclusion/exclusion, les critères de jugement, le plan expérimental, le calcul d'effectif et le plan d'analyse statistique sont-ils valides ?

Note / 10 **8**

Commentaires : (l'absence de justification de la note risque de pénaliser le projet)

La méthodologie envisagée paraît parfaitement appropriée, tant dans la partie clinique du projet que dans sa partie biologique qui est assurée par une équipe experte de ce domaine.

Concernant la partie clinique du projet, les critères d'inclusion/exclusion et les critères de jugement paraissent appropriés.

En ce qui concerne la partie biologique du projet et le plan expérimental ils correspondent aux meilleurs choix actuels dans ce domaine de l'immunologie cellulaire.

Le choix des méthodes statistiques envisagées aurait mérité d'être un peu plus détaillé. Le choix de la taille de l'effectif est soigneusement présenté et parfaitement cohérent, mais peut se révéler un peu juste si l'effet obtenu chez les patients allergiques est moins important qu'escompté.

3. Faisabilité : Les moyens mis en œuvre sont-ils cohérents et réalistes ? La logistique de ce projet est-elle bien étudiée ? L'équipe dispose-t-elle du background scientifique, des moyens logistiques, humains et matériels et du recrutement suffisants ? Le calendrier est-il détaillé et réaliste ?

Note / 10 **8**

Les moyens mis en œuvre sont parfaitement cohérent et réalistes. La logistique et le calendrier proposé paraissent réalistes et appropriés.

Comme déjà dit ci-dessus, l'équipe a les moyens et les compétences nécessaires, ainsi qu'un excellent background scientifique.

4. Pertinence/retombées attendues : La question posée a-t-elle un intérêt clinique ? Ce projet pourra-t-il être valorisé par le biais de publications de rang A ou B (SIGAPS) en moins de 5 ans ?

Note / 10 **8**

Commentaires : (l'absence de justification de la note risque de pénaliser le projet)

La question posée correspond à une recherche cognitive et translationnelle de qualité qui permet de tester une hypothèse mécanistique importante dans la genèse des maladies atopiques mettant en jeu l'influence du microbiome digestif (déjà discutée et clairement identifiée dans des modèles murins) et une ou des populations de lymphocytes Treg. Son intérêt clinique n'est pas direct, mais contribuera à l'identification de nouvelles cibles dans la prise en charge et/ou le traitement de ces patients. En fonction des résultats de cette étude, une étude plus puissante éventuellement multicentrique pourrait être envisagée afin d'en déterminer la pertinence clinique en terme/diagnostique et ou pronostique.

En termes de publication ce projet, en fonction des résultats obtenus, devrait être valorisé par une ou des publications de rang A ou B.

	FICHE D'EXPERTISE SCIENTIFIQUE D'UN PROJET DE RECHERCHE CLINIQUE
--	---

	DELEGATION A LA RECHERCHE CLINIQUE ET A L'INNOVATION DU CHU DE NANTES
--	--

Quelles principales modifications vous semblent susceptibles d'améliorer ce projet ?

Une comparaison avec une population de cellules Treg conventionnelles exprimant FoxP3 dans cette cohorte de patient devrait être envisagée. Dans l'optique d'une publication ultérieure une comparaison des lymphocytes T DP8a avec les cellules Treg « conventionnelles » pourrait être demandé. Sur un plan cognitif se pose la question d'une filiation entre ces deux populations de lymphocytes Treg.

Sur un plan cognitif concernant les lymphocytes T DP8a se posent deux questions qui pourraient être abordé au moins en partie dans cette étude :

- Parmi les critères phénotypiques envisagés pour caractériser les cellules Treg DP8a, il pourrait être intéressant d'associer l'étude de l'analogue humain de GPR43, qui chez la souris intervient dans la différenciation des lymphocytes Treg (CD4+ CD25+ FoxP3+) (Smith *et al.*, Science, 2013).
- De même parallèlement à la stimulation des lymphocytes T CD4 de patients ou de sujets sains, il pourrait être intéressant de tester l'effet d'acide gras à courtes chaînes (acide butyrique, acide propionique) sur la prolifération et le phénotype des lymphocytes Treg conventionnels et DP8a.

Date de l'expertise : /04 /09 /2014 /

Total : 32 /40

Annexe 5



Les ATELIERS du DHU 2020

Médecine personnalisée des maladies chroniques

RAPPORT D'EXPERTISE PROJET COLLABORATIF ATELIER ALLERGIES

TITRE DU PROJET :

Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique.

NOM DU DEMANDEUR 1 :

Luc Colas

NOM DU DEMANDEUR 2 :

Francine Jotereau

EVALUATEUR : 1

Merci de répondre aux items suivant et donner une note de A à D lorsque nécessaire, en argumentant éventuellement avec des réponses très courtes (4 lignes au maximum) dans les encadrés réservés à cet effet

1 – Les coordonnateurs/demandeurs ont-ils été présent lors de l'Atelier ?

Oui ☐

Non ☐

Je ne sais pas

2 – ORIGINALITE DU PROJET : les résultats escomptés et/ou la méthodologie de l'étude peuvent-ils apporter des informations originales par rapport à celles issues des études déjà publiées

Oui. Aucun lien n'existe aujourd'hui entre les taux de DP8 et les maladies allergiques

Note : A ☐ B X C ☐ D ☐

A : excellent, B : bon, C : moyen, D : insuffisant

3 – INTERDISCIPLINARITE/ ASPECT COLLABORATIF DU PROJET : l'aspect collaboratif et/ou interdisciplinaire du projet est-il développé convenablement ? Les compétences des partenaires paraissent-elles adaptées au projet ?

RAPPORT D'EXPERTISE PROJET COLLABORATIF
ATELIER ALLERGIES

Une attention particulière doit être portée aux propositions mettant en avant l'interface soins - recherche et soins - recherche – SHS (les projets peuvent intéresser la recherche clinique, la recherche fondamentale, la recherche en SHS).

Collaboration entre les équipes de recherche et les services hospitaliers. Les compétences des partenaires sont parfaitement adaptées à la réalisation du projet.

Note : A ☒ **B** ☐ **C** ☐ **D** ☐

A : excellent, B : bon, C : moyen, D : insuffisant

4 – METHODOLOGIE DU PROJET : les critères de jugement, la stratégie générale de l'étude et les moyens utilisés paraissent-ils bien adaptés pour répondre à la question posée ?

Au regard du projet, cette étude sera basée sur la constitution d'une population d'étude de 120 patients. Il n'est pas précisé si les accords sont déjà en cours de validation ou s'ils sont déjà obtenus. De même, combien de temps faudra-t'il pour obtenir l'ensemble des prélèvements? Est-ce compatible avec la durée d'étude de 24 mois (accord+recrutements/prélèvements+analyses)?

Selon les porteurs du projet, cette étude permettra notamment de mettre en évidence un des mécanismes cellulaires impliqués dans le lien entre dysbiose et maladies allergiques. Je ne comprends pas comment les porteurs de ce projet pourront répondre à cette question avec les éléments inscrits dans le document. Il me semble que cette étude permettra d'identifier potentiellement un bio-marqueur

Note : A ☐ **B** ☐ **C** ☒ **D** ☐

A : excellent, B : bon, C : moyen, D : insuffisant

RAPPORT D'EXPERTISE PROJET COLLABORATIF
ATELIER ALLERGIES

5 – ADEQUATION AUX OBJECTIFS DU DHU2020 : L'adéquation aux objectifs de DHU2020 (dhu2020.org) est-elle suffisamment mise en avant dans la proposition, et justifiée ?

Oui, parfaitement

Note : A ☒ **B** ☐ **C** ☐ **D** ☐

A : excellent, B : bon, C : moyen, D : insuffisant

6 – ADEQUATION DU FINANCEMENT DEMANDE : Le budget demandé est-il en adéquation avec le projet ? Le budget demandé fait-il partie d'un co-financement ? Si oui, le financement demandé au DHU2020 représente t-il une part assez visible sur le cout global du projet ?

Le budget demandé fait partie d'un co-financement. Oui le financement demandé au DHU2020 représente une part visible sur le cout global du projet.

Note : A ☐ **B** ☒ **C** ☐ **D** ☐

A : excellent, B : bon, C : moyen, D : insuffisant

RAPPORT D'EXPERTISE PROJET COLLABORATIF
ATELIER ALLERGIES

TITRE DU PROJET :

NOM DU DEMANDEUR 1 : Luc Colas

NOM DU DEMANDEUR 2 : Francine Jotereau

EVALUATEUR : 2

Merci de répondre aux items suivant et donner une note de A à D lorsque nécessaire, en argumentant éventuellement avec des réponses très courtes (4 lignes au maximum) dans les encadrés réservés à cet effet

1 – Les coordonnateurs/demandeurs ont-ils été présent lors de l'Atelier ?

Oui ☐ ? Non ☐ ?

2 – ORIGINALITE DU PROJET : les résultats escomptés et/ou la méthodologie de l'étude peuvent-ils apporter des informations originales par rapport à celles issues des études déjà publiées

Il s'agit d'une étude clinique transversale, contrôlée et en simple insu, très originale puisqu'elle évalue pour la première fois chez des patients allergiques, l'implication d'une sous-population lymphocytaire nouvellement identifiée par l'équipe du demandeur 2 et dirigée contre une bactérie du microbiote intestinal.

Note : A

A : excellent, B : bon, C : moyen, D : insuffisant

RAPPORT D'EXPERTISE PROJET COLLABORATIF
ATELIER ALLERGIES

3 – INTERDISCIPLINARITE/ ASPECT COLLABORATIF DU PROJET : l'aspect collaboratif et/ou interdisciplinaire du projet est-il développé convenablement ? Les compétences des partenaires paraissent-elles adaptées au projet ?

Une attention particulière doit être portée aux propositions mettant en avant l'interface soins - recherche et soins - recherche – SHS (les projets peuvent intéresser la recherche clinique, la recherche fondamentale, la recherche en SHS).

Ce projet est un bel exemple de recherche translationnelle mettant en application des données de recherche fondamentale grâce à la collaboration entre un chercheur en immunologie-infectiologie et des cliniciens allergologues. Les compétences entre les partenaires sont donc parfaitement adaptées.

Note : A

A : excellent, B : bon, C : moyen, D : insuffisant

4 – METHODOLOGIE DU PROJET : les critères de jugement, la stratégie générale de l'étude et les moyens utilisés paraissent-ils bien adaptés pour répondre à la question posée ?

Les nombres de patients et de sujets contrôles sont prévus pour atteindre une significativité statistique. Les critères de jugement sont adaptés puisqu'ils s'agit de mesurer les taux sanguins de la population lymphocytaire cibles (DP CD4/8) par cytométrie en flux et dans un deuxième temps de les corrélés à la réactivité contre la souche bactérienne (F. prauznitzii) cible. Les moyens sont donc adaptés à la question posée.

Note : A

A : excellent, B : bon, C : moyen, D : insuffisant

RAPPORT D'EXPERTISE PROJET COLLABORATIF
ATELIER ALLERGIES

5 – ADEQUATION AUX OBJECTIFS DU DHU2020 : L'adéquation aux objectifs de DHU2020 (dhu2020.org) est-elle suffisamment mise en avant dans la proposition, et justifiée ?

Ce projet met en avant son aspect structurant, la constitution d'une cohorte de patients allergiques et le transfert des découvertes fondamentales à la clinique. Ce projet est en adéquation avec les objectifs du DHU2020 puisqu'il associe la recherche fondamentale aux activités de soins. Il permettrait de valider un nouveau biomarqueur en allergologie.

Note : A

A : excellent, B : bon, C : moyen, D : insuffisant

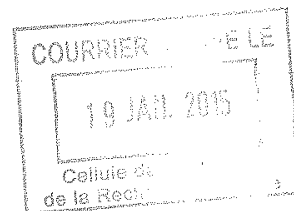
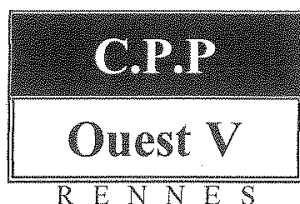
6 – ADEQUATION DU FINANCEMENT DEMANDE : Le budget demandé est-il en adéquation avec le projet ? Le budget demandé fait-il partie d'un co-financement ? Si oui, le financement demandé au DHU2020 représente t-il une part assez visible sur le cout global du projet ?

Le budget demandé de 15 000€ pour une durée de 24 mois est adapté. Néanmoins, ce budget inclut des actes infirmiers (3415€) alors qu'il bénéficie déjà d'un co-financement du CHU de Nantes de 33 135€. On peut se demander s'il n'y a pas doublon dans ce financement. De plus, un co-financement de 35 300€ est demandé à la société Stallergènes. Le budget total serait alors de 83 435 € ce qui me paraît très élevé.

Note : B

A : excellent, B : bon, C : moyen, D : insuffisant

Annexe 6



CHU de Nantes
M. Maxime LEBEAUPIN
Direction de la recherche
Département Promotion
5 allée de l'île Gloriette
44093 NANTES Cedex 01

Rennes, le vendredi 9 janvier 2015

Nos réf. : 15/02-964.
Vos réf. : RC14_0372.
N° d'enregistrement : 2014-A01759-38.
Type de recherche : Soins courants.

Objet : Votre demande d'avis au CPP Ouest V.

Monsieur,

Vous avez sollicité l'avis du Comité de protection des personnes Ouest V au sujet du projet de recherche suivant :

Prévall-DP : Étude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (Faecalibacterium prausnitzii) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique.

Promoteur : CHU de Nantes.
Investigateur coordonnateur : Docteur Claire BERNIER.

Vu les dispositions du code de la santé publique,

Vu les documents fournis par le promoteur :

1. Courrier de demande d'avis au CPP daté et signé du 15/12/2014,
2. Formulaire de demande d'avis au comité de protection des personnes pour une recherche visant à évaluer les soins courants mentionnée au 2° de l'article L. 1121-1 du code de la santé publique daté et signé du 15/12/2014,
3. Document permettant au comité de protection des personnes de s'assurer que le projet de recherche soumis porte sur l'évaluation des soins courants daté et signé du 15/12/2014,
4. Protocole Prévall DP (version du 15/12/2014),
5. Résumé RC14_0372-Prévall DP,
6. Note d'information pour la participation à la recherche,
7. Constitution d'une collection d'échantillons pour un programme de recherche intitulé : « Génétique et biomarqueurs des pathologies cardiovasculaires, respiratoires et leurs facteurs de risques » (date d'application : 02/04/2014),
8. Document de consentement pour la conservation et l'utilisation d'échantillons biologiques humains,
9. CV de l'investigateur coordonnateur : Docteur Claire BERNIER,
10. CV du Dr Anaïs PIPET.

COMITÉ DE PROTECTION DES PERSONNES (C.P.P.) - OUEST V - RENNES

CHU Pontchaillou - 9, avenue de la Bataille Flandre Dunkerque - 35000 - RENNES
Tél. : 02 99 28 25 56 - Fax : 02 99 28 98 93
Courriel : cpp.ouestV@chu-rennes.fr
Site internet : <http://cppouestv.fr/>

Après étude de votre dossier et au vu des rapports présentés en séance le mardi 06 janvier 2015, le comité a souhaité obtenir des informations complémentaires et que plusieurs modifications soient apportées au dossier avant de vous délivrer son avis.

Voici les remarques et questions qui nous ont interpellés :

▪ **Sur le protocole :**

1. S'agissant d'une recherche visant à évaluer les soins courants, justifier la non-inclusion des patients bénéficiant d'une AME.
2. Préciser l'articulation du recrutement entre les allergologues de ville et le centre hospitalier investigateur ? Les prick-test seront-ils réalisés en ville ou bien contrôlés à l'hôpital ?
3. Ajouter au protocole les annexes 12, 13 et 14 mentionnées en page 18 (non présentes dans le dossier soumis au CPP).
4. A la page 19, corriger les références au paragraphe 6.1.2 qui apparaissent inexactes.
5. Préciser les modalités de conservation des documents et des données relatives à la recherche.

▪ **Sur la lettre d'information et de consentement :**

6. Dans l'introduction et la partie 2, remplacer la phrase : « Cette recherche a pour but de mettre en évidence que certains globules blancs (lymphocytes T) présentant une spécificité de par les signaux qu'ils ont à leur surface (CD4/CD8αα) sont diminués dans le sang de patients porteurs de pathologies allergiques telles que l'asthme allergique, la rhinite allergique et la dermatite atopique par rapport à des personnes non allergiques. » **par** « Cette recherche a pour but de mettre en évidence que certains globules blancs spécifiques (lymphocytes T présentant des signaux de surface spécifiques – CD4/CD8αα) sont diminués dans le sang de patients porteurs de pathologies allergiques (asthme allergique, rhinite allergique et dermatite atopique) par rapport à des personnes non allergiques. »
7. A la page 1/3, corriger la mention « il vous sera demandé d'attester » dans la mesure où le patient ne signe pas de document.
8. Harmoniser les quantités de sang prélevé entre le protocole (p.18) et le document d'informations (p.2) : prélèvement de 30 ou 40 ml ?
9. A la page 2/3, remplacer « 120 » par « 90 » puisque les sujets sains (non allergiques) ne sont pas « inclus » en tant que tels dans l'étude mais issus d'une collection mise à disposition par Biofortis (AC-2013-1792).
10. Dans la partie 3, préciser les risques associés à la prise de sang supplémentaire.
11. Enlever la référence au représentant légal puisque les majeurs protégés et les mineurs ne seront pas inclus dans l'étude.

▪ **Sur le formulaire de constitution de la collection :**

12. Harmoniser le nom de la collection avec celui mentionné dans le protocole (p30).

COMITÉ DE PROTECTION DES PERSONNES (C.P.P) - OUEST V - RENNES

CHU Pontchaillou - 9, avenue de la Bataille Flandre Dunkerque - 35000 - RENNES

Tél. : 02 99 28 25 56 - Fax : 02 99 28 98 93

Courriel : cpp.ouestV@chu-rennes.fr.

Site internet : <http://cppouestv.fr/>.

Ont participé à l'examen du dossier lors de cette séance :

	Catégorie	Titulaires	Suppléants
1 ^{er} collège	Recherche biomédicale	M. Laurent PASQUIER M. Jean-Michel REYMANN (compétence en matière biostatistique)	Mme Elisabeth POLARD
	Médecins généralistes		
	Pharmaciens hospitaliers	M. Loïc JAVAUDIN	Mme Béatrice MARIE DIT DINARD
	Personnels infirmiers	Mme Hervelyne ROPERT	
2 ^{ème} collège	Personnes qualifiées en matière d'éthique	Mme Marie-Noëlle BELLOIR	
	Psychologues	M. Benoît LORNE	
	Travailleurs sociaux	Mme Lénaïk LE BARTZ-LE FAUCHEUR	
	Personnes qualifiées en matière juridique	Mme Gaëlle COSTIOU	Mme Anne LE LOUARN
	Représentants des associations agréées de malades et d'usagers du système de santé	Mme Nicole LEFORESTIER	Mme Francine LAIGLE

Veuillez agréer, Monsieur, l'expression de nos meilleures salutations.

Gaëlle COSTIOU
Présidente du C.P.P. Ouest V

Comité de Protection des Personnes
CPR - Ouest V - Rennes
CHU Pontchaillou
9, avenue Bataille Flandre Dunkerque
35033 RENNES Cedex 09
Tél. 02 99 28 25 56 - Fax 02 99 28 98 93
cpp.ouestv@chu-rennes.fr

**Merci de bien vouloir adresser toutes vos correspondances à l'adresse ci-dessous
et de mentionner la référence CPP.**

COMITÉ DE PROTECTION DES PERSONNES (C.P.P.) - OUEST V - RENNES

CHU Pontchaillou - 9, avenue de la Bataille Flandre Dunkerque - 35000 - RENNES

Tél. : 02 99 28 25 56 - Fax : 02 99 28 98 93

Courriel : cpp.ouestv@chu-rennes.fr.

Site internet : <http://cppouestv.fr/>.

DIRECTEUR GÉNÉRAL
Philippe Sudreau

DIRECTEUR GÉNÉRAL ADJOINT
Hubert Jaspard

**Comité de Protection des Personnes Ouest V
CHU Pontchaillou
Madame la Présidente
9 avenue de la bataille Flandres-Dunkerque
35033 Rennes cedex 9**

**AFFAIRES MÉDICALES
ET RECHERCHE**

Hubert Jaspard
DIRECTEUR (PAR INTERIM)

T. 02 40 08 72 42

F. 02 40 08 71 57

**COMMUNICATION
ET AFFAIRES GÉNÉRALES**

Marie Lapostolle
DIRECTRICE

T. 02 40 08 72 42

F. 02 40 08 71 57

**PLAN ET PROJET NOUVEL
HÔPITAL « ILE DE NANTES »**

Gaëlle Néron de Surgy
DIRECTRICE

T. 02 40 08 72 28

F. 02 40 08 72 33

**PILOTAGE « ACTIVITÉS -
RESSOURCES » ET
CONTRACTUALISATION INTERNE**

Sophie Douté
DIRECTRICE

T. 02 40 08 70 20

F. 02 40 08 71 57

USAGERS, RISQUES ET QUALITÉ

Benjamin Lapostolle

DIRECTEUR

T. 02 40 08 70 90

F. 02 40 08 70 64

Objet: Soumission du protocole de recherche en soins courants « Prévall-DP ».

Affaire suivie par :

Maxime Lebeaupin

maxime.lebeaupin@chu-nantes.fr

Direction des affaires médicales et de la recherche

Direction de la recherche

Département promotion

Tél. 02.53.48.28.18

RC14_0472

Réf CPP : 15/02-964

PJ : 2

Nantes, le 19/01/2015

Madame la Présidente,

Le CHU de Nantes a soumis le protocole « Prévall-DP » dont le Dr Claire Bernier est l'investigateur coordonnateur au Comité de Protection de Personnes Ouest V. L'expertise du protocole nécessite la transmission préalable de précisions. Le Dr Bernier propose les réponses suivantes aux questions du Comité :

Sur le protocole

1. Justification de la non-inclusion des patients bénéficiant d'une AME :

Les patients bénéficiant de l'AME ont été exclus initialement car le protocole avait été écrit suivant les critères de la recherche biomédicale (RBM). Cependant, la recherche a été requalifiée en soins courants. Ce critère n'a donc plus aucun sens.

Cependant, ces patients présentent souvent une barrière de la langue (étrangers en situation irrégulière ou en demande d'asile). De plus, ces patients peuvent être sans domicile fixe ou bien itinérants (gens du voyage par exemple). La conséquence est que bien souvent ils n'accèdent pas à des consultations spécialisées (en cabinet ou à l'hôpital) mais à la PASS.

Dans tous les cas, ce critère doit être supprimé et remplacé par :

- Le patient parle difficilement français et/ou comprend difficilement le français.*

2. Préciser l'articulation du recrutement entre les allergologues de ville et le centre hospitalier investigateur ? Les prick-test seront-ils réalisés en ville ou bien contrôlés à l'hôpital ?

Certains allergologues libéraux faisant parti du réseau REAL2 (Réseau Allergie Respiratoire et Alimentaire) ont accepté de participer à l'étude Prévall DP. Leur rôle sera de repérer les patients admissibles (vérification les critères d'inclusion et de non-inclusions) afin de leur présenter l'étude.

Dans le cas où le patient souhaite participer à l'étude, le médecin allergologue redirigera le patient vers la Plateforme Transversale d'Allergologie pour réaliser l'inclusion dans l'étude. Il a été mis en place à la plateforme transversale d'allergologie

des plages de consultation spécifique pour l'inclusion des patients envoyés par les médecins allergologues libéraux.

Au cours de ses consultations, il sera:

- *vérifié les critères d'inclusion et de non-inclusion*
- *expliqué l'étude au patient*
- *vérifié le recueil de la non-opposition à l'étude et de la constitution de la bio-collection.*
- *effectué le prélèvement sanguin.*

Une réunion d'information à propos de l'étude est prévue avec les allergologues libéraux le 5 février 2015. Il sera également mis à leur disposition une plaquette pré-imprimée avec un rappel du titre de l'étude, des objectifs de l'étude, des critères d'inclusion et de de non-inclusion et du numéro du secrétariat de la PFTA pour prendre les RDV d'inclusion.

En ce qui concerne les prick-test et/ou les dosages spécifiques d'IgE, il sera demandé aux allergologues libéraux de fournir un compte-rendu de leur consultation avec un double des prick-tests aux aéro-allergènes et/ou des dosages spécifiques IgE car ces derniers ne seront pas contrôlés à la PFTA pour les patients adressés par les allergologues libéraux puisqu'il s'agit d'une recherche en soins courants.

NB : Les comptes-rendus de consultation et des examens pratiqués (prick-tests, dosages spécifiques IgE, EFR, test de provocation) doivent être archivés dans le dossier médical du patient par obligation médico-légale.

3. Ajouter au protocole les annexes 12, 13 et 14 mentionnées en page 18 (non présentes dans le dossier soumis au CPP).

Ces annexes ont été supprimées du protocole. En effet, il s'agit de protocoles détaillés des analyses effectuées en laboratoire qui n'apportent aucune information pertinente.

4. En p. 19, corriger les références au paragraphe 6.1.2 qui apparaissent inexactes.

Les références mentionnaient en réalité le paragraphe 5.1.2.

5. Préciser les modalités de conservation des documents et des données relatives à la recherche.

Sur la lettre d'information et de consentement

6. Dans l'introduction et la partie 2, la phrase « Cette recherche a pour but de mettre en évidence que certains globules blancs spécifiques (lymphocytes T présentant des signaux de surface spécifiques - CD4/CD8αα) sont diminués dans le sang de patients porteurs de pathologies allergiques (asthme allergique, rhinite allergique et dermatite atopique) par rapport à des personnes non allergiques. » remplace « Cette recherche a pour but de mettre en évidence que certains globules blancs (lymphocytes T) présentant une spécificité de par les signaux qu'ils ont à leur surface (CD4/CD8αα) sont diminués dans le sang de patients porteurs de pathologies allergiques telles que l'asthme allergique, la rhinite allergique et la dermatite atopique par rapport à des personnes non allergiques. »

7. A la page 1/3, corriger la mention « il vous sera demandé d'attester » dans la mesure où le patient ne signe pas de document

La phrase « Si vous décidez de participer à cette recherche, il vous sera demandé d'attester de votre non-opposition auprès du médecin de l'étude qui confirmera que vous êtes d'accord pour participer à la recherche. » est remplacée par « Si vous

acceptez de participer à cette recherche, le médecin de l'étude confirmera votre accord en attestant du recueil de votre non-opposition.

8. Harmoniser les quantités de sang prélevé entre le protocole (p.18) et le document d'information (p.2) : prélèvement de 30 ou 40ml ?

La quantité de sang prélevée sera de 40mL.

L'erreur dans la lettre d'information a été corrigée.

9. En p. 2/3, remplacer « 120 » par « 90 » puisque les sujets sains (non allergiques) ne sont pas « inclus » en tant que tels dans l'étude mais issus d'une collection mise à disposition par Biofortis (AC-2013-1792).

L'erreur a été corrigée dans la lettre d'information et de recueil de non-opposition

10. Dans la partie 3, préciser les risques associés à la prise de sang supplémentaire

L'insertion suivante est proposée dans la lettre d'information :

Lors de la prise de sang, les risques liés à la ponction veineuse sont très faibles (hématome, saignement au point de ponction, malaise vagal)

11. Enlever la référence au représentant légal puisque les majeurs ou les mineurs protégés ne seront pas inclus dans l'étude.

La référence au représentant légal est retirée à juste titre du protocole.

Sur le formulaire de constitution de la collection

12. Harmoniser le nom de la collection avec celui mentionné dans le protocole (p.30).

L'intitulé de la collection en p.30 du protocole est harmonisé avec le titre apparaissant sur le formulaire d'information-consentement collection.

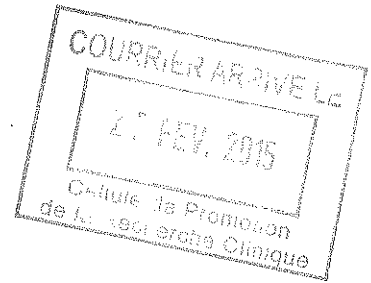
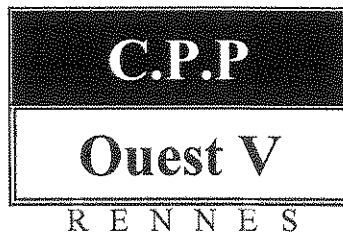
Nous vous prions de bien vouloir trouver sous ce pli un exemplaire des deux documents actualisés à la date du 23 janvier 2015 : le protocole et la lettre d'information pour la participation à la recherche en soins courants.

Les modifications sont surlignées en gris.

Nous vous en souhaitons bonne réception.

Nous restons à votre disposition et vous prions de croire, Madame la Présidente, en l'assurance de notre considération la meilleure.

A. OMNES,
Responsable Département promotion



CHU de Nantes
M. Maxime LEBEAUPIN
Direction de la recherche
Département Promotion
5 allée de l'île Gloriette
44093 NANTES Cedex 01

Rennes, le mardi 24 février 2015

Nos réf. : 15/02-964.
Vos réf. : RC14_0372.
N° d'enregistrement : 2014-A01759-38.
Type de recherche : Soins courants.

Objet : Votre demande d'avis au CPP Ouest V.

Monsieur,

Vous avez sollicité l'avis du Comité de protection des personnes Ouest V au sujet du projet de recherche suivant :

Prévall-DP : Étude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (Faecalibacterium prausnitzii) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique.

Promoteur : CHU de Nantes.
Investigateur coordonnateur : Docteur Claire BERNIER.

Vu les dispositions du code de la santé publique,

Vu les documents initialement soumis au comité pour le 1^{er} passage de votre dossier en séance le mardi 06 janvier 2015 :

1. Courrier de demande d'avis au CPP daté et signé du 15/12/2014,
2. Formulaire de demande d'avis au comité de protection des personnes pour une recherche visant à évaluer les soins courants mentionnée au 2° de l'article L. 1121-1 du code de la santé publique daté et signé du 15/12/2014,
3. Document permettant au comité de protection des personnes de s'assurer que le projet de recherche soumis porte sur l'évaluation des soins courants daté et signé du 15/12/2014,
4. Protocole Prévall DP (version du 15/12/2014),
5. Résumé RC14_0372-Prévall DP,
6. Note d'information pour la participation à la recherche,
7. Constitution d'une collection d'échantillons pour un programme de recherche intitulé : « Génétique et biomarqueurs des pathologies cardiovasculaires, respiratoires et leurs facteurs de risques » (date d'application : 02/04/2014),
8. Document de consentement pour la conservation et l'utilisation d'échantillons biologiques humains,
9. CV de l'investigateur coordonnateur : Docteur Claire BERNIER,
10. CV du Dr Anaïs PIPET.

COMITÉ DE PROTECTION DES PERSONNES (C.P.P.) - OUEST V - RENNES

CHU Pontchaillou - 9, avenue de la Bataille Flandre Dunkerque - 35000 - RENNES

Tél. : 02 99 28 25 56 - Fax : 02 99 28 98 93

Courriel : cpp.ouestv@chu-rennes.fr.

Site internet : <http://cppouestv.fr/>.

Vu les documents complémentaires ou modifiés soumis en réponse aux demandes du comité :

1. Courrier de réponses aux remarques du CPP daté et signé du 26/01/2015,
2. Protocole Prévall DP (version du 21/02/2015), avec et sans modifications apparentes,
3. Note d'information pour la participation à la recherche, avec et sans modifications apparentes.

Après étude de votre dossier et au vu des rapports présentés en séance, le 6 janvier 2015, le comité a considéré que les conditions de mise en œuvre prévues étaient satisfaisantes, que le rapport bénéfices / risques était acceptable et que l'information des patients était adaptée.

Le Comité de Protection des Personnes Ouest V a émis un **avis favorable** à la mise en œuvre de votre projet de recherche.

A l'occasion d'une prochaine modification substantielle, le CPP souhaite que les modalités d'archivages soient précisées dans le protocole.

De plus, merci de bien indiquer, pour chaque document, son numéro de version et sa date.

Ont participé à l'examen du dossier lors de cette séance :

	Catégorie	Titulaires	Suppléants
1 ^{er} collège	Recherche biomédicale	M. Laurent PASQUIER M. Jean-Michel REYMANN (compétence en matière biostatistique)	Mme Elisabeth POLARD
	Médecins généralistes		
	Pharmaciens hospitaliers	M. Loïc JAVAUDIN	Mme Béatrice MARIE DIT DINARD
	Personnels infirmiers	Mme Hervelyne ROPERT	
2 ^{ème} collège	Personnes qualifiées en matière d'éthique	Mme Marie-Noëlle BELLOIR	
	Psychologues	M. Benoît LORNE	
	Travailleurs sociaux	Mme Lénaïk LE BARTZ-LE FAUCHEUR	
	Personnes qualifiées en matière juridique	Mme Gaëlle COSTIOU	Mme Anne LE LOUARN
	Représentants des associations agrées de malades et d'usagers du système de santé	Mme Nicole LEFORESTIER	Mme Francine LAIGLE

Veuillez agréer, Monsieur, l'expression de nos meilleures salutations.

Gaëlle COSTIOU

Présidente du C.P.P. Ouest V

Comité de Protection des Personnes
C.P.P. Ouest V - Rennes
CHU Pontchaillou
9, avenue de la Bataille Flandre-Dunkerque
35000 RENNES Cedex 09
Tél. 02 99 28 25 56 - Fax 02 99 28 98 93
cpp.ouestv@chu-rennes.fr

**Merci de bien vouloir adresser toutes vos correspondances à l'adresse ci-dessous
et de mentionner la référence CPP.**

COMITÉ DE PROTECTION DES PERSONNES (C.P.P.) - OUEST V - RENNES

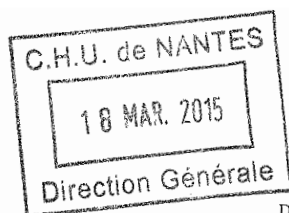
CHU Pontchaillou - 9, avenue de la Bataille Flandre Dunkerque - 35000 - RENNES

Tél. : 02 99 28 25 56 - Fax : 02 99 28 98 93

Courriel : cpp.ouestv@chu-rennes.fr.

Site internet : <http://cppouestv.fr/>.

Annexe 7



MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE,
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

Direction générale de la recherche et de l'innovation

Service de la performance, du financement et de
la contractualisation avec les organismes de recherche
Département de la culture scientifique et des relations avec la société

Comité Consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche dans le domaine de la santé (CCTIRS)

1, rue Descartes - 75231 Paris Cedex 05

Affaire suivie par : Claudine Poudroux

Votre Réf. : RC14_0372

Dossier CCTIRS n° 15.238 (à rappeler dans toute correspondance)

Responsable administrative CCTIRS : F. Gaufreteau

Mél. : francine.gaufreteau@recherche.gouv.fr

Paris, le 11 mars 2015

Madame,

Conformément aux dispositions de la loi n° 94-548 du 1er juillet 1994, vous avez adressé au Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche dans le domaine de la santé, un projet de traitement automatisé de données nominatives relatif à une étude intitulée : « Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique (Prévall-DP - Réf.RC14_0372). ».

Après examen, le Comité consultatif a réservé son avis sur votre projet. En effet, un nouveau dossier doit être présenté au CCTIRS en prenant en compte les remarques suivantes :

- 1) Le nombre de prélèvements de sujets témoins n'est pas précisé.
- 2) Par ailleurs, il semble difficile que les tests biologiques qui ont lieu au fil de l'eau se fassent en aveugle sachant que les prélèvements des témoins viennent d'une banque. Les modalités d'envoi des prélèvements à partir de la banque ne sont pas précisées.
- 3) L'avis demandé auprès du CPP devra être fourni.
- 4) Concernant la lettre d'information :
 - page 2, 2ème paragraphe : corriger « prélèvements sanguins d'environ 40ml (4 tubes) » ;
 - préciser auprès de qui s'exerce le droit de retrait/rectification et donner les coordonnées complètes de la personne auprès de laquelle s'exerce ces droits ;
 - est-il envisagé d'inclure des personnes handicapées, sous tutelle/curatelle, privées de liberté ou dans l'incapacité de donner leur consentement éclairé ? Si oui, le justifier dans le protocole, si non, supprimer la présence de témoin/représentant légal.
- 5) Sur le CRF, bien s'assurer que ne sont collectés que le mois et l'année de naissance comme précisé dans le protocole.
- 6) Le comité s'interroge une fois de plus sur les conditions de constitution des bio-banques du CHU de Nantes quand on considère le titre de la bio-banque mentionnée en tête de la notice d'information et s'inquiète des utilisations ultérieures des échantillons en dehors du contexte au sein duquel ils ont été collectés.

Le Comité vous prie de tenir compte de ces observations pour le retour de votre dossier. Celui-ci comportera une lettre d'accompagnement précisant les modifications apportées ou non au dossier.

.../...

<http://www.recherche.gouv.fr>



2- (suite CCTIRS n° 15.238)

Toute modification apportée doit être **présentée dans la lettre d'envoi et surlignée dans le nouveau protocole (un dossier complet doit être constitué à nouveau).**

Nous vous informons qu'un guideline de rédaction de la lettre d'information et du formulaire de consentement est disponible sur le site web du CCTIRS.

Dans l'attente des trois exemplaires de votre nouveau dossier revu en ce sens, je vous prie d'agréer, Madame, l'expression de mes salutations les meilleures.

Jean-Louis SERRE
Président du Comité consultatif

Madame Claire BERNIER
CHU de Nantes- Hôtel Dieu
Dermatologie - Plateforme transversale d'allergologie
1 place Alexis Ricordeau
44093 NANTES Cedex 1

Copie à : Monsieur Philippe SUDREAU
CHU de Nantes
Pôle Direction Générale et Stratégie
Direction des Affaires Médicales et de la Recherche
5, allée de l'île glorieuse
44093 NANTES Cedex 1

**PÔLE DIRECTION GÉNÉRALE
ET STRATÉGIE**

5, allée de l'Île-Gloriette
44093 Nantes cedex 1

T. 02 40 08 72 42
F. 02 40 08 71 57
direction.generale@chu-nantes.fr

DIRECTEUR GÉNÉRAL
Philippe Sudreau

DIRECTEUR GÉNÉRAL ADJOINT
Hubert Jaspard



**Comité de Consultatif de Traitement de
l'Information en matière de Recherche dans le
domaine de la Santé**

Ministère de l'Enseignement supérieur et de la
Recherche
1 rue Descartes
75231 PARIS cedex 5

**AFFAIRES MÉDICALES
ET RECHERCHE**
Hubert Jaspard
DIRECTEUR (PAR INTERIM)

T. 02 40 08 72 42
F. 02 40 08 71 57

**COMMUNICATION
ET AFFAIRES GÉNÉRALES**
Marie Lapostolle
DIRECTRICE

T. 02 40 08 72 42
F. 02 40 08 71 57

**PLAN ET PROJET NOUVEL
HÔPITAL « ILE DE NANTES »**
Gaëlle Néron de Surgy
DIRECTRICE

T. 02 40 08 72 28
F. 02 40 08 72 33

**PILOTAGE « ACTIVITÉS -
RESSOURCES » ET
CONTRACTUALISATION INTERNE**
Sophie Douté
DIRECTRICE

T. 02 40 08 70 20
F. 02 40 08 71 57

USAGERS, RISQUES ET QUALITÉ
Benjamin Lapostolle
DIRECTEUR

T. 02 40 08 70 90
F. 02 40 08 70 64

Objet: Réponse à l'avis réservé relatif au protocole de recherche en soins courants « Prévall-DP » du Dr Claire BERNIER référencé sous le n°15.238.

Affaire suivie par :

Maxime Lebeau
maxime.lebeau@chu-nantes.fr
Direction des affaires médicales et de la recherche
Direction de la recherche
Département promotion
Tél. 02.53.48.28.18
Réf CCTIRS : 15.238
Réf CHU : RC14_0472

PJ : 7

Nantes, le 07/04/2015

Monsieur le Président,

Le CHU de Nantes a soumis au Comité le protocole « Prévall-DP » dont le Dr Claire Bernier est l'investigateur coordonnateur. L'expertise du protocole s'étant conclue par un avis réservé, un nouveau dossier contenant les précisions attendues est transmis.

Remarques sur le protocole

1. Le nombre de prélèvements de sujets témoins n'est pas précisé.

La proportion de patients atopiques dans la population générale est de 30% environ, il en a été tenu compte dans le nombre d'échantillons contrôles à tester. Les échantillons contrôles pré-inclus dont le Phadiatop retrouvera une sensibilisation asymptomatique seront exclus de l'analyse.

Le protocole requiert ainsi 30 échantillons négatifs à la sensibilisation aux pneumallergènes courants (échantillons contrôles).

Ce nombre de prélèvements négatifs sera obtenu à partir d'échantillons issus d'un groupe de 75 sujets témoins constitué par le laboratoire BioFortis pour ses propres activités de recherche ou celles de partenaires scientifiques nécessitant de faire appel à une population indemne de la pathologie d'intérêt. La négativité s'établissant grâce au Phadiatop® réalisé sur sérum ou plasma.

2. Par ailleurs, il semble difficile que les tests biologiques qui ont lieu au fil de l'eau se fassent en aveugle sachant que les prélèvements des témoins viennent d'une banque. Les modalités d'envoi des prélèvements à partir de la banque ne sont pas précisées.

Un prestataire agréé en marché avec le CHU de Nantes assurera le transport des échantillons biologiques depuis le laboratoire BioFortis.

Les échantillons biologiques témoins seront réceptionnés à la Plateforme Transversale d'Allergologie du CHU de Nantes par l'un des médecins investigateurs de l'étude. Les échantillons sanguins seront codés par étiquetage selon les modalités définies dans le protocole. Les échantillons seront placés dans des kits spécifiquement conçus pour le protocole.

Ces kits seront ensuite envoyés au Centre d'Immunomonitorage Nantes Atlantique (Plateforme CIMNA du CHU de Nantes) qui réalisera les analyses sans connaître le statut de l'échantillon afin de préserver le simple aveugle.

Les biologistes du CRCNA-UMR-982 effectueront l'extraction et la congélation des PBMC puis les épreuves de proliférations sans connaître le statut des patients afin de préserver le simple aveugle.

Le traitement des échantillons des patients allergiques sera identique en tout point à celui des échantillons des témoins.

Les patients allergiques n'auront pas de Phadiatop®. Cependant, les biologistes du CIMNA et du CRCNA-UMR892 n'ayant pas connaissance du protocole dans son intégralité et n'intervenant pas dans l'analyse des résultats le simple aveugle sera respecté.

Les échantillons témoins et allergiques arriveront indifféremment de leur statut pendant la période de recrutement du protocole. Il sera donc impossible pour les biologistes du CIMNA et du CRCNA-UMR892 de connaître le statut des échantillons traités.

3. L'avis favorable du Comité de Protection des Personnes est transmis en pièce jointe.

Remarques sur la lettre d'information et de consentement du protocole

- La correction « prélèvement sanguins d'environ 40mL (4 tubes) » demandée a été apportée au document.

4. – préciser auprès de qui s'exerce le droit de retrait/rectification et donner les coordonnées complètes de la personne auprès de laquelle s'exerce ces droits. Les coordonnées de la personne à contacter en cas de retrait/rectification de l'étude ont été notifiées sur la lettre d'information et de consentement au protocole.
5. Est-il envisagé d'inclure des personnes handicapées, sous curatelle/tutelle, privées de liberté ou dans l'incapacité de donner leur consentement éclairé. Si oui, le justifier dans le protocole, si non, supprimer la présence de témoin/représentant légal.

Les pathologies étudiées présentant une fréquence élevée au sein de la population générale, le protocole ne prévoit pas l'inclusion de majeurs protégés ou de personnes handicapées.

La correction demandée a été apportée au document.

Remarques sur les Case Report Forms (CRF) :

6. Sur le CRF, bien s'assurer que ne sont collectés que les mois et l'année de naissance comme précisé dans le protocole.

Il a été apporté une précision sur les divers masques de saisie quant au format écourté de la date de naissance lors du remplissage des eCRF (actuellement en cours de développement par le datamanager) :

Date de naissance (format mois/année)

Remarques sur le formulaire de constitution de la collection d'échantillons biologiques humains (CEBH):

Le Comité s'interroge une fois de plus sur les conditions de constitution des bio-banques du CHU de Nantes quand on considère le titre de la bio-banque mentionnée en tête de la notice d'information et s'inquiète des utilisations ultérieures des échantillons en dehors du contexte au sein duquel ils ont été collectés.

La collection d'échantillons biologiques humains constituée à l'occasion de la recherche est rattachée au programme de recherche intitulé « pathologies cardiovasculaires, respiratoires, leurs facteurs de risque et leurs traitements » déclaré au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche sous la référence DC-2011-1399. Ce programme de recherche et le formulaire d'information consentement ont reçu l'avis favorable du Comité de Protections des Personnes Ouest IV en date du 08/11/2011.

L'intérêt de la constitution d'une collection réside dans la réutilisation des échantillons biologiques pour répondre à de multiples questions scientifiques s'inscrivant strictement dans le champ du programme de recherche.

Les nombreuses collections regroupées en 18 programmes de recherche thématiques visent à optimiser l'utilisation des échantillons en échange de la qualité de l'information délivrée. Cette structuration s'est effectuée pendant plusieurs années en concertation avec la Cellule Bioéthique du Ministère en charge de la Recherche et le Comité de Protection des Personnes Ouest IV dans une logique d'amélioration de la qualité des activités.

Nous vous prions de bien vouloir trouver sous ce pli le dossier actualisé composé des éléments suivants :

- le formulaire de demande d'avis
- le protocole avec les modifications surlignées en gris
- le cv de l'investigateur principal de l'étude
- l'avis favorable du CPP Ouest V
- la lettre d'information pour la participation à la recherche avec les modifications surlignées en gris
- le formulaire d'information consentement collection validé par le CPP Ouest IV.

Les modifications effectuées seront portées à la connaissance du CPP Ouest V pour son information.

Nous restons à votre disposition et vous prions de croire, Monsieur le Président, en l'assurance de notre considération la meilleure.

Le Directeur Général Mr Philippe SUDREAU
par délégation le Directeur des Affaires
Médicales et de la Recherche par intérim
Mr Hubert JASPARD



Liberté • Égalité • Fraternité

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE,
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

Direction générale
de la recherche et de l'innovation

Paris, le 13 mai 2015

Service de la performance, du financement et de la contractualisation
avec les organismes de recherche
Département de la culture scientifique et des relations avec la société

Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière
de recherche dans le domaine de la santé (CCTIRS)

Affaire suivie par : Claudine Poudroux

Recommandé avec AR - Numéro de dossier à rappeler dans toute
correspondance : CCTIRS N° 15.238bis

Vos réf. : CHU : RC14_0472

Responsable administrative CCTIRS : Francine Gaufreteau

Mél. : francine.gaufreteau@recherche.gouv.fr

Madame,

Conformément aux dispositions de la loi n° 94-548 du 1er juillet 1994, vous avez adressé au Comité consultatif sur le traitement de l'information en matière de recherche dans le domaine de la santé, un projet de traitement automatisé de données nominatives relatif à une étude intitulée : « Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique (Prévall-DP - Réf.RC14_0372). ».

Après examen de votre dossier, le Comité consultatif a émis l'avis ci-joint.

Le Comité appelle par ailleurs votre attention sur le fait que toute modification ultérieure du projet que vous lui avez soumis doit être portée à sa connaissance par courrier postal incluant un dossier unique où **les éléments anciens** figurent en « **barrés** » et les **éléments nouveaux sont surlignés**.

Nous vous informons qu'un guideline de rédaction de la lettre d'information et du formulaire de consentement est disponible sur le site web du CCTIRS.

Je vous prie d'agréer, Madame, l'expression de mes salutations les meilleures.

Didier HOFFSCHIR

Chef du département de la culture scientifique
et des relations avec la société

Madame Claire BERNIER
CHU de Nantes - Hôpital Dieu
Dermatologie
Plateforme transversale d'allergologie
1 place Alexis Ricordeau
44093 NANTES Cedex

Copie à : Monsieur Philippe SUDREAU
CHU de Nantes
Pôle Direction Générale et Stratégie
Direction des Affaires Médicales et de la Recherche
5, allée de l'île glorieuse
44093 NANTES Cedex 1



Liberté • Égalité • Fraternité

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE,
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

DIRECTION GÉNÉRALE DE LA RECHERCHE ET DE L'INNOVATION

Comité consultatif sur le traitement de l'information
en matière de recherche dans le domaine de la santé

Dossier n° 15.238bis

Intitulé de la demande : Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique (Prévall-DP - Réf.RC14_0372).

Responsable scientifique : Claire BERNIER

CHU de Nantes - Hôpital Dieu
Dermatologie
Plateforme transversale d'allergologie
1 place Alexis Ricordeau
44093 NANTES Cedex

Demandeur :

Philippe SUDREAU
CHU de Nantes
Pôle Direction Générale et Stratégie
Direction des Affaires Médicales et de la Recherche
5, allée de l'île glorieuse
44093 NANTES Cedex 1

Dossier reçu le : 9 avril 2015

Dossier examiné le : 7 mai 2015

Avis du Comité consultatif :

Avis favorable

Toutefois, le comité demande de prendre en compte les remarques suivantes :

Les données transférées avec les échantillons biologiques à la collection intitulée « génétique et biomarqueurs des pathologies cardiovasculaires, respiratoires et leurs facteurs de risque » doivent être précisées, ainsi que les modalités mises en œuvre pour assurer leur confidentialité.

Fait à Paris, le 13 mai 2015

Jean-Louis Serre
Président du Comité consultatif

BIBLIOGRAPHIE

- Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, Engstrand L, Jenmalm MC (2012). *Low diversity of the gut microbiota in infants with atopic eczema*. J Allergy Clin Immunol.
- Abrahamsson TR, Jakobsson HE, Andersson AF, Björkstén B, Engstrand L, Jenmalm MC (2014). *Low gut microbiota diversity in early infancy precedes asthma at school age*. Clin Exp Allergy.
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, Fernandes GR, Tap J, Bruls T, Batto JM, Bertalan M, Borruel N, Casellas F, Fernandez L, Gautier L, Hansen T, Hattori M, Hayashi T, Kleerebezem M, Kurokawa K, Leclerc M, Levenez F, Manichanh C, Nielsen HB, Nielsen T, Pons N, Poulain J, Qin J, Sicheritz-Ponten T, Tims S, Torrents D, Ugarte E, Zoetendal EG, Wang J, Guarner F, Pedersen O, de Vos WM, Brunak S, Doré J; MetaHIT Consortium, Antolín M, Artiguenave F, Blottiere HM, Almeida M, Brechot C, Cara C, Chervaux C, Cultrone A, Delorme C, Denariáz G, Dervyn R, Foerstner KU, Friss C, van de Guchte M, Guedon E, Haimet F, Huber W, van Hylckama-Vlieg J, Jamet A, Juste C, Kaci G, Knol J, Lakhdari O, Layec S, Le Roux K, Maguin E, Mérieux A, Melo Minardi R, M'rini C, Muller J, Oozeer R, Parkhill J, Renault P, Rescigno M, Sanchez N, Sunagawa S, Torrejon A, Turner K, Vandemeulebrouck G, Varela E, Winogradsky Y, Zeller G, Weissenbach J, Ehrlich SD, Bork P (2011). *Enterotypes of the human gut microbiome*. Nature.
- Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, Fukuda S, Saito T, Narushima S, Hase K, Kim S, Fritz JV, Wilmes P, Ueha S, Matsushima K, Ohno H, Olle B, Sakaguchi S, Taniguchi T, Morita H, Hattori M, Honda K (2013). *Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota*. Nature.
- Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K (2011). *Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species*. Science.
- Aubert-Wastiaux H, Moret L, Le Rhun A, Fontenoy AM, Nguyen JM, Leux C, Misery L, Young P, Chastaing M, Danou N, Lombrail P, Boralevi F, Lacour JP, Mazereeuw-Hautier J, Stalder JF, Barbarot S (2011). *Topical corticosteroid phobia in atopic dermatitis: a study of its nature, origins and frequency*. Br J Dermatol.
- Bisgaard H, Li N, Bonnelykke K, Chawes BL, Skov T, Paludan-Müller G, Stokholm J, Smith B, Krogfelt KA (2011). *Reduced diversity of the intestinal microbiota during infancy is associated with increased risk of allergic disease at school age*. J Allergy Clin Immunol.
- Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, Marchesi JR, Falush D, Dinan T, Fitzgerald G, Stanton C, van Sinderen D, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, Henry C, O'Mahony D, Fitzgerald AP, Shanahan F, Twomey C, Hill C, Ross RP, O'Toole PW (2011). *Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly*. Proc Natl Acad Sci U S A.
- Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, Harris HM, Coakley M, Lakshminarayanan B, O'Sullivan O, Fitzgerald GF, Deane J, O'Connor M, Harnedy N, O'Connor K, O'Mahony D, van Sinderen D, Wallace M, Brennan L, Stanton C, Marchesi JR, Fitzgerald AP, Shanahan F, Hill C, Ross RP, O'Toole PW (2012). *Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly*. Nature.

- De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poullet JB, Massart S, Collini S, Pieraccini G, Lionetti P (2010). *Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa*. Proc Natl Acad Sci U S A.
- De La Cochetière MF, Durand T, Lepage P, Bourreille A, Galmiche JP, Doré J (2005). *Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge*. J Clin Microbiol.
- Ding T, Schloss PD (2014). Dynamics and associations of microbial community types across the human body. Nature.
- Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, Knight R (2010). *Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns*. Proc Natl Acad Sci U S A.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA (2009). *Diversity of the human intestinal microbial flora*. Science.
- Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, Aguilera M, Khanna S, Gil A, Edwards CA, Doré J ; Other Members of the INFABIO Team (2010). *Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics*. J Pediatr Gastroenterol Nutr.
- Furet JP, Firmesse O, Gourmelon M, Bridonneau C, Tap J, Mondot S, Doré J, Corthier G (2009). *Comparative assessment of human and farm animal faecal microbiota using real-time quantitative PCR*. FEMS Microbiol Ecol.
- Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NN, Murakami S, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, Hase K, Ohno H (2013). *Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells*. Nature.
- Hill DA, Hoffmann C, Abt MC, Du Y, Kobuley D, Kirn TJ, Bushman FD, Artis D (2010). *Metagenomic analyses reveal antibiotic-induced temporal and spatial changes in intestinal microbiota with associated alterations in immune cell homeostasis*. Mucosal Immunol.
- Hill DA, Siracusa MC, Abt MC, Kim BS, Kobuley D, Kubo M, Kambayashi T, Larosa DF, Renner ED, Orange JS, Bushman FD, Artis D (2012). *Commensal bacteria-derived signals regulate basophil hematopoiesis and allergic inflammation*. Nat Med.
- Hoarau C, Lagaraine C, Martin L, Velge-Roussel F, Lebranchu Y (2006). *Supernatant of Bifidobacterium breve induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway*. J Allergy Clin Immunol.
- Hoarau C, Martin L, Faugaret D, Baron C, Dauba A, Aubert-Jacquín C, Velge-Roussel F, Lebranchu Y (2008). *Supernatant from bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells*. PLoS One.
- Huffnagle GB (2010). *The microbiota and allergies/asthma*. PLoS Pathog.
- Human Microbiome Project Consortium (2012). *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome*. Nature.
- Kamada N, Seo SU, Chen GY, Núñez G (2013). *Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease*. Nat Rev Immunol.

- Li YN, Huang F, Liu L, Qiao HM, Li Y, Cheng HJ (2012). *Effect of oral feeding with Clostridium leptum on regulatory T-cell responses and allergic airway inflammation in mice*. Ann Allergy Asthma Immunol.
- Louis P, Flint HJ (2009). *Diversity, metabolism and microbial ecology of butyrate-producing bacteria from the human large intestine*. FEMS Microbiol Lett.
- Magnan A, Vervloet D (2003). *Traité d'allergologie*. Ed Médecine-Sciences Flammarion.
- Mah KW, Björkstén B, Lee BW, van Bever HP, Shek LP, Tan TN, Lee YK, Chua KY (2006). *Distinct pattern of commensal gut microbiota in toddlers with eczema*. Int Arch Allergy Immunol.
- Matricardi PM, Nisini R, Pizzolo JG, D'Amelio R (1990). *The use of Phadiatop in mass-screening programmes of inhalant allergies: advantages and limitations*. Clin Exp Allergy.
- Miquel S, Martín R, Bridonneau C, Robert V, Sokol H, Bermúdez-Humarán LG, Thomas M, Langella P (2014). *Ecology and metabolism of the beneficial intestinal commensal bacterium Faecalibacterium prausnitzii*. Gut Microbes.
- Morgan XC, Segata N, Huttenhower C (2012). *Biodiversity and functional genomics in the human microbiome*. Trends Genet.
- Noverr MC, Falkowski NR, McDonald RA, McKenzie AN, Huffnagle GB (2005). *Development of allergic airway disease in mice following antibiotic therapy and fungal microbiota increase: role of host genetics, antigen, and interleukin-13*. Infect Immun.
- Noverr MC, Noggle RM, Toews GB, Huffnagle GB (2004). *Role of antibiotics and fungal microbiota in driving pulmonary allergic responses*. Infect Immun.
- O'Shea JJ, Paul WE (2010). *Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells*. Science.
- Ottman N, Smidt H, de Vos WM, Belzer C (2012). *The function of our microbiota: who is out there and what do they do?* Front Cell Infect Microbiol.
- Penders J, Gerhold K, Stobberingh EE, Thijs C, Zimmermann K, Lau S, Hamelmann E (2013). *Establishment of the intestinal microbiota and its role for atopic dermatitis in early childhood*. J Allergy Clin Immunol.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Doré J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J; MetaHIT Consortium, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature.
- Quévrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, Miquel S, Carlier L, Bermúdez-Humarán LG, Pigneur B, Lequin O, Kharrat P, Thomas G, Rainteau D, Aubry C, Breyner N, Afonso C, Lavielle S, Grill JP, Chassaing G, Chatel JM, Trugnan G, Xavier R, Langella P, Sokol H, Seksik P (2016). *Identification of an anti-inflammatory protein from Faecalibacterium prausnitzii, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease*. Gut.
- Rossi O, Khan MT, Schwarzer M, Hudcovic T, Šrutkova D, Duncan SH, Stolte EH, Kozakova H, Flint HJ, Samsom JN, Harmsen HJ, Wells JM (2015). *Faecalibacterium prausnitzii Strain HTF-F and Its Extracellular Polymeric Matrix Attenuate Clinical Parameters in DSS-Induced Colitis*. PLoS One.

Rossi O, van Berkel LA, Chain F, Tanweer Khan M, Taverne N, Sokol H, Duncan SH, Flint HJ, Harmsen HJ, Langella P, Samsom JN, Wells JM (2016). *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses. *Sci Rep*.

Round JL, Mazmanian SK (2010). *Inducible Foxp3+ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota*. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Sarrabayrouse G, Bossard C, Chauvin JM, Jarry A, Meurette G, Quévrain E, Bridonneau C, Preisser L, Asehnoune K, Labarrière N, Altare F, Sokol H, Jotereau F (2014). *CD4CD8 $\alpha\alpha$ lymphocytes, a novel human regulatory T cell subset induced by colonic bacteria and deficient in patients with inflammatory bowel disease*. *PLoS Biol*.

Schloissnig S, Arumugam M, Sunagawa S, Mitreva M, Tap J, Zhu A, Waller A, Mende DR, Kultima JR, Martin J, Kota K, Sunyaev SR, Weinstock GM, Bork P (2013). *Genomic variation landscape of the human gut microbiome*. *Nature*.

Schwartz S, Friedberg I, Ivanov IV, Davidson LA, Goldsby JS, Dahl DB, Herman D, Wang M, Donovan SM, Chapkin RS (2012). *A metagenomic study of diet-dependent interaction between gut microbiota and host in infants reveals differences in immune response*. *Genome Biol*.

Simpson JL, Scott R, Boyle MJ, Gibson PG (2006). *Inflammatory subtypes in asthma: assessment and identification using induced sputum*. *Respirology*.

Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottière HM, Doré J, Marteau P, Seksik P, Langella P (2008). *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Song H, Yoo Y, Hwang J, Na YC, Kim HS (2016). *Faecalibacterium prausnitzii* subspecies-level dysbiosis in the human gut microbiome underlying atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*.

Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet JP, Ugarte E, Muñoz-Tamayo R, Paslier DL, Nalin R, Dore J, Leclerc M (2009). *Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core*. *Environ Microbiol*.

Trompette A, Gollwitzer ES, Yadava K, Sichelstiel AK, Sprenger N, Ngom-Bru C, Blanchard C, Junt T, Nicod LP, Harris NL, Marsland BJ (2014). *Gut microbiota metabolism of dietary fiber influences allergic airway disease and hematopoiesis*. *Nat Med*.

Van den Abbeele P, Belzer C, Goossens M, Kleerebezem M, De Vos WM, Thas O, De Weirde R, Kerckhof FM, Van de Wiele T (2013). *Butyrate-producing Clostridium cluster XIVa species specifically colonize mucins in an in vitro gut model*. *ISME J*

van Nimwegen FA, Penders J, Stobberingh EE, Postma DS, Koppelman GH, Kerkhof M, Reijmerink NE, Dompeling E, van den Brandt PA, Ferreira I, Mommers M, Thijs C (2011). *Mode and place of delivery, gastrointestinal microbiota, and their influence on asthma and atopy*. *J Allergy Clin Immunol*.

Wenzel SE (2006) . *Asthma: defining of the persistent adult phenotypes*. *Lancet*.

West CE (2014). *Gut microbiota and allergic disease: new findings*. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*.

White KL, Williams TF, Greenberg BG (1961). *The ecology of medical care*. *N Engl J Med*.

Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Baldassano RN, Anokhin AP, Heath AC, Warner B, Reeder J, Kuczynski J, Caporaso JG, Lozupone CA, Lauber C, Clemente JC, Knights D, Knight R, Gordon JI (2012). *Human gut microbiome viewed across age and geography*. Nature.

Zhu J, Paul WE (2010). *Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors*. Immunol Rev.

TROISIEME PARTIE : Mise en place du protocole PREVAL DP

SOMMAIRE

LISTE DES ABBREVIATIONS (p.192)

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX (p.193)

LA STRATEGIE INITIALE DE MISE EN PLACE DU PROTOCOLE PREVALL DP (p.194)

1. Définitions des acteurs et de leurs rôles respectifs (p.194)
2. Les échantillons sanguins provenant de Biofortis (p.195)
3. Concernant l'inclusion des patients allergiques (p.196)
4. Concernant les échantillons sanguins provenant de la PFTA (p.196)
5. Concernant le stockage de la bio-collection des PBMC GOMMS et PREVALL DP (p.197)
6. Concernant le budget de l'étude (p.198)
7. Concernant les e-CRF (p.198)

EVALUATION ET RECTIFICATION DE LA STRATEGIE INITIALE DE MISE EN PLACE A 6 MOIS (p.200)

BILAN ACTUEL ET PERSPECTIVES (p.205)

ANNEXES (p.209)

BIBLIOGRAPHIE (p.245)

Liste des abréviations

AA	Asthme Allergique
ABPA	Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique
ACQ	Asthma Control Questionnaire
AMAAN	Association des Médecins Allergologues de l'Agglomération Nantaise
ARC	Attaché de Recherche Clinique
CIC	Centre d'Investigation Clinique
CIMNA	Centre d'ImmunoMonitoring Nantes Atlantique
COLT	COhort of Lung Transplantation
CRTE	Centre de Réception et de Traitement des Echantillons
DA	Dermatite Atopique
DP8αα	Lymphocytes T doubles positifs CD4 CD8αα
DRCI	Délégation de la Recherche Clinique et de l'Innovation
e-CRF	electronic Case Report Form
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
EFS	Etablissement Français du Sang
<i>F.prau</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
GOMMS	Gut and Oral Microbiota Mapping and Sugartypes
IRT-UN	Institut de Recherche Thérapeutique de l'Université de Nantes
PBMC	Periophageal Blood Mononuclear Cells
PFTA	PlateForme Transversale d'Allergologie
POS	Protocole Opérationnel Stratégique
PREVALL DP	PREvalence des DP8αα dans l'ALLergie
RA	Rhinite Allergique
TARC	Thymus and Activation Regulated Chemokine
UMR	Unité Mixte de Recherche

Liste des figures et tableaux

Figures :

Figure 1	POS des données cliniques, des échantillons et données biologiques du protocole PREVALL DP
Figure 2	Tableau de bord du protocole PREVALL DP à 6 mois du début des inclusions
Figure 3	Répartition des inclusions du protocole PREVALL DP sur l'année 2015/2016.
Figure 4	Tableau de bord du protocole PREVALL DP à 12 mois du début des inclusions

LA STRATEGIE INITIALE DE LA MISE EN PLACE DU PROTOCOLE PREVALL DP

Le 5 juin 2015 nous avons reçu l'autorisation de la DRCI pour démarrer les inclusions du protocole PREVALL DP (Annexe 1) . Nous avons défini une stratégie de mise en place avec une chaîne de traitement différente pour chaque type d'échantillon (sain et allergique) sous la forme d'un protocole opérationnel stratégique (POS ; figure 1). Nous avons opté pour une stratégie de centralisation sous la responsabilité d'une personne/structure qui répartit les différents échantillons aux différents acteurs afin de pouvoir facilement localiser et solutionner une anomalie. Une réunion d'ajustement a été prévue à 6 mois du début des inclusions.

1. Définitions des acteurs et de leurs rôles respectifs

- PFTA : responsable des inclusions des patients allergiques selon les modalités décrites dans la protocole PREVALL DP via les *Drs BERNIER Claire et PIPET Anaïs* (Partie 2, annexe 1).
- CRTE : Responsable de la réception des échantillons sanguin des patients allergiques inclus dans le protocole et de leur adressage au CIMNA et à l'IRT-UN UMR 1087 - équipe 6 - Pr MAGNAN . *Personne responsable = Thierry BOMPOILS*
- CIMNA : responsable du dosage des DP8αα totaux sur sang anti-coagulé (GOMMS et PREVALL DP) et de la réalisation des Phadiatop™ sur les échantillons témoins (GOMMS). *Personnes responsables = Dr Marie RIMBERT et Pr Régis JOSIEN.*
- UMR Inserm 1087 - équipe 6 - Pr MAGNAN : responsable de la bio-collection des échantillons provenant du laboratoire BIOFORTIS et des patients allergiques inclus dans le protocole PREVALL DP. *Personnes responsables = Eugénie DURAND, Jennifer LOY.*
- UMR Inserm 892 - équipe 4 - Pr JOTEREAU : responsable de l'analyse des DP8αα spécifiques sur PBMC décongelés. *Personne responsable = Pr Francine JOTEREAU*
- UMR Inserm 892 - équipe Pr LE PENDU : responsable de la réception des échantillons du Laboratoire BIOFORTIS destinés aux différentes équipes impliquées dans le projet GOMMS. *Personne responsable = Dr Jacques LE PENDU*
- Laboratoire BIOFORTIS : promoteur de l'étude clinique GOMMS (Partie 2, annexe 2) qui fournit les échantillons témoins pour le protocole PREVALL DP. *Personnes responsables = Dr Françoise LEVACON et Dr David GENDRE.*
- Maxime LEBEAUPIN : Chef de projet à la DRCI.
- Aurore FOUREAU : Chef de projet au sein du CIC Thorax.

- Méthodologiste : responsable de la création des e-CRF et de l'analyse des données.
Personne responsable = Béatrice GUYOMARC'H.

2. Les échantillons sanguins provenant de Biofortis (Annexe 2).

Le laboratoire BIOFORTIS a commencé à recruter avant que nous n'ayons eu l'agrément pour débiter le protocole PREVALL DP. Grâce à une pirouette législative, nous avons pu les récupérer et effectuer les différentes étapes prévues dans la stratégies d'analyse des échantillons biologiques (Partie 2, Figure 2). En effet ces échantillons nous sont cédés selon le contrat de collaboration (Partie 2, Annexe 3) pour l'étude GOMMS (différente de PREVALL DP) pour laquelle nous effectuons un pool d'analyses spécifiques (le dosage des DP8αα totaux sur sang anti-coagulé et spécifiques de *F.prau* sur PBMC congelés).

- ils sont au nombre de **75**.

- Composition :

- **1 tubes sec de 4mL** pour réalisation du **Phadiatop**.
- **2 tubes EDTA de 9mL** pour extraire et congeler les **PBMC**.
- **1 tube EDTA de 4mL** dont 3mL sont récupérés par l'équipe du Pr Le Pendu et **1mL** pour le Dr Marie Rimbert pour le **dosage des DP8αα sur sang total frais**.

- Réception : dans l'équipe du Pr Le Pendu **pièce 401 à l'IRT-UN**. Les échantillons destinés à PREVALL DP sont récupérés par Joudy Alameddine (thésarde du Pr Francine Jotereau).

- Dispatch des échantillons :

- Les 2 tubes EDTA de 9mL sont techniques (extraction et congélation des PBMC) par Jennifer LOY et/ou Eugénie Durand de l'équipe 6 - UMR 1087 porte 208.
- Le tube sec de 4mL et le tube EDTA de 1mL sont déposés au CRTE avec le bon d'identification du laboratoire BIOFORTIS pour le Phadiatop™ et le dosage des DP8αα. Dr Marie RIMBERT s'occupe de concevoir le circuit des échantillons avec le CRTE. Ils seront enregistrés comme « recherche clinique » et transmis à la **plateforme d'immuno-monitorage (CIMNA)**.

- Résultats : les Phadiatops™ seront transmis à la **PFTA à Luc COLAS** et le dosage des DP8αα à **Francine JOTEREAU et à Luc COLAS salles 434 et 209 de l'IRT-UN respectivement**.

A noter que le laboratoire Biofortis ayant démarré rapidement, nous n'avons pas pu leur fournir le matériel à temps (tubes, étiquettes, pochettes, bon). Nous livrerons 75 kits de prélèvements en rétro actif dès réception comprenant chacun :

- 1 pochette avec le bon pour le Phadiatop™, étiquette et 1 tube sec de 4mL
- 1 pochette avec le bon pour le dosage des DP8αα, étiquettes et les 3 tubes EDTA

Les codes d'anonymisation de GOMMS et de PREVALL DP étant différents, nous avons conçu **un tableur Excel** (Annexe 3) reprenant les correspondances. Il sera à compléter pendant toute la durée des inclusions afin que nous puissions récupérer les données nécessaires des e-CRF de GOMMS pour l'analyse statistique de PREVALL DP.

Les étiquettes fournies seront pré-remplies avec le code d'anonymisation prévu pour PREVALL DP. Le code d'anonymisation pour PREVALL DP est le suivant : *EC + numéro d'inclusion - date du prélèvement*.

3. Concernant l'inclusion des patients allergiques

Un dossier a été spécifiquement créé et envoyé aux allergologues libéraux afin de les informer et les aider à l'inclusion de patients sans engendrer une prise de retard dans les consultations :

- **une fiche récapitulative du protocole.** Elle contient la marche à suivre pour prendre les RDV de consultation d'inclusion, un rappel des objectifs de l'étude, des critères d'inclusion et d'exclusion et des documents à fournir (Annexe 4).
- **une version de chaque CRF** avec les différents **scores cliniques** associés
- **la notice d'information** de l'étude. Ils pourront la remettre par avance aux patients.
- **le diaporama de présentation du protocole** que les allergologues libéraux ont pu découvrir le 5 février 2015 lors d'une réunion de présentation que j'avais faite aux membres de l'AMAAN.
- le **protocole PREVALL DP** en entier si certains souhaitent le lire et poser quelques questions.

Nous avons également intégré le prélèvement sanguin, après accord de la cadre du service Mme Hélène COISNE, dans l'activité du centre de prélèvement de la dermatologie, médecine vasculaire et médecine interne au 7^e étage aile nord du CHU Hôtel Dieu de Nantes. Une fiche explicative des prélèvements a été diffusée aux infirmières après une réunion de présentation du protocole PREVALL DP (Annexe 5).

4. Concernant les échantillons sanguins provenant de la PFTA

- ils sont au nombre de **90**
- Composition :
 - **3 tubes EDTA de 9mL** pour extraire et congeler les **PBMC**.

- **2 tubes EDTA de 4mL** dont 1 tube pour le **dosage des DP8αα** sur sang frais et 1 tube pour compléter les **PBMC**.

- Réception : les échantillons seront envoyés par valise interne au CRTE.

- Dispatch des échantillons :

- Les 3 tubes EDTA de 9mL et le tube EDTA de 4mL seront adressés à l'IRT-UN via le CRTE (case spécifique de recueil des échantillons de COLT et TARC-ABPA). Un bon spécifique en accord avec Thierry BOMPOILS a été créé pour ces tubes (Annexe 6).

- le tube EDTA de 4mL sera enregistré comme « recherche clinique » au CRTE via le bon de demande de dosage des DP8αα créé par Marie Rimbart (Annexe 7). Il sera par la suite transmis à la **plateforme d'immune-monitorage (CIMNA)**.

- Résultats : les dosages des DP8αα sont transmis à **Francine JOTEREAU** et à **Luc COLAS** à l'IRT-UN salle 434 et 209 de l'IRT-UN respectivement.

Au total, il y a donc **90 kits de prélèvements pour les patients allergiques** fournis à la PFTA :

- 1 pochette avec le bon pour le dosage des DP8αα avec 1 tube EDTA de 4mL + étiquettes

- 1 pochette avec le bon d'adresse à l'IRT-UN UMR 1087 - équipe 6 salle 208 avec 3 tubes EDTA de 9mL et 1 tube EDTA de 4mL pour l'extraction et la congélation des PBMC.

Les étiquettes fournies seront pré-remplies par le médecin investigateur avec le code d'anonymisation prévu pour PREBALL DP. Le code d'anonymisation pour Prévall DP est le suivant :

1° lettre du nom + 1° lettre du prénom + numéro-d'inclusion - mois/année de naissance - initiale de la pathologie

DA = dermatite atopique

RA = rhinite allergique

AA = asthme allergique

Exemple : LC 1 - 05/1987 - AA pour Luc COLAS 1° patient avec un asthme allergique né en mai 1987.

5. Concernant le stockage de la biocollection des PBMC GOMMS et PREBALL DP

- Il se fera à -80°C dans les congélateurs de l'UMR 1087 - équipe 6 puis dans l'azote liquide

- Il y aura 1 boîte par groupe :

- échantillons contrôles

- asthme allergique

- rhinite allergique

- dermatite atopique

- Un fichier excel de localisation et de gestion des boîtes de stockage sera tenu et régulièrement mis à jour par Jennifer Loy et/ou Eugénie Durand.

6. Concernant le budget de l'étude

- Nous fournissons les **75 kits** pour les échantillons sanguins provenant de **Biofortis**.
- Nous fournissons les **90 kits** pour les échantillons sanguins provenant de la **PFTA**.
- **Un tarif forfaitaire par échantillon pour le dosage des DP8αα** (comprenant le temps technicien, l'entretien du cytomètre de flux, les réactifs et les tubes « true count » pour la valeur absolue) a été négocié entre le Dr Marie RIMBERT, Maxime LEBEAUPIN et Aurore FOUREAU. Nous payons donc pour les **30 échantillons contrôle retenus de chez Biofortis + les 90 échantillons de patients allergiques**. Le devis fourni par Marie Rimbert devra être signé par l'investigatrice principale de l'étude soit Dr Claire Bernier et le chef de service de la plateforme d'immuno-monitorage (CIMNA) soit Pr Régis JOSIEN (Annexe 9).
- Nous financerons les **75 phadiatops**.
- Nous financerons également les réactifs et consommables pour le dosage des DP8αα spécifiques de *F.prau*.

7. Concernant les e-CRF

Ils ont été créés sur support informatique à partir des supports papiers (Partie 2, annexe 1) sur un serveur en ligne accessible à l'adresse suivante : <https://www.dirc-hugo-online.org/CSOnline>.

Chaque médecin investigateur, chef de projet, ARC et TEC a reçu un identifiant et un mot de passe afin de pouvoir y accéder.

La méthodologiste a rédigé un guide sur la saisie des données demandées pour le protocole PREVALL DP (Annexe 10).

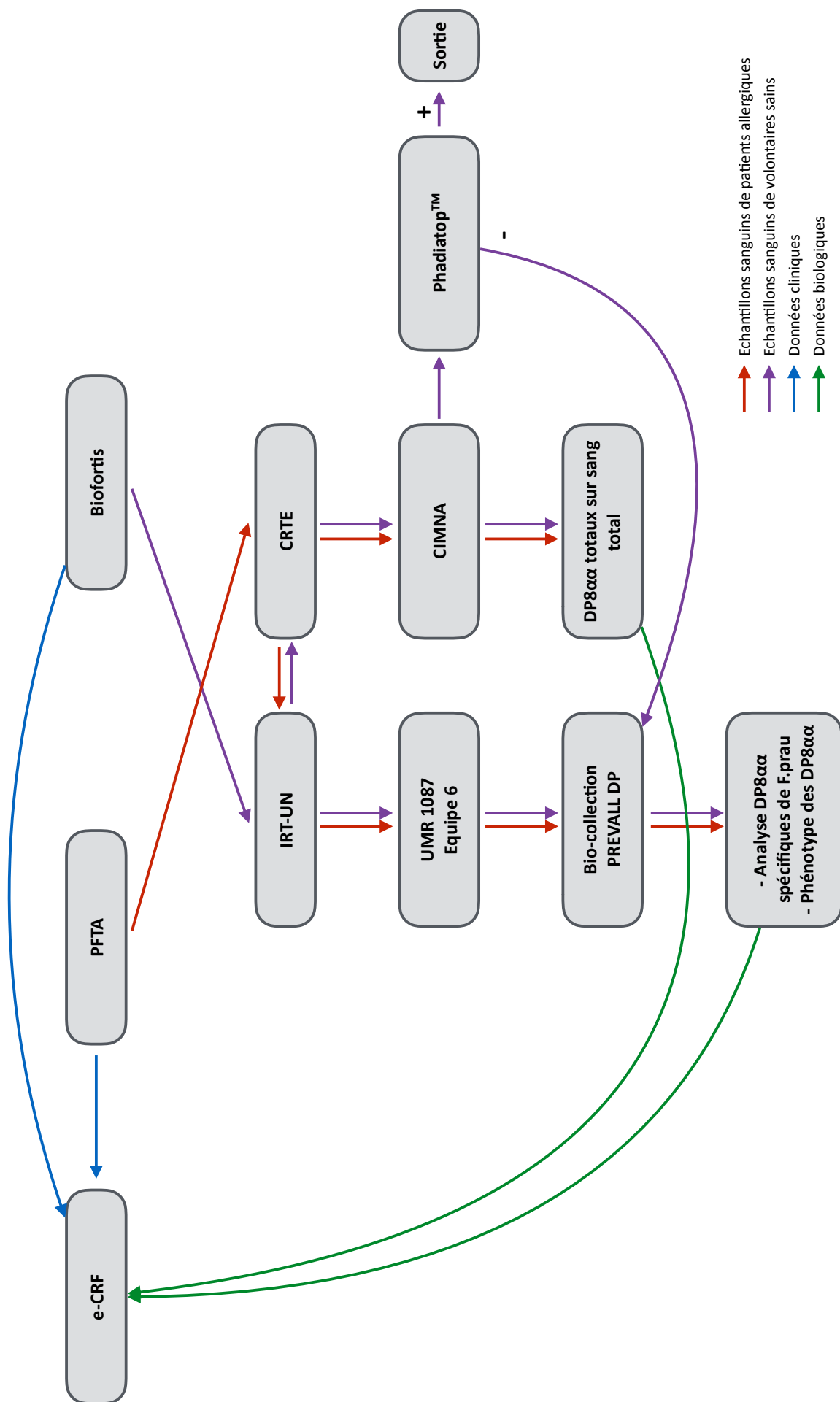


Figure 1 : POS des données cliniques, échantillons et données biologiques du protocole
PREVALL DP

EVALUATION ET RECTIFICATION DE LA STRATEGIE INITIALE A 6 MOIS

Une réunion d'évaluation à 6 mois s'est tenue le 21 décembre 2015. Son but était d'évaluer la vitesse des inclusions des échantillons contrôles et des patients allergiques ainsi que le fonctionnement des différentes chaînes de traitement des échantillons biologiques énumérées ci-dessus (Annexe 11).

Concernant les inclusions des échantillons biologiques contrôles, elles étaient terminées au moment de la réunion. Nous avons également eu accès aux e-CRF mis en place par le laboratoire BIOFORTIS dont un problème est ressorti : les âges d'inclusions des patients s'étendaient de 18 ans à 30 ans maximum. Or, il semble exister une corrélation positive entre l'âge et le taux des DP8αα. Il faut donc apparier les échantillons en fonction de l'âge lors l'analyse des données. Un regard rapide à l'âge des patients allergiques déjà inclus dans le protocole PREVALL DP montre un âge maximal de 70 ans.

Nous (Maixme LEBEAUPIN et moi-même) avons donc contacter l'EFS pour recruter d'autres échantillons sanguins contrôles par cluster d'âge arbitrairement définis (tranche de 10 ans) jusqu'à 70 ans. En effet, le questionnaire de don de sang balaie les critères d'inclusions et de non inclusions nécessaires pour inclure les échantillons contrôles dans le protocole PREVALL DP hormis le statut atopique qui pourra facilement être déterminé par un Phadiatop™.

Le 4 juillet 2016, nous avons obtenu une réponse favorable de l'EFS quant aux critères d'inclusion et de non-inclusion demandés et la faisabilité de prélever le nombre et les natures de tubes nécessaires. Nous sommes actuellement dans l'attente des conventions de transfert des échantillons et des modalités de récupération des données cliniques demandées dans le protocole (mois et années de naissance, poids, taille, BMI, sexe, âge).

Concernant les différentes chaînes de traitements des échantillons biologiques, aucune anomalie n'a été observée. Il n'y donc eu aucune modification.

Concernant le recrutement des patients allergiques, le rythme des inclusions n'était pas satisfaisant puisqu'à 6 mois nous avons un total de 23 inclusions dont 5 dermatites atopiques, 3 asthmes allergiques et 15 rhinites allergiques soit moitié moins que le nombre d'inclusion attendue au vu de la période d'inclusion de 1 an prévue (Figure) Nous avons donc envisagé des mesures correctives basés sur plusieurs constatations :

- Le recrutement des patients atteints de rhinites allergiques est exclusivement apporté par les médecins allergologues libéraux. De plus, le nombre d'inclusion était celui attendu au vu de la période d'inclusion de 1 an.
- Le recrutement des patients atteints d'asthme allergique était très largement inférieur au nombre attendu et provenait majoritairement de la patientèle hospitalière (Nantes étant un centre de référence dans l'asthme sévère). Il existait une réelle difficulté des allergologues libéraux à discerner les patients asthmatiques potentiellement incluables. Les raisons principales que j'ai pu identifier en discutant avec eux lors d'une réunion sont la difficulté à trouver une équivalence clinique à un ACQ > 1 rapidement identifiable lors d'une consultation en dehors de l'exacerbation. L'oubli de proposer l'étude aux patients correspondants aux critères est également fonction de la charge de travail.
- Le recrutement des patients atteints de dermatite atopique était également 3 fois inférieur à celui attendu. Il provenait exclusivement d'une patientèle hospitalière comme convenu à la mise en place de l'étude avec le Dr Claire BERNIER lié au fort recrutement sur l'École de l'Atopie. Les principales raisons identifiées étaient l'oubli de proposer le protocole à un patient correspondant aux critères et la méconnaissance du protocole PREBALL DP auprès des internes du service de dermatologie et des autres praticiens de l'École de l'Atopie.
- Une raison commune à la difficulté de recrutement des patients atteints d'asthme allergiques et de dermatite atopique était le nombre restreint d'investigateurs déclarés (Dr Anaïs PIPET et Dr Claire BERNIER).

Les mesures correctives devaient donc s'attacher à rappeler aux praticiens que le recrutement pour le protocole PREBALL DP est toujours en cours, élargir le cercle des investigateurs. Enfin, nous avons eu l'idée d'informer les patients de l'existence de l'étude en partant de l'hypothèse que certains seraient spontanément motivés pour participer à une étude de recherche clinique. L'objectif idéal étant de revenir au rythme initialement prévu. En réalité, on devrait observer un doublement des inclusions sans retour au rythme initialement prévu.

Afin d'élargir le cercle des investigateurs plusieurs solutions ont été envisagées :

- *Ouvrir l'étude à l'unité d'allergologie générale d'Angers.* Après plusieurs sollicitations sans réponse auprès du Dr Martine DROUET (responsable de l'unité d'allergologie générale au CHU d'Angers), nous avons abandonné cette solution. J'ai appris quelques semaines plus tard que l'unité était en pleine réorganisation et ne pouvait donc se permettre d'accueillir un protocole de recherche clinique. Si cela avait eu

lieu, le protocole PREVALL DP aurait été re-classifié en étude multicentrique (modification substantielle) nécessitant de refaire dossier auprès du CPP et du CCTIRS (Cf. Partie 1, figures 2). Au final, il y aurait eu une perte de temps et l'effet inverse sur le nombre d'inclusion des patients allergiques. Côté financement, l'ouverture multicentrique aurait été couverte par la bourse allouée par le DHU 2020.

- *Ouvrir l'étude à d'autres services* (hospitalisation et consultation) du CHU de Nantes tels que la pneumologie, la dermatologie dans un premier temps afin de palier au manque de patients atteints d'asthme allergique et de dermatite atopique. Afin de faciliter l'inclusion des patients dans l'étude, nous avons obtenu la participation des CIC thorax et d'onco-dermatologie où nous avons fait une réunion de présentation de l'étude. Il a fallu préciser à la demande des CIC certains critères de non inclusions tels que l'antécédent d'immunothérapie spécifique, de cancers, la prise de traitement immunosuppresseurs, immunomodulateurs et anti-microbien au long cours (Annexe 12). Enfin, nous avons inscrit sur la liste des investigateurs les Prs MAGNAN Antoine et BLANC François-Xavier côté pneumologie et les Drs BARBAROT Sébastien et AUBERT Hélène côté dermatologie en informant le CPP par un courrier circonstancié (modification non substantielle).
- Après entretien avec le Pr BATARD Eric (Service des Urgences), il était favorable pour nous aider à inclure des patients dans le protocole PREVALL DP d'autant plus que ce service accueille régulièrement des patients en exacerbation d'asthme (environ 200 par an d'après les données de cotation du service). Cependant le service étant déjà le siège de plusieurs protocoles de recherche clinique, ni le CIC associé au service ni les praticiens ne pouvaient prendre le temps d'inclure les patients. Nous avons donc convenu que tous les patients en exacerbation d'asthme admis aux urgences aurait un RDV de suivi dans les 7 jours via les créneaux de consultation post-urgence disponibles entre la PFTA et le service des Urgences (mercredi après-midi de 16h à 17h ; Dr Anaïs PIPET et Dr Aurélie BARON). La secrétaire de la PFTA a été informée de ne pas combler ses créneaux et d'y placer en priorité les patients provenant des urgences accompagnés de la mention « inclusion dans PREVALL DP ».

Afin de rappeler aux différents praticiens concernés par le protocole PREVALL DP que le recrutement est toujours actif, nous avons opté pour un relance mensuelle par mail des allergologues libéraux, des dermatologues et des médecins urgentistes. Nous avons conçus un

modèle de mail où nous rappelons les critères d'inclusion et de non-inclusion principaux, l'état des recrutements pour chaque groupe (dermatite atopique, asthme allergique et rhinite allergique) en précisant le nombre de patients nécessaires pour compléter l'étude et un remerciement aux différents médecins qui ont participé (Annexe 13).

J'ai également lors de deux réunions de l'AMAAN précisé aux collègues allergologues les situations cliniques les plus fréquentes qui correspondaient à un ACQ > 1. En observant l'ACQ, on s'aperçoit que les situations cliniques sont plus fréquentes qu'on ne le croit. En effet, la situation caricaturale est le patient qui a présenté parfois au cours des 2 à 4 dernières semaines des sifflements et/ou des essoufflements et/ou des oppressions thoraciques et/ou une toux au repos ou à l'effort (nécessité de « faire une pause » ou de « reprendre son souffle ») avec une amélioration sous bronchodilatateur d'action rapide (VENTOLINE, BRICANYL). Il est aussi important de noter que la présence d'un syndrome obstructif et /ou une diminution du VEMS ne sont pas nécessaires pour conclure à un mauvais contrôle de la maladie asthmatique tout comme la présence d'un traitement de fond. La réunion d'au minimum 3 des critères cliniques avec la consommation de bronchodilatateur de courte durée d'action et un VEMS inférieur à 95% de la théorique entraîne de facto un ACQ > 1.

Enfin l'artiste plasticien Jérémy SEGARD a créé une affiche pour représenter le protocole PREVALL DP (Annexe 14). Nous l'avons conçue afin qu'elle puisse à la fois attirer l'attention des patients et se rappeler aux bons souvenirs des praticiens lorsqu'ils la voient. Pour cela, le plan de l'affiche se concentre en premier sur l'allergène étudié (les acariens), les critères d'inclusions majeurs (pas de tabagisme et l'âge) et les pathologies étudiées (asthme, rhinite et dermatite atopique) qui sont figurées par leurs caractéristiques profanes :

- la dermatite atopique gratte
- l'asthme nécessite des inhalateurs
- la rhinite entraîne des éternuements et mouchages réguliers

Les couleurs ont été volontairement choisies vives afin d'attirer l'oeil du patient et des praticiens. Les personnages ont été dessinés simplement (représentation d'une silhouette humaine accueillante) afin que les patients puissent se projeter. Cette affiche est destinée aux cabinets des allergologues libéraux (pour ceux qui veulent activement participer au protocole) et aux services (PFTA, consultation de dermatologie, pneumologie, urgence).

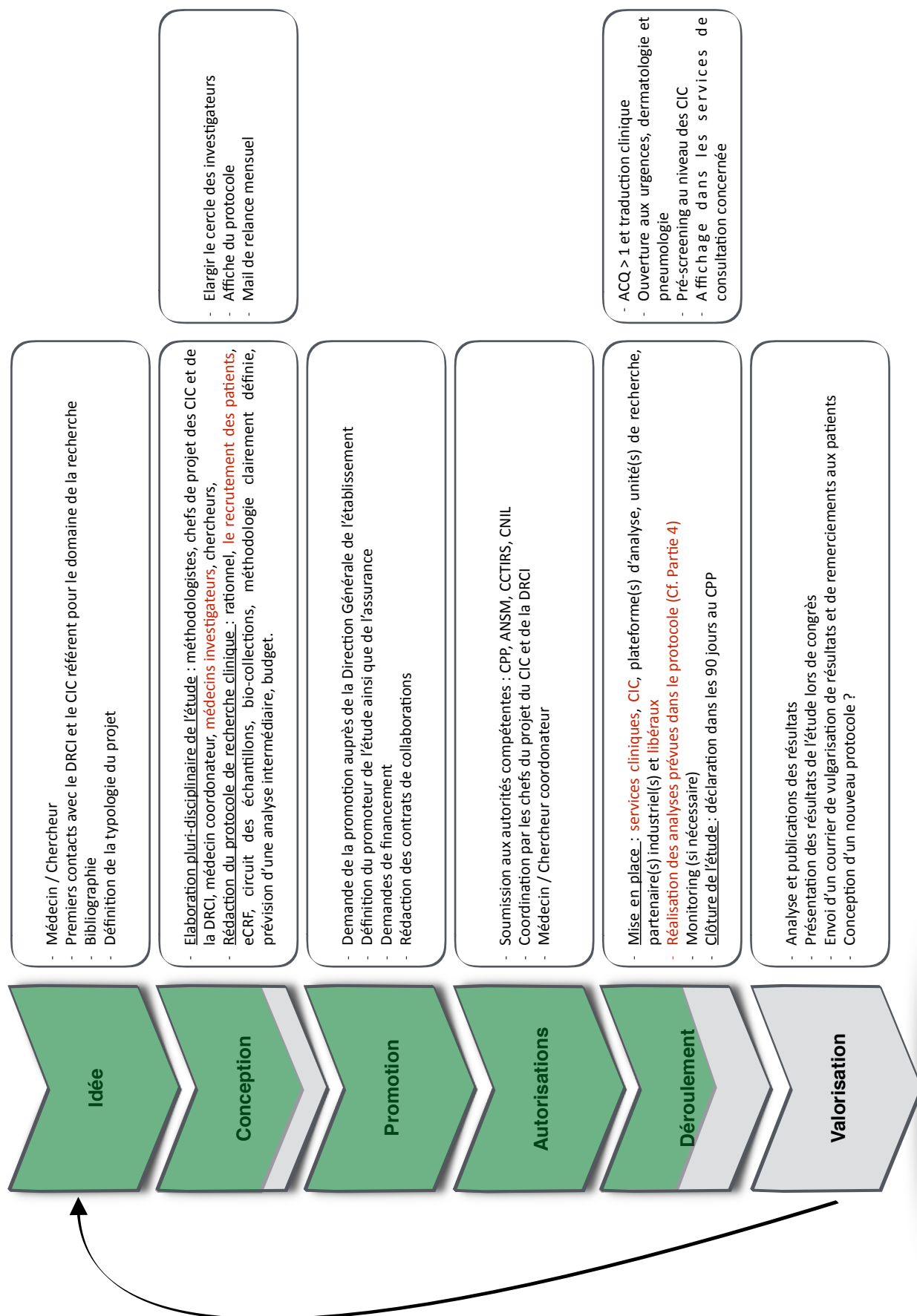


Figure 2 : Tableau de bord du protocole PREVALL DP à 6 mois du début des inclusions

BILAN ACTUEL ET PERSPECTIVES

Concernant les inclusions, nous sommes actuellement à 43 (soit la moitié) pour un total attendu de 90 sur une période d'inclusion de 1 an. A première vue, l'élargissement du cercle des investigateurs, l'ouverture à d'autres services du CHU et l'affiche n'ont pas permis de doubler le rythme des inclusions, rythme qui s'est en revanche maintenu. Il faut cependant regarder de plus près la répartition des inclusions sur l'année, les périodes à hautes et basses inclusions et les groupes de patients (figure 3).

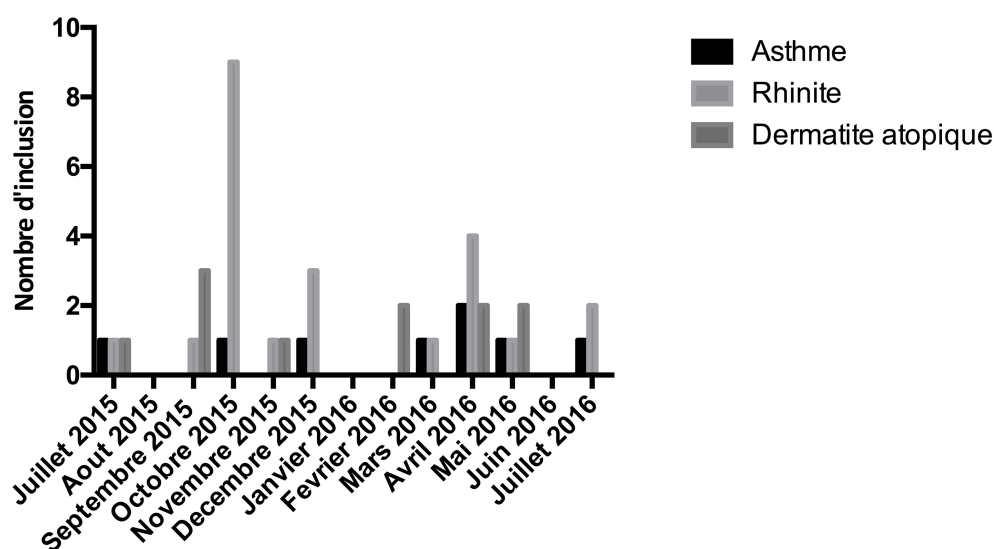


Figure 3 : Répartition des inclusions du protocole PREVALL DP sur l'année 2015/2016.

On observe tout d'abord deux pics d'inclusion qui correspondent aux périodes printanières et automnales. Ces pics correspondent au moment où la charge en acariens domestiques est élevée du fait des conditions climatiques à l'intérieur des habitations (chaleur humide). On retombe donc sur une période d'inclusion effective de 7 mois sur 12 mois durant l'année.

De plus, la première période d'inclusion a vu un fort recrutement de patients atteints de rhinite allergique pour les raisons citées ci-dessus. La mise en place des mesures correctives (mail de relance, explication de l'ACQ > 1 et élargissement du cercle des investigateurs) a permis non seulement de maintenir le rythme des inclusions malgré un infléchissement des inclusions de patients atteints de rhinite allergique. Cela est lié à une augmentation des inclusions des groupes dermatite atopique et asthme allergique (X2 pour le groupe asthme allergique et X1,5 pour le groupe dermatite atopique) sur les mois de mars, avril et mai 2016. Il est important de noter que le doublement des recrutements des patients atteints d'asthme allergique s'est effectué via les

allergologues libéraux. La même constatation a été faite avec les patients atteints de dermatite atopique via les dermatologues hospitaliers.

Le pré-screening des consultations des médecins investigateurs avait été également mis en place auprès des CIC thorax et d'onco-dermatologie afin de faciliter les recrutements auprès des médecins investigateurs. Au sein du CIC thorax, cette stratégie n'a pu aboutir du fait d'un manque de personnel dédié (arrêt maladie) expliquant l'absence d'inclusion via les consultations hospitalières de pneumologie. Au sein du CIC d'onco-dermatologie, cette stratégie a également échoué très certainement liée au manque de rappel auprès de Régis TRIBALIER et d'Anne LEBFEVRE.

Les affiches représentant l'étude n'ont pas été affichées dans les bureaux de consultation et les salles d'attente des services concernés pour des raisons d'impossibilité d'impression au format voulu ! Dans la même veine, les allergologues libéraux l'ont affichée pour seulement 2 d'entre eux au format A4 dans leur salle d'attente et leur bureau de consultation par leur propre moyen. Cet effort d'affichage est encourageant cependant, le format d'impression n'est pas suffisant.

Enfin, le recrutement par les urgences a été nul. Il existe deux freins : la méconnaissance du protocole par les seniors et les internes liée à une information uniquement par mail comme voulue au départ par le Pr BATARD et l'impossibilité d'inclure les potentiels patients au moment de leurs passages aux urgences.

En conclusion, si on rapporte le nombre d'inclusion à la période effective d'inclusion (7 mois) on obtient que le rythme d'un patient tous les deux jours et demi. Si le rythme est poursuivi tel quel il faudra donc un cycle supplémentaire des périodes automnales et printanières pour boucler les inclusions dans chaque groupe ce qui fait 2 ans d'inclusion totale et une période effective d'inclusion de 14 mois (soit un peu plus d'un an telle que attendue au départ). Il faut cependant avouer que ce point n'avait pas été envisagé au moment de la création de l'étude (Cf. remarque d'un rapporteur de l'étude pour le financement du DHU 2020, Partie 2 annexe 5). Enfin, le maintien du rythme des inclusions s'est également fait sans que toutes les mesures correctives ne soient appliquées (affichage, recrutement par les urgences et les consultations de pneumologie). Il y a donc un potentiel pour augmenter le rythme des inclusions.

Quelles nouvelles mesures pourront donc être mises en place ? Et ce d'autant plus que nous allons rentrer dans la période automnale qui sera propice aux inclusions ! (Figure 4)

- Afin de poursuivre l'inclusion via les allergologues libéraux et des dermatologues hospitaliers, nous allons continuer les mails de relance mensuels en insistant sur l'asthme pour les confrères libéraux (ajout d'un paragraphe explicatif de l'ACQ > 1).

- Revoir avec chaque CIC, la mise en place du pré-screening des plannings de consultation des médecins investigateurs en dermatologie et pneumologie. Au plan pratique, il faut définir un ARC responsable de cette tâche chaque début de semaine.
- Etendre la connaissance du protocole aux internes des services concernés (clinique dermatologique et clinique pneumologique) après accord du chef de service avec un rappel physique hebdomadaire aux internes par moi-même. En pratique, il faudra organiser une présentation rapide de l'étude lors de la réunion du changement d'interne fin octobre/début novembre 2016. Il faudrait également remettre aux internes un flyer créé le CIC correspondant résumant les différentes études cliniques en cours.
- Revoir la possibilité d'impression de l'affiche en format A2 (420mm x 504mm) ou A1 (504mm x 441mm) selon le site d'affichage.
- Si l'on souhaite conserver la possibilité de recrutement par les urgences, il faudrait présenter le protocole PREVALL DP au moment de la réunion de rentrée des internes du prochain semestre avec remise d'un flyer résumant le protocole et la marche à suivre pour l'inclusion. La présentation du protocole aux seniors pourrait se faire lors d'un staff hebdomadaire un midi (le mercredi) où nous en profiterions pour remettre au goût du jour la consultation de suivi post-urgence de pneumo-allergologie (nécessite l'accord du Pr BATARD et Pr BLANC).

Une relance physique pluri-hebdomadaire des seniors et des internes serait nécessaire. Nous abandonnons le mail de relance.

Le problème de l'inclusion pourrait être contourné de deux manières complémentaires :

- l'inclusion en journée pourrait être effectuée par l'interne d'allergologie ou l'assistant d'allergologie.
- l'inclusion en période nocturne nécessiterait de conserver la procédure actuelle avec l'envoi d'un fax ou d'un mail au secrétariat de la PFTA qui fixera un RDV post-urgence aux horaires ouvrables. On peut également prévoir la prescription directe de la consultation post-urgences de pneumo-allergologie par les internes et praticiens des urgences via le nouveau logiciel de soin (PowerChart Millénium, CERNER) qui sera mis en place le 19 septembre 2016 à la PFTA sous réserve de possibilité à voir avec l'équipe informatique du CHU de Nantes.

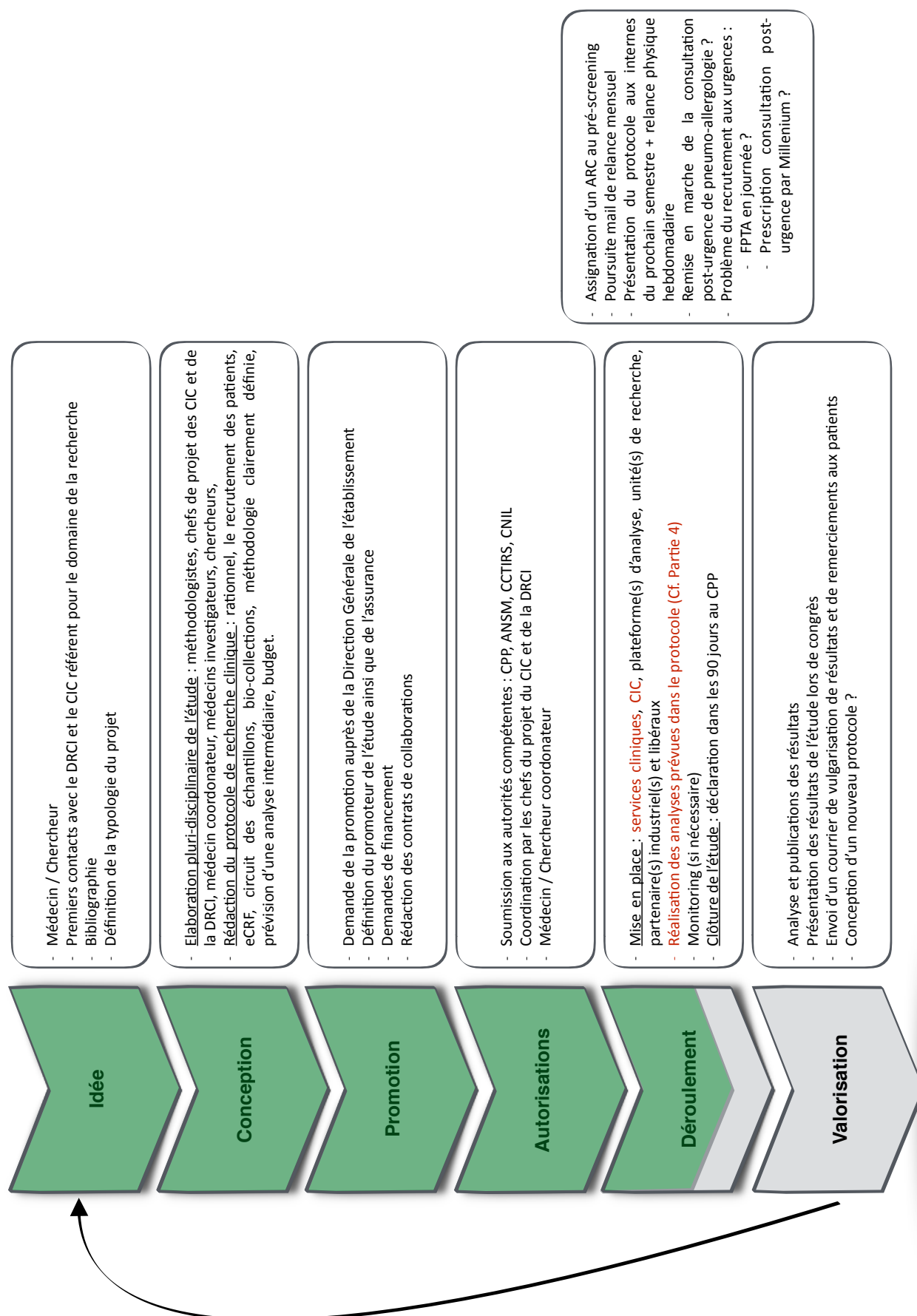


Figure 4 : Tableau de bord du protocole PREVALL DP à 12 mois du début des inclusions

ANNEXES

Liste des annexes

Annexe 1	Autorisation de début du protocole PREVALL DP
Annexe 2	Schéma des échantillons biologiques fournis par le laboratoire BIOFORTIS
Annexe 3	Tableur des correspondances entre les codes d'anonymisation du laboratoire BIOFORTIS et le protocole PREVALL DP
Annexe 4	Fiche récapitulative du protocole pour les allergologues libéraux
Annexe 5	Fiche récapitulative du protocole et des prélèvements associés pour les IDEs.
Annexe 6	Bon d'adressage des échantillons des patients allergiques à l'IRT-UN
Annexe 7	Bon d'adressage des échantillons des patients allergiques au CIMNA
Annexe 8	Tableur de gestion des échantillons de la bio-collection du protocole PREVALL DP
Annexe 9	Devis du CIMNA
Annexe 10	Aide à la saisie des données pour les e-CRF du protocole PREVALL DP
Annexe 11	Compte rendu de la réunion de suivi du protocole PREVALL DP du 21/12/2015
Annexe 12	Spécification des critères de non-inclusion
Annexe 13	Modèles de mail de relance pour les investigateurs et praticiens impliqués dans le protocole PREVALL DP.
Annexe 14	Affiche représentant le protocole PREVALL DP

Annexe 1

PÔLE DIRECTION GÉNÉRALE ET STRATÉGIE

5, allée de l'Île-Gloriette
44093 Nantes cedex 1

T. 02 40 08 72 42
F. 02 40 08 71 57
direction.generale@chu-nantes.fr

DIRECTEUR GÉNÉRAL
Philippe Sudreau

DIRECTEUR GÉNÉRAL ADJOINT
Hubert Jaspard



Madame Docteur Claire BERNIER
CHU de Nantes
Plateforme transversale d'allergologie
Hotel Dieu
Place Ricordeau
44093 Nantes cedex 1

AFFAIRES MÉDICALES
ET RECHERCHE
Anne-Claire de Reboul
DIRECTRICE

T. 02 40 08 72 42
F. 02 40 08 71 57

COMMUNICATION
ET AFFAIRES GÉNÉRALES
Marie Lapostolle
DIRECTRICE

T. 02 40 08 72 42
F. 02 40 08 71 57

PILOTAGE « ACTIVITÉS -
RESSOURCES » ET
CONTRACTUALISATION INTERNE
Sophie Douté
DIRECTRICE

T. 02 40 08 70 20
F. 02 40 08 71 57

USAGERS, RISQUES ET QUALITÉ
Benjamin Lapostolle
DIRECTEUR

T. 02 40 08 70 90
F. 02 40 08 70 64

ACHATS
Jean Verger
DIRECTEUR

T. 02 40 84 67 39
F. 02 40 84 68 55

Objet: Autorisation à débiter les inclusions

Affaire suivie par

Maxime Lebeaupin

Email : maxime.lebeaupin@chu-nantes.fr

Direction des affaires médicales et de la recherche

Direction de la recherche

Département promotion

Tél. 02.53.48.28.18

RC14_0372

Nantes, le 4 juin 2015

Madame le Docteur,

Les démarches administratives auprès du Comité de Protection des Personnes et de l'autorité compétente ayant été accomplies, et la visite de mise en place étant programmée le vendredi 26 juin prochain, le Centre Hospitalier Universitaire de Nantes, en tant que promoteur de la recherche RC14_0372 visant à évaluer les soins courants

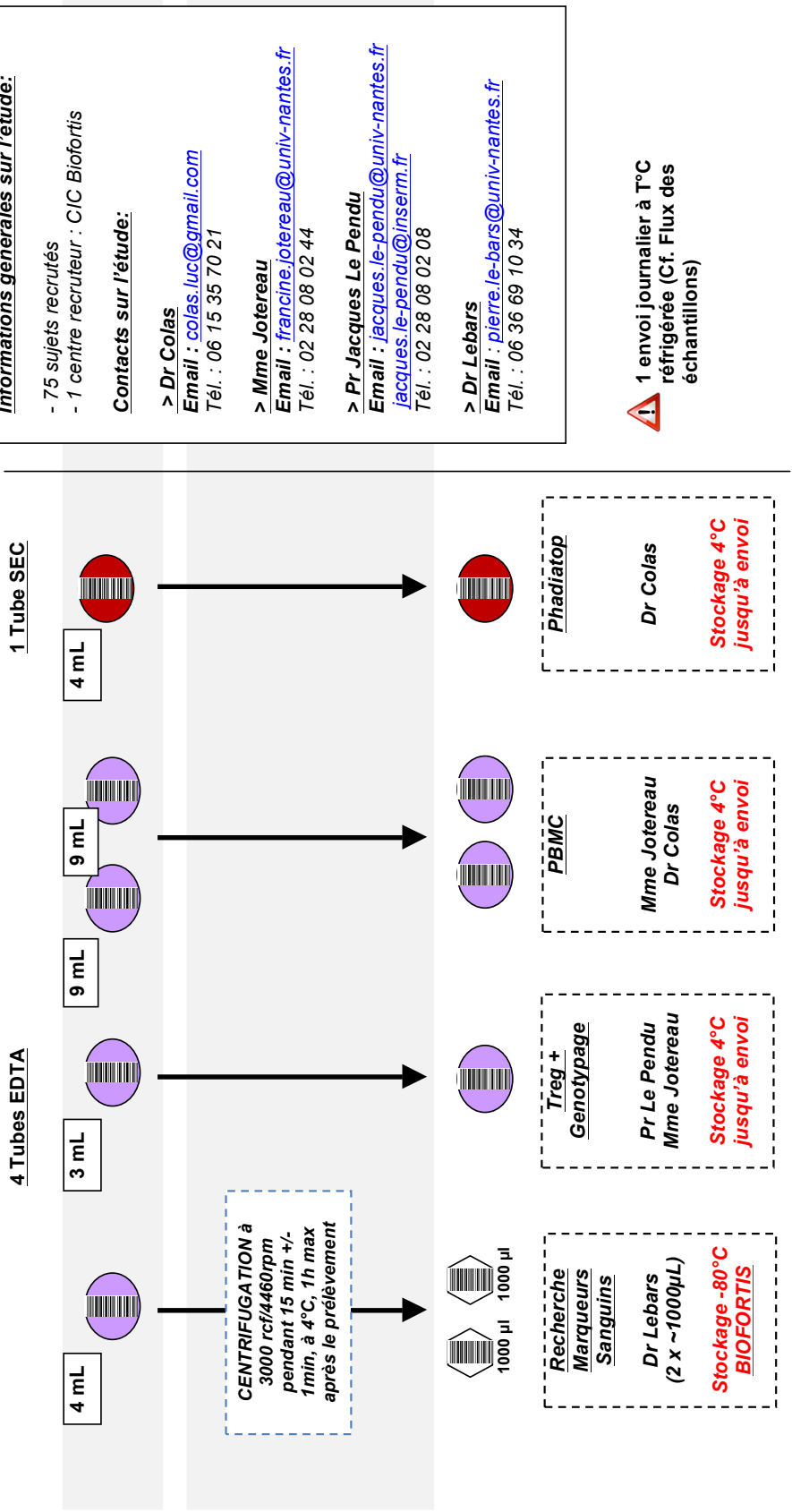
« Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique (titre abrégé : Prévall-DP) »

vous autorise à débiter les inclusions pour l'essai sus cité à compter du 4 juin 2015.

Nous vous prions de croire, Madame le Docteur, en l'assurance de notre considération la meilleure.

Sabrina Le BOUTER
Responsable de la cellule RNI – Soins courants

Prélèvements sanguins :
Pour analyse directe



Annexe 3

Equivalence étiquetage Biofortis et INSERM/CHU - Étude GOMMS

numéro d'anonymisation Biofortis	numéro d'anonymisation INSERM/CHU
NS 001	
NS 002	
NS 003	
NS 004	
NS 005	
NS 006	
NS 007	
NS 008	
NS 009	
NS 010	
NS 011	
NS 012	
NS 013	
NS 014	
NS 015	
NS 016	
NS 017	
NS 018	
NS 019	
NS 020	
NS 021	
NS 022	
NS 023	
NS 024	
NS 025	
NS 026	
NS 027	
NS 028	
NS 029	
NS 030	
NS 031	
NS 032	
NS 033	
NS 034	
NS 035	
NS 036	
NS 037	
NS 038	
NS 039	
NS 040	
NS 041	
NS 042	
NS 043	
NS 044	
NS 045	
NS 046	
NS 047	
NS 048	
NS 049	
NS 050	
NS 051	
NS 052	
NS 053	
NS 054	
NS 055	
NS 056	
NS 057	
NS 058	
NS 059	
NS 060	
NS 061	
NS 062	
NS 063	
NS 064	
NS 065	
NS 066	
NS 067	
NS 068	
NS 069	
NS 070	
NS 071	
NS 072	
NS 073	
NS 074	
NS 075	

Code d'anonymisation INSERM/CHU
EC n°X - Date de prélèvement

Code d'anonymisation Biofortis:
NS X

Annexe 4

Protocole Prévall DP

Protocole Prévall DP

N° d'enregistrement : n°2014-A01759-38

Ref : RC14_0372

Ref CPP : 15/02-964

« Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique. »

Investigateur Coordonnateur :

Dr Bernier Claire
Plateforme Transversale d'Allergologie
CHU Hôtel Dieu
1 place Ricordeau
44 000 NANTES
Tel : 00 33(0)2 40 08 31 41
Fax : 00 33 (0)2 40 48 21 81
E-mail : claire.bernier@chu-nantes.fr

Méthodologiste :

Béatrice Guyomarc'h
L'institut du thorax
Hôpital Laënnec
Boulevard Jacques Monod
44093 Nantes Cedex 01
Tel : 00 33 (0)2 40 16 58 59 E-mail : beatrice.guyomarch@univ-nantes.fr

Etablissement responsable de la recherche :

CHU de Nantes

Direction de la recherche - département promotion
5, allée de l'île Gloriette
44 093 Nantes cedex 01 (FRANCE)



Tel : 02 53 48 28 35
Fax : 02 53 48 28 36
rderecherche@chu-nantes.fr

Protocole Prévall DP

RESUME

Titre de l'étude	Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique.
Mots clés	Lymphocyte T régulateur, lymphocyte T double positif, <i>F Prausnitzii</i> , sang périphérique, asthme allergique, rhinite allergique, dermatite atopique.
Promoteur de l'étude	CHU DE NANTES
Investigateur coordonnateur	Dr Bernier Claire
Nombre de centres prévus	1 : CHU de Nantes
Type d'étude	Physiologie, physiopathologie
Planning de l'étude	❖ Durée totale : 2 ans ❖ Démarches réglementaires : 4 mois ❖ Période de recrutement : 1 an ❖ Durée de suivi par patient : 1 jour ❖ Durée des analyses : 8 mois
Design de l'étude	❖ Monocentrique ❖ Transversale ❖ Contrôlée ❖ Non Randomisée ❖ Simple insu
Objectifs de l'étude	<u>Objectif principal</u>: Mise en évidence d'une diminution quantitative des lymphocytes T doubles positifs (CD4+/CD8+) du sang périphérique spécifique de <i>F prausnitzii</i> chez les patients atteints d'asthme allergique, de rhinite allergique et de dermatite atopique ainsi que par rapport aux échantillons contrôles. <u>Objectifs secondaires</u> : - existe-t-il une corrélation entre les taux de lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique et le niveau de contrôle de la maladie allergique ? - la mise en évidence d'un phénotype régulateur après prolifération avec <i>F prausnitzii</i> - existe-t-il une corrélation entre le taux de prolifération des lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique spécifiques de <i>F prausnitzii</i> et le niveau de contrôle de la maladie allergique ? - existe-t-il une prolifération des lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique en présence d'acariens (<i>Dermatophagoïdes pteronyssinus</i>) ?
Nombre de cas prévisionnel	90 (30 patients par groupes = asthme allergique, dermatite atopique, rhinite allergique)

Protocole Prévall DP

Calendrier des visites et examens	1 journée à la plateforme transversale d'allergologie pour l'inclusion et le prélèvement, Hôtel Dieu, CHU de Nantes
Critères d'inclusion	<u>Critères d'inclusion communs :</u> • Patient âgé de 18 à 70 ans • Le patient est non-fumeur • Le patient présente un BMI inférieur à 30 kg/m² Le patient ne présente pas de contre-indication à la réalisation de prick test. • Le sujet a donné son accord pour participer à l'étude et la collection • Le sujet est affilié à un régime de sécurité sociale 1. <u>Critères d'inclusion spécifiques des patients avec rhinite allergiques :</u> • Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique dûment diagnostiquée selon les critères ARIA (cf annexe 7) • Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique classée persistante légère ou persistante modérée à sévère selon les critères ARIA (cf annexe 7) • Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique non contrôlée selon les critères ARIA avec ou sans traitement. (cf annexe 7) • Le patient présente une rhinite et/ou une conjonctivite imputable à la présence d'acariens • Le patient présente une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif pour le laboratoire 2. <u>Critères d'inclusion spécifiques des patients avec dermatite atopique :</u> • Le patient présente une dermatite atopique (cf grille diagnostique) classée modérée (SCORAD entre 25 et 50) ou sévère (SCORAD > 50). (cf annexe 8) • Le patient doit présenter une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif pour le laboratoire 3. <u>Critères d'inclusion spécifiques des patients avec asthme allergique :</u> • Le patient présente un asthme allergique diagnostiqué selon les critères GINA²¹ (cf annexe 6) • Le patient présente un asthme classé persistant léger à persistant sévère selon les critères GINA²¹ (cf annexe 6) • Le patient présente un asthme partiellement contrôlé ou non contrôlé selon l'ACQ²⁴⁻²⁵ (ACQ>1) avec ou sans traitement. (cf annexe 6) • Le patient doit présenter une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif pour le laboratoire

Protocole Prévall DP

Critères de non-inclusion	• Le patient est incapable majeur ou majeur protégé • Le patient prend un traitement antimicrobien (antibiotique, antifongique ou antiviral) au long cours pour quelque raison que ce soit • Le patient a été en contact avec une bactérie multi-résistante • Le patient a bénéficié ou bénéficie d'une immunothérapie spécifique • Antécédent de cancer du système hématopoïétique (mastocytose incluse) • Antécédent de déficit immunitaire acquis par le virus HIV. • Le patient présente un déficit immunitaire congénital • Le patient présente une maladie inflammatoire du tube digestif • Le patient présente une maladie auto-immune et/ou inflammatoire qu'elle soit traitée ou non • Le patient a bénéficié d'une transplantation d'organe solide ou d'une greffe de cellules hématopoïétiques • Le patient est toxicomane • Le patient est une femme enceinte ou en âge de procréer sans contraception efficace • Le patient présente une défaillance d'organe sévère aigue ou chronique (insuffisance cardiaque, insuffisance respiratoire, insuffisance hépatique, insuffisance rénale, malabsorption). • Le patient parle difficilement français et/ou comprend difficilement le français • Le patient est dans l'incapacité de suivre le protocole • Le patient refuse la réalisation des prick-test
Critère de jugement principal	Le critère de jugement principal est le pourcentage moyen de lymphocytes T doubles positifs CD4+/CD8+ par rapport aux pourcentages moyen des lymphocytes T totaux (CD3+), des lymphocytes CD4+ et du nombre total d'éléments figurés du sang périphérique par rapport aux échantillons contrôles.
Critères de jugement secondaires	- La présence ou non d'une prolifération en présence de <i>F prausnitzii</i>. - la mise en évidence de marqueurs régulateurs tels que CTLA4, LAG3, CD25 et GITR sur les DP8 après prolifération avec <i>F prausnitzii</i> - Le taux de prolifération moyen des lymphocytes T doubles positifs spécifiques de <i>F prausnitzii</i> en présence de différentes espèces bactériennes dont <i>F prausnitzii</i>. - Evaluation du degré de sévérité de la maladie allergique : - SCORAD pour la dermatite atopique²³ - Sévérité de l'asthme selon l'ACQ²⁴⁻²⁵ - Sévérité de la rhinite allergique selon l'ARIA²² - Le taux de prolifération moyen des lymphocytes T doubles positifs spécifiques d'acariens (<i>Dermatophagoïdes ptérynyssinus</i>).
Etude ancillaire :	Non applicable
Autres évaluations	Non applicable
Analyse statistiques	Les analyses statistiques porteront sur des analyses descriptives de chaque population de lymphocytes T double positifs CD4+/CD8+. Une comparaison des moyennes de ces populations sera effectuée entre les trois groupes de patients et les échantillons contrôles. Des t-tests et des ANOVA permettront de tester les différences entre les groupes.

Protocole Prévall DP

PROCÉDURE D'INCLUSION DES PATIENTS VUS PAR LES ALLERGOLOGUES LIBÉRAUX

Plages de **consultation** ouvertes pour l'inclusion de vos patients dès le 8 Juin 2015 :

- Le RDV sera fixé avec les possibilités du patient
- Maximum de **5 patients** par journée

Vous avez vu en consultation un patient potentiellement incluable dans le cadre du protocole Prévall DP (Cf. critères d'inclusion et de non-inclusion au dessus) :

- Vous pouvez m'appeler directement en passant par le standard au **02 40 08 33 33** puis demander le poste **70119** (bip de l'interne d'allergologie).
- Vous pouvez m'envoyer un mail avec les coordonnées complètes du patient, pour que je le convoque directement en consultation.
mail : colas.luc@gmail.com

Documents à fournir pour l'inclusion :

- Résultats des prick-tests aux aéro-allergènes
- Résultats des recherches d'IgE spécifiques aux acariens si faites
- Résultats des EFRs
- Résultats des tests de procovations si faits

Annexe 5

Fiche explicative pour IDE

Protocole Prévall DP : Prélèvements sanguins des patients inclus

Patient de la PFTA inclus pour participer à l'étude clinique Prévall DP :
« Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique. »

- ★ Prendre les **kits de prélèvements spécifiques fournis** pour l'étude Prévall DP.
Chaque kit contient 2 pochettes avec les tubes à prélever et les adresses de destination des prélèvements:
 - 1 pochette avec un bon d'immunologie 2 pré-rempli pour le dosage des DP8aa avec 1 tube EDTA de 4 mL.
 - 1 pochette avec le bon d'adresse à l'IRT-UN UMR 1087-équipe 6 salle 208 avec 3 tubes EDTA de 9mL et 1 tube EDTA de 4mL pour les PBMC.
- ★ **A prélever : 5 tubes par ponction veineuse périphérique**
 - **3 tubes EDTA de 9 mL** (pour extraire et congeler les PBCM)
 - **2 tubes EDTA de 4 mL** (1 tube pour le dosage des DP8aa sur sang frais et 1 tube pour compléter les PBMC)
- ★ **Etiquetage des prélèvements :**
 - Concernant la pochette destinée au dosage des DP8aa :
 - ♣ Mettre une étiquette de la PFTA UF 3013 sur le bon d'immunologie 2 (pré-fait)
 - ♣ Mettre **une étiquette au nom du patient** sur le bon d'immunologie 2
 - ♣ Mettre **une étiquette au nom du patient** sur le tube EDTA de 4mL
 - Concernant la pochette destinée à l'extraction des PMBC :
 - ♣ Mettre sur le bon **l'étiquette d'anonymisation** pré-remplie par le médecin
 - ♣ Mettre sur les tubes EDTA (3 tubes de 9mL et 1 tube de 4mL) **les étiquettes d'anonymisation** pré-remplies par le médecin
- ★ **Envoi**
Les échantillons sont à envoyer par **valise interne** au CRTE (centre de réception et traitement des échantillons).

Exp : Plateforme d' Allergologie

9^{ème} Nord Hôtel Dieu

Tél service : 82-180

Dr Colas luc : 06-15-35-70-21

Dest : Institut du Thorax

INSERM U 1087 – CNRS UMR 6291

Bureau 208

8 Quai Moncoussu

IRS-UN – 2^{ème}

Tél : 02-28-08-01-24 (25)

Prélevé le :

Protocole PREVALL DP RC 14_0372

A l'attention de : Jennifer LOY

Eugénie DURAND

Damien REBOULLEAU

Tél : (0) 02 28 08 01 24 (ou 25)

***CRTÉ : A reception appeler
et mettre dans la boîte "COLT"***
Armoire grise externe entrée plateau des laboratoires

CHU de NANTES BIOLOGIE		LABORATOIRE D'IMMUNOLOGIE - 2		Etude des sous populations lymphocytaires et des fonctions lymphocytaires		TEL 02.40.08.40.65. ou 02.40.08.40.24.	
<u>Mentions obligatoires concernant le prélèvement</u>		DATE :	Préleveur :	Prescripteur : COLAS Luc	Signature :		
HEURE :		Tél. :	Tél. ou Bip :	06-15-35-70-21			
BILAN STANDARD - Tube EDTA - 5 ml		Dosage d'IFN- Quantiferon - TB - GOLD - IT					
☐ LYT Lymphocytes T	CD3 - CD4 - CD8	☐ QFN Prélèvement sur 3 tubes spécifiques à demander au Centre de Gestion des Laboratoires					
☐ BT Lymphocytes T, B, NK	CD3 - CD4 - CD8 - CD19 - CD16/56	RENSEIGNEMENTS CLINIQUES :					
☐ TRPV Traitement par anti-CD3	CD2 - CD3 - CD19 - CD16/56	☐ - Enquête autour d'un cas					
☐ RITUX Traitement par anti-CD20	CD3 - CD19 - CD20 - CD16/56	☐ - Surveillance du personnel dans les services à risque et embauche					
SUIVI HIV - Tube EDTA - 5 ml		☐ - Diagnostic de tuberculose extrapulmonaire					
☐ LYT Lymphocytes T	CD3 - CD4 - CD8	☐ - Traitement par anti TNF					
PROTOCOLE		ANOMALIES FONCTIONNELLES DES POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES (PNNS)					
NOM du protocole :		☐ DHR Métabolisme oxydatif (Test à la DHR)					
LAVAGE BRONCHO ALVEOLAIRE sur rendez-vous tél. 84 024 ou 84 065		☐ ADHES Exploration des molécules d'adhésion					
☐ LBA1 Lymphocytes T Transmettre en urgence au laboratoire	CD3 - CD4 - CD8	1 tube hépariné + 1 tube hépariné d'un témoin					
RENSEIGNEMENTS CLINIQUES		Etude Prevall DP RC14 0372					
☐ Suspicion déficit immunitaire	Date de greffe :	Saisie CRTE:					
☐ Bilan pré-greffe	Traitement immunosupp. : ☐ oui ☐ non	Test : LYT , DP8A					
☐ Bilan post-greffe	Protocole de traitement	Protocole: P140372					
☐ Rejet greffe							
☐ Autres :							
		1522		NUMERO PATIENT		LABORATOIRE	
ALLERGO-DERMATOLOGIE HD							
Téléphone : 82182							

Annexe 8

Patients atteints d'asthme allergique

[illegible]

Patients atteints de rhinite allergique

Nom	Prénom	DDN	IPP	Date de l'inclusion	Code d'anonymisation	Information fin protocol
				21/07/15	LE3-10/1983-RA	
				21/09/15	LC7-07/1968-RA	
				02/10/15	CK8-01/1975-RA	
				06/10/15	GP9-12/1979-RA	
				14/10/15	PA10-10/1994-RA	
				19/10/15	RT11-10/1981-RA	
				20/10/15	GJ12-07/1993-RA	
				21/10/15	CC14-11/1979/RA	
				26/10/15	LC15-02/1979-RA	
				26/10/15	GP16-07/1991-RA	
				27/10/15	CA17-01/1992-RA	
				16/11/15	BIG18-06/1976-RA	
				07/12/15	BC20-05/1988-RA	
				09/12/15	BH21-11/1990-RA	
				16/12/15	PF23-08/1995-RA	
				30/03/16	PS27-07/1998-RA	
				06/04/16	DS29-04/1981-RA	
				11/04/16	MJ30-10/1994-RA	
				15/04/15	TA33-06/1987-RA	
				27/04/16	KM34-04/1993-RA	
				18/05/81	MS37-11/1981-RA	
				20/07/16	CM40-07/1977-RA	
				01/08/16	CE42-06/1996-RA	

Patients atteints de dermatite atopique

[illegible]

Annexe 9



Centre d'Immunomonitorage Nantes Atlantique Laboratoire d'Immunologie Biologique

Directeur
Professeur Régis JOSIEN
Tel : 02 40 08 49 22
Email : regis.josien@chu-nantes.fr

PH Responsable de plateforme
Docteur Marie RIMBERT
Tel : 02 40 08 42 88
Email : marie.rimbert@chu-nantes.fr

Ingénieurs R&D
Docteur Cécile BRAUDEAU
Tel : 02 40 08 42 88
Email : cecile.braudeau@chu-nantes.fr
Docteur Karine AMOURIAUX
Email : karine.amouriaux@univ-nantes.fr

Techniciens
Marine ALIAGA
Caroline TERRIEN
Audrey BESANCON
Stéphanie GIRAUDET

Fax : 02 40 08 42 14

DEVIS DE PRESTATIONS CIMNA

Ref : CIMNA 2015-031/PHAD DP8a étude PREVALL DP

Date : 06/03/15

CHU NANTES - HOTEL DIEU
5, allée de l'Île Gloriette - 44093 NANTES CEDEX 1
N°SIREN 264 400 136
www.chu-nantes.fr

Centre d'Immunomonitorage Nantes Atlantique
Laboratoire d'Immunologie Biologique

Identification prestations	Immunophénotypage des lymphocytes T Doubles Positifs 8 alpha (LyT DP8α) PHADIATOP sur IMMUNOCAP 250
Référence du devis	CIMNA 2015-30
A l'attention du demandeur	Dr Claire Bernier
Emis par	Pr. Régis JOSIEN CIMNA Laboratoire d'Immunologie Biologique, Pôle de Biologie CHU Nantes 9 quai Moncousu, 44093 Nantes Cedex 1 Tel : 02 40 08 49 22 Regis.josien@chu-nantes.fr
Validité (6 mois)	06/09/2015
Date d'édition	06/03/2015

Prestations détaillées :

Dosage des LyT DP8a par Cytométrie en flux (3tubes):

1. tube contrôle iso : CD45 PerCp + CD3PB + CD4 FITC + IgG APC
2. tube positif : CD45 PerCp + CD3PB + CD4 FITC + CD8APC
3. tube pour la valeur absolue (tube trucount +CD45+CD3+CD4+CD8)

Dosage PHADIATOP sur IMMUNOCAP 250 : Réactifs PHADIA.

Coût des prestations :

Dosage des LyT DP8a:

50 € par dosage pour l'ensemble des 3 tubes.

Soit pour 120 dosages (30 biofortis +90 patients allergiques) : 6000 €

Dosage PHADIATOP :

Cotation nomenclature : B50 :13.50€

Soit pour 75 Témoins : 1012.50€

Item	COÛT des PRESTATIONS	
5.72	Temps personnel	2805.0
5.72	Achat : réactifs, consommable	4207.5
	TOTAL HT	7012.5€
	TVA 20%	1402.5€
	TOTAL TTC	8415.0€

Centre d'Immunomonitorage Nantes Atlantique
Laboratoire d'Immunologie Biologique

Conditions du devis

- 1) Modalités de paiement : Dès approbation du présent devis
- 2) Tarifs appliqués (si applicables) : NA
- 3) Rupture de contrat : en cas de rupture de contrat de la part du client, tous les coûts engagés par le CIMNA seront dus

Emetteur	Demandeur
Professeur Régis JOSIEN Directeur CIMNA, Laboratoire d'Immunologie, CHU Nantes	Pour le Dr Claire Bernier
	<u>Adresse de facturation:</u> CHU de Nantes Direction de la Recherche Département promotion 5 allée de l'île Gloriette 44093 Nantes cedex 1
Référence Easydore : RC13_0107_2	<u>Référence Easydore de la ligne budgétaire</u> (si gérée par le CHU) : RC14_0372. Ligne 5.72
Date :	Date : 30/03/2015
Signature :	Signature avec mention « bon pour accord » :

Centre d'Immunomonitorage Nantes Atlantique

Laboratoire d'Immunologie Biologique

1. Sauf stipulation contraire expressément convenue et écrite entre les parties, les commandes reçues par le CIMNA – CHU de Nantes et les marchés qu'il traite sont soumis aux conditions générales de vente ci-après définies. Ces termes et conditions s'appliquent à tous les services fournis par le CIMNA – CHU de Nantes.

2. Les informations contenues dans les brochures, listes de prix et autres documents transmis au client préalablement à la rédaction du devis ci-joint ne constituent pas un engagement du CIMNA – CHU de Nantes, qui se réserve le droit de modifier les informations contenues dans ces documents et de modifier les tarifs indicatifs qu'ils prévoient en fonction des demandes du client.

3. Seules les commandes émises par le client sous la forme d'un document faisant office de bon de commande (d'un contrat, ou sur papier à en-tête du client, par fax ou par lettre officielle du client ou en utilisant, le cas échéant, le formulaire d'envoi d'échantillons standard fourni par le CIMNA – CHU de Nantes, ainsi que les commandes téléphoniques du client, sous réserve de celles-ci soient expressément confirmées par écrit) seront prises en compte. L'envoi d'échantillons par le client équivaut à l'acceptation par ce dernier des présentes conditions de ventes et constitue une commande ferme et définitive.

Prix et livraison

4. Les prix indiqués sont entendus en Euros et hors taxes et sont basés sur les tarifs en vigueur au moment auquel les offres sont émises. Les taxes applicables et leurs taux sont ceux en vigueur à la date de facturation.

5. Les délais de livraison et les délais de réalisation des analyses sont indiqués à titre d'information et ne constituent en aucun cas un engagement du CIMNA – CHU de Nantes. Nonobstant cette réserve, le CIMNA – CHU de Nantes s'engage à faire ses meilleurs efforts pour respecter les délais indiqués.

6. Les résultats peuvent être transmis au client par tout moyen permettant d'en accuser réception, à l'attention des personnes mentionnées dans le document faisant office de bon de commande.

Modalités de paiement

7. Les factures sont payables dans les cinquante (50) jours à compter de la date de signature du devis et de l'apposition de la mention « bon pour accord », sauf stipulation contraire expressément convenue par écrit entre les parties.

8. Tout paiement non reçu à la date prévue par l'article 7 portera automatiquement intérêt au taux légal à compter de cette date.

9. Le client fournira au CIMNA – CHU de Nantes un acompte correspondant à 30% du montant total de la facture TTC au moment de la signature du devis. La réalisation des prestations ne commencera qu'après complet paiement de l'acompte.

Transfert de propriété

10. La propriété et le droit d'utilisation des résultats (rapports et résultats d'analyses) ne sont transférés au client qu'après complet paiement du prix convenu entre les parties et mentionné dans le devis, ou tout contrat ultérieurement conclu entre les parties.

11. Les résultats bruts des analyses sont la propriété du client dans les conditions prévues par l'article 10. Toutefois, le CIMNA-CHU de Nantes se réserve le droit de les utiliser, à des fins de recherche interne exclusivement.

Garanties et responsabilité

12. L'envoi des échantillons relève de la responsabilité du client. La responsabilité du CIMNA – CHU de Nantes ne pourra en aucun cas être engagée si les échantillons fournis par le client ne respectent pas les conditions de transport et de livraison prévues par le devis.

13. Le CIMNA – CHU de Nantes s'engage à réaliser les prestations conformément au devis dans le respect des règles de l'art et à mettre en œuvre toute diligence requise. Le client ne saurait tenir le CIMNA – CHU de Nantes responsable de l'échec de la réalisation des prestations étant donnée leur nature expérimentale et donc aléatoire, dans la mesure où le CIMNA – CHU de Nantes aurait fait toute diligence pour réaliser les prestations. Dans le cadre du présent devis, le CIMNA – CHU de Nantes est tenu à une obligation de moyens.

Le CIMNA – CHU de Nantes informera le client des résultats des prestations objet du présent Contrat par l'intermédiaire d'un rapport final. Le CIMNA – CHU de Nantes ne s'engage à aucune garantie relative aux résultats des prestations, notamment concernant leur liberté d'exploitation et leur appropriation de quelque manière que ce soit.

Les prestations de service objet du présent devis sont effectuées à titre non exclusif. Le CIMNA – CHU de Nantes se réserve la possibilité de mettre en œuvre son savoir-faire pour la réalisation de prestations de service analogues pour le compte de tiers.

14. Chaque rapport de résultats d'analyse se réfère uniquement aux échantillons reçus par le CIMNA – CHU de Nantes de la part du client, dont les références sont indiquées dans le rapport.

15. Le CIMNA – CHU de Nantes met en œuvre toutes les précautions raisonnables pour le stockage et la manipulation des échantillons, et ne pourra être tenu pour responsable de la perte ou de la destruction des échantillons qu'en cas de faute ou de négligence de sa part.

16. Les échantillons sont détruits par le CIMNA – CHU de Nantes après une période de trois (3) mois suite à la réalisation des prestations prévues par le devis, à moins que le client n'indique par écrit que les échantillons ne doivent pas être détruits. Dans un tel cas, les frais et les méthodes de stockage doivent faire l'objet d'une clause spécifique dans le devis ou d'un contrat.

17. Le client s'assure que tous les échantillons envoyés au CIMNA – CHU de Nantes sont stables. Le client est responsable de tous les dommages, blessures ou maladies qui peuvent être causés au CIMNA – CHU de Nantes ou à son personnel par l'un des échantillons qu'il a fournis, à l'exception des cas où le client a mis en évidence le danger potentiel qu'un échantillon peut représenter.

Limitation de responsabilité

18. Dans tous les cas, la responsabilité du CIMNA – CHU de Nantes est limitée au prix prévu par le devis.

19. Le CIMNA – CHU de Nantes ne pourra être tenu responsable des conséquences liées à la diffusion et/ou l'utilisation des résultats et rapports.

Confidentialité

20. Le CIMNA – CHU de Nantes met en œuvre tous les efforts raisonnables pour préserver la confidentialité des résultats des analyses et des rapports.

21. Le client permet au CIMNA – CHU de Nantes de citer le nom du client sur les brochures ou le site internet du CIMNA – CHU de Nantes.

Force majeure

22. la responsabilité du CIMNA – CHU de Nantes ne pourra être engagée s'il ne peut remplir ses obligations en raison d'un événement relevant de la force majeure, telle que communément admise par la jurisprudence émanant des juridictions françaises.

Divers

23. Toute modification des présentes conditions générales de vente n'est valable que si elle est expressément convenue et écrite entre les parties.

24. Si une stipulation contenue dans ces conditions générales de vente devait être annulée par une juridiction française, les autres termes restent valables.

25. La non-application par le CIMNA – CHU de Nantes ou par le client des droits énoncés dans les présentes conditions de vente ne constitue pas une renonciation à ces droits.

Droit applicable / juridiction

26. Tout litige relatif à une commande reçue par CIMNA – CHU de Nantes sera réglé par la juridiction compétente de Nantes.

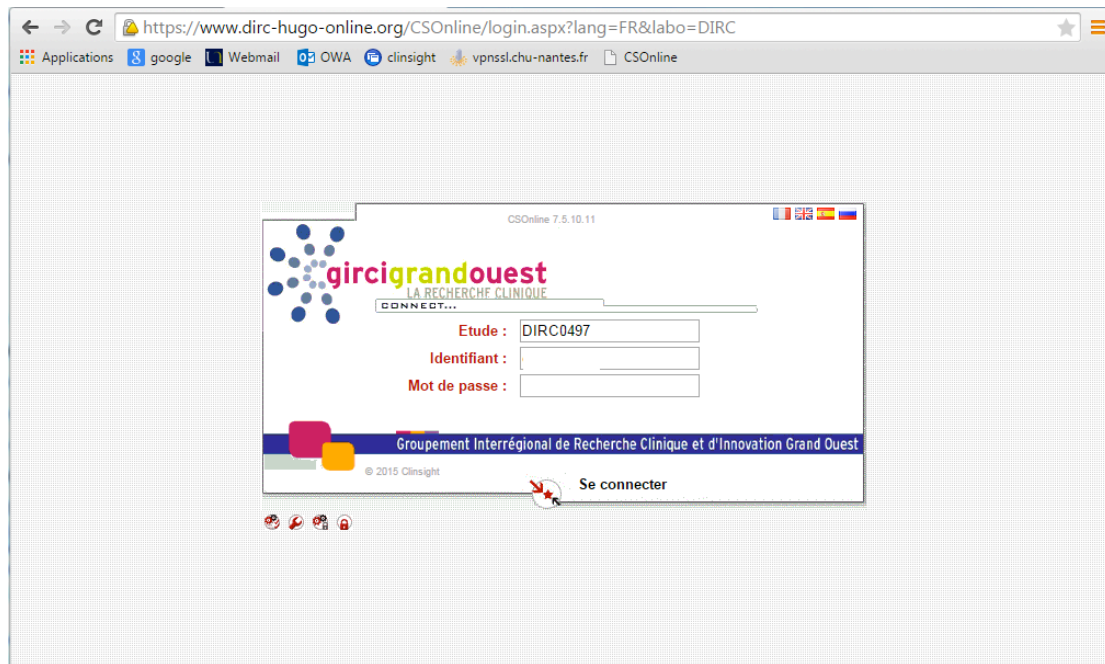
27. Le devis et les présentes conditions générales de vente sont soumis au droit français.

Annexe 10



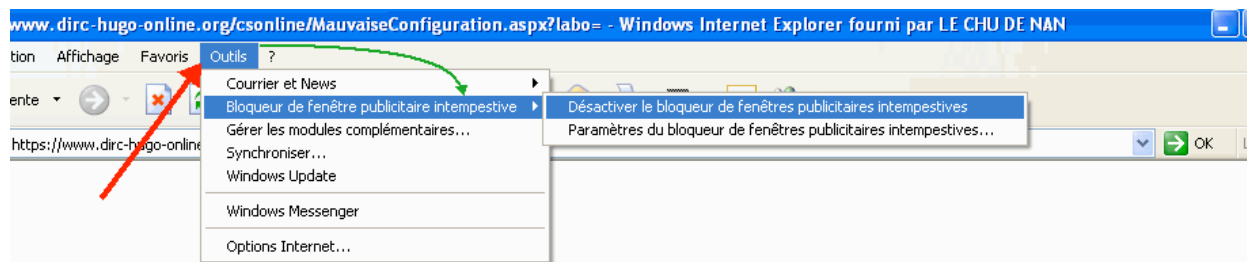
AIDE à la SAISIE sous CSONLINE

Tout d'abord, tapez l'adresse suivante dans la barre de votre navigateur :
<https://www.dirc-hugo-online.org/CSONline>
le navigateur se rend sur une page vous permettant d'accéder à CSONline



Le numéro de l'étude pour PREVALL DP est **DIRC0497**. Tapez votre identifiant et votre mot de passe et cliquez sur « Se connecter ».

La page passe alors à la suivante. Le « Bloqueur de fenêtre publicitaire intempesive », incorporé au navigateur internet, peut empêcher cette page de s'afficher :



Votre navigateur n'est pas compatible avec CSONline

Type du navigateur	IE6	☒
JavaScript supporté	Oui	☒
JavaScript activé	Oui	☒
Résolution	1024x768	☒
Antipopup désactivé	Non	☐

Pour éviter cela, suivez les flèches rouge (cliquez sur OUTILS), puis verte (placer le curseur de la souris sur « Bloqueur de fenêtre publicitaire intempesive ») pour enfin cliquer sur « Désactiver le bloqueur de fenêtre publicitaires intempesives ».

Suite à cette manœuvre, retenter de vous connecter en suivant les points précédents ou en cliquant sur le bouton « Précédente », une autre page s'ouvre :



l'institut du thorax

Bienvenue

RECHERCHCLINIQUE ARCNANTES
 Rôle : Technicien d'essais cliniques
 Dernière connexion : 08/12/2010 16:23
 Votre IP : 80.82.234.134
 Votre mot de passe expire dans : 100 jours
 Etude DIRC0127 - draft - PC-SCA-9 - BRD 10/03-ZE

Email
 Répertoire personnel
 Informations utilisateur

Se déconnecter

Liste des actualités
 Documentation

Tableau de suivi des patients
 Tableaux et courbe de monitoring
 Rapports

0 query en attente
 0 commentaire en attente

Contactez le support technique

© 2010 Clinisight

L'écran précédent vous permet alors de suivre les patients qui ont été saisis lors de précédentes connections ou de créer un nouveau patient.

Pour créer ou suivre un patient existant, cliquez sur le texte « Tableau de suivi des patients » cet écran apparaît :

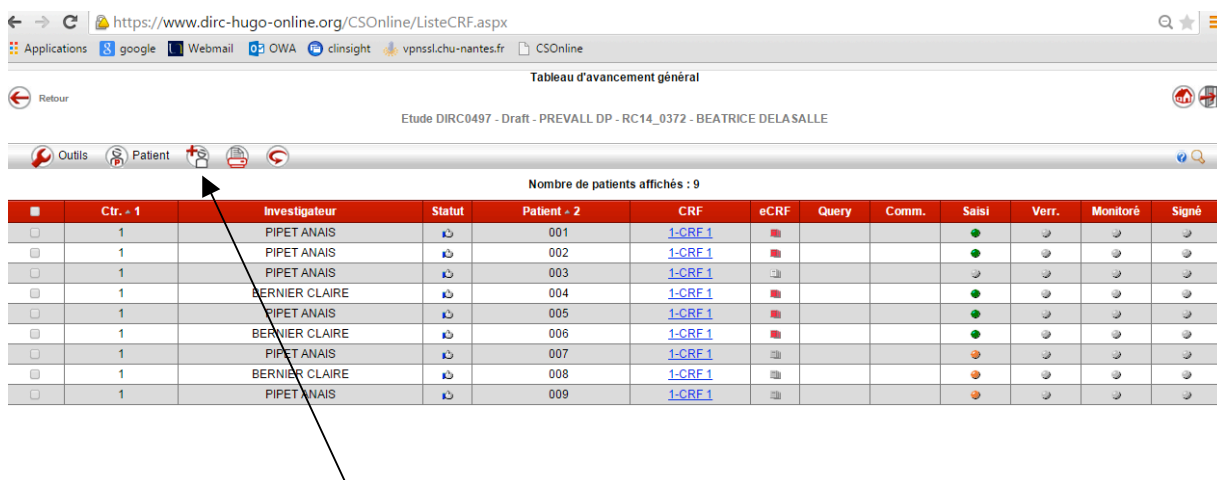


Tableau d'avancement général

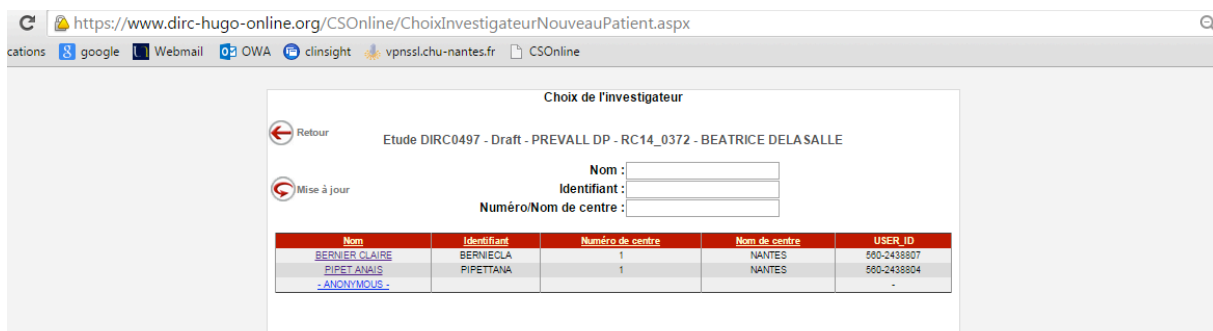
Etude DIRC0497 - Draft - PREVALL DP - RC14_0372 - BEATRICE DELA SALLE

Nombre de patients affichés : 9

	Ctrl. + 1	Investigateur	Statut	Patient - 2	CRF	eCRF	Query	Comm.	Saisi	Verr.	Monitoré	Signé
☐	1	PIPET ANAIS	👍	001	1-CRF 1	📄			🟢	🔒	🔍	📝
☐	1	PIPET ANAIS	👍	002	1-CRF 1	📄			🟢	🔒	🔍	📝
☐	1	PIPET ANAIS	👍	003	1-CRF 1	📄			🟢	🔒	🔍	📝
☐	1	BERNIER CLAIRE	👍	004	1-CRF 1	📄			🟢	🔒	🔍	📝
☐	1	PIPET ANAIS	👍	005	1-CRF 1	📄			🟢	🔒	🔍	📝
☐	1	BERNIER CLAIRE	👍	006	1-CRF 1	📄			🟢	🔒	🔍	📝
☐	1	PIPET ANAIS	👍	007	1-CRF 1	📄			🟢	🔒	🔍	📝
☐	1	BERNIER CLAIRE	👍	008	1-CRF 1	📄			🟢	🔒	🔍	📝
☐	1	PIPET ANAIS	👍	009	1-CRF 1	📄			🟢	🔒	🔍	📝

Cette page permet de créer un patient et de modifier les données saisies sur le CRF online.

Pour créer un nouveau patient, cliquez sur le bouton  et une nouvelle page apparaît alors :



Choix de l'investigateur

Etude DIRC0497 - Draft - PREVALL DP - RC14_0372 - BEATRICE DELA SALLE

Retour

Mise à jour

Nom :

Identifiant :

Numéro/Nom de centre :

Nom	Identifiant	Numéro de centre	Nom de centre	USER_ID
BERNIER CLAIRE	BERNIECLA	1	NANTES	500-2438807
PIPET ANAIS	PIPETANA	1	NANTES	500-2438804
-ANONYMOUS-				

Vous devez choisir l'investigateur en cliquant sur son nom. Cliquez sur la flèche suivant.

Une fenêtre vous informe alors que le patient a bien été créé avec succès. Le code patient s'incrémente automatiquement, il s'agit d'un numero interne (ce n'est pas l'identifiant du patient).

Cliquez alors sur « OK ». Lorsque le patient est créé, Csonline, vous redirige directement sur la première page de l'eCRF:

Etude DIRC0497 - Draft - PREVALL DP - RC14_0372 - BEATRICE DELASALLE

Action Créer Outils Navigation

Informations de signature de la page courante :
Statut : Non signée
Signataire : -
Rôle : -
Date : -
Raison : -

010
CRF 1
inclusion
1 - inclusion

Cahier d'observation

Etude Prévall DP

Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique.

Investigateur : BERNIER

Initiales :
Nom - Prénom

Date de naissance (MM/AAAA) :

Groupe :

N° inclusion :

Identifiant : --

Investigateur Coordonnateur	Promoteur
Dr Bernier Claire Plateforme Transversale d'Allergologie CHU Hôtel Dieu 1 place Ricordeau 44 000 NANTES Tél : 00 33 (0)2 40 Fax : 00 33 (0)2 40 48 21 81 E-mail : claire.bernier@chu-nantes.fr	CHU de Nantes Cellule de promotion à 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

Le curseur se place sur chaque champs un par un, vous pouvez saisir. Pour passer d'un champs à l'autre, taper sur la touche « Entrée ». La saisie se dirige automatiquement vers le champs suivant correspondant à la réponse donnée.

S'il vous manque une data vous pouvez saisir NK (ou NA) pour Not Known (not applicable) ou K s'il n'y a qu'un chiffre.

*Pour les items chiffrés avec des décimales, saisir un POINT et non une virgule
ex : 25.3 et non 25,3*

Pour éviter les erreurs, le logiciel réalise des pré-tests lors de la fin de saisie d'une page pour vérifier si les champs sont correctement renseignés

Etude DIRC0497 - Draft - PREVALL DP - RC14_0372 - BEATRICE DELASALLE

[Corriger les erreurs](#)
[Aller à la page choisie](#)
[Exécuter les pré-tests](#)
[Générer en PDF](#)

Centre : Tous Patient : 010
 CRF : CRF 1
 Rubrique : inclusion
 Page : inclusion (1)

Nombre total : 3

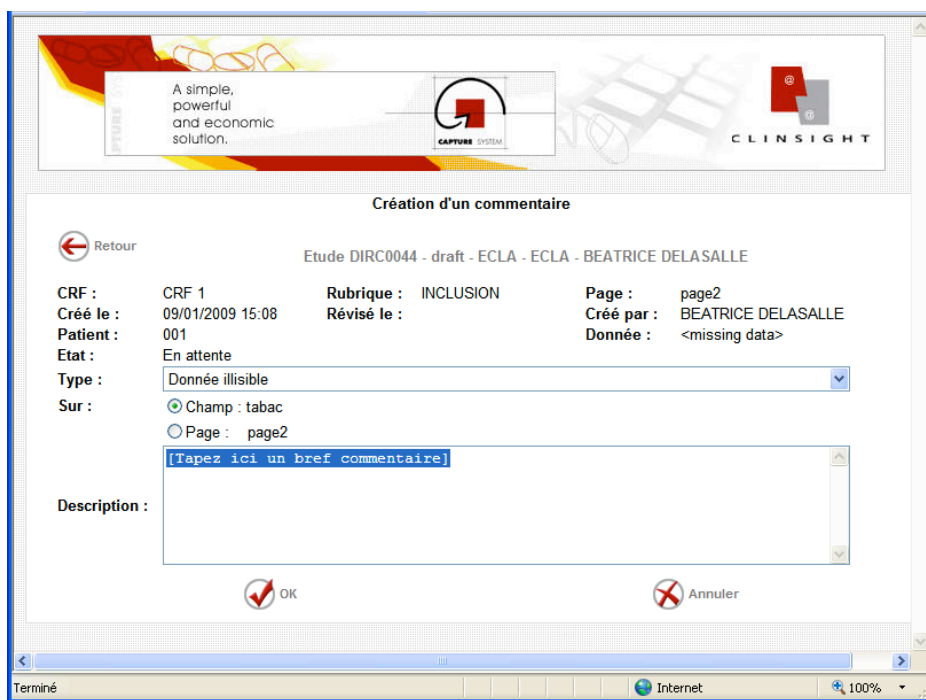
Patient - 1	Page principale - 2	Description	Question	Liste des champs
010	1	numéro d'inclusion obligatoire	L'item 'numéro d'inclusion' est non renseigné. Merci de le compléter.	numéro d'inclusion = <VIDE>
010	1	groupe obligatoire	L'item 'groupe' est non renseigné. Merci de le compléter.	groupe = <VIDE>
010	1	initiale prénom obligatoire	L'item 'initiale prénom' est non renseigné. Merci de le compléter.	initiale prénom = <VIDE>

© 2015 Cirsight

Certains champs sont mal renseignés, les pré-tests indiquent qu'il y a une erreur et qu'il faut la corriger. Cliquez alors sur « Corriger les erreurs » pour modifier votre saisie. Une fois corrigée, le curseur se place dans l'eCRF pour continuer la saisie.

Options de saisie :

- Lors de la saisie d'un champ, si vous souhaitez pouvoir y associer un commentaire. Vous vous placez sur ce champs et cliquer sur « commentaire de saisie », la fenêtre suivante apparaît :



Création d'un commentaire

Etude DIRC0044 - draft - ECLA - ECLA - BEATRICE DELASALLE

CRF : CRF 1 Rubrique : INCLUSION Page : page2
 Créé le : 09/01/2009 15:08 Révisé le : Créé par : BEATRICE DELASALLE
 Patient : 001 Donnée : <missing data>
 Etat : En attente
 Type : Donnée illisible
 Sur : ☒ Champ : tabac
 ☐ Page : page2

[Tapez ici un bref commentaire]

Description :

OK Annuler

dans la description, vous pouvez ajouter un commentaire.

- lorsque vous avez saisi une page entière du CRF. Si vous souhaitez « verrouiller » cette page, il suffit de cliquer sur « verrouiller » le bouton devient alors « déverrouiller », vous ne pourrez plus faire de modifications sur la page (a moins de cliquer sur déverrouiller).

CONTACTS

Béatrice GUYOMARC'H-Delasalle
Data manager de l'institut du thorax

beatrice.guyomarch@univ-nantes.fr

Ou

02 40 16 58 59

Annexe 11



Réunion de suivi

PREVALL-DP – RC14_0372

21/12/2015 - Présents/Diffusion:

Luc COLAS investigateur délégué; Aurore FOUREAU CEC au CIC pneumo; Maxime Lebeaupin ARC-DRC

1. Inclusions

Le premier patient a été inclus le 10/07/2015. ML informe le CPP ouest V par courrier partant le 22/12/2015.

23 patients inclus au 21/12/15 : 3 patients asthmatiques ;

5 patients atteints de dermatite atopique ;

15 patients atteints de rhinite.

Inclusion terminées des échantillons allergiques

2. Extension multicentrique du protocole: CHU d'Angers ?

Luc Colas a sollicité le Dr Drouet Martine au CHU d'Angers pour envisager l'ouverture de la recherche Prévall-DP dans ce centre associé. Absence de réponse au 21/12/15. Luc Colas rencontrera le Dr Drouet lors d'une réunion médicale fin janvier 2016 et la faisabilité sera à nouveau évaluée.

3. Affichage pour informer au sujet de la recherche Prévall-DP

ML vérifie au sein de la DRC si un affichage en salle d'attentes des cabinets de médecine générale est possible avec un maintien de la recherche en soins courants (demande des médecins traitants sollicités par Luc Colas pour adresser des patients à la plateforme transversale d'allergologie).

4. Création du site internet pour faciliter les inclusions/inscriptions des patients

ML vérifie le design d'autres recherches promues par le CHU et comment une telle application serait transposable à la recherche Prévall-DP.

5. Ouverture de l'étude dans de nouveaux services du CHU

La recherche est connue à la plateforme d'allergologie et en dermatologie et Luc Colas y administre ces deux réseaux d'investigateurs

Chirurgie ORL : le groupe « rhinite » est à la moitié de l'objectif de recrutement. Si un essoufflement intervenait, le Pr Malard, le Dr Julie Boyer et les 2 ARCs du service seraient sollicités.

Pneumologie (groupe asthme): Aurore Foureau effectue un rappel de l'ouverture de la recherche aux médecins du service, notamment le Pr Magnan. Le CIC pourra assurer le screening des patients

Urgences de l'HD : Luc Colas contacte le Pr Éric Batard pour la mise en œuvre de la recherche aux urgences.

6. Contrat Biofortis-CHU

La version finale en attente depuis le 30 octobre est éditée et adressée au Dr Bernier pour initier le circuit de signature avant la DRC puis Biofortis (qui est informé par mail le 22/12/15 de l'initiation de ce circuit de signature).

7. Contrat CHU-EFS

Maxime relance l'EFS par l'intermédiaire de Marie-Jeanne Loirat au sujet de Prévall-DP (et du protocole PIRANA de neurologie). Prévoir le fléchage budgétaire sur le logiciel de gestion de la DRC (easystore).

Prochaine réunion : Aurore et Maxime appellent Luc depuis l'HGRL le 20/01/16 à 15h30.

Spécification des critères de non-inclusion

- Le patient prend un traitement antimicrobien (antibiotique, antifongique ou antiviral) au long cours pour quelque raison que ce soit

Cela concerne tout les traitements anti-microbien pris au long cours > 15 jours et ce même si ces traitements ne sont pas à visée anti-microbienne. On peut citer l'exemple des macrolides qui pris à demi-dose ont un effet anti-inflammatoire ou bien les tétracyclines dans le traitements de l'acnée.

- Le patient a été en contact et/ou infecté et/ou colonisé par une bactérie multi-résistante dans les 6 mois précédents

Le patient pourra être inclus avant une période de 6 mois sous couvert qu'il ait bénéficié d'un dépistage par un service de bactériologie/hygiène montrant l'absence de colonisation et/ou d'infection.

- Le patient a bénéficié ou bénéficie d'une immunothérapie spécifique

Un patient pourra être inclus malgré l'antécédent d'immunothérapie spécifique (=désensibilisation) au quel cas cette dernière n'a plus l'effet clinique escompté en comptant un minimum de 5 ans après la fin de la désensibilisation.

Un patient ayant bénéficié d'une immunothérapie spécifique d'une durée inférieure à 2 ans (non observance, intolérance ...) et présentant une clinique évocatrice de maladie allergique active pourra être inclus.

- Antécédent de cancer solide ou du système hématopoïétique (mastocytose incluse) stable ou en progression

Tout patient ayant un cancer solide ou liquide **en rémission** depuis plus de 5 ans pourra être éligible.

- Le patient bénéficie ou a bénéficié d'un traitement immunosuppresseur et/ou immunomodulateur au long cours.

Cela concerne les traitements pris par voie systémique (oral, IV, SC) par exemple corticoïdes, Xolair, Anticorps monoclonaux (anti-IL-5...)

Un patient qui a bénéficié d'un traitement immunosupresseur et/ou immunomodulateur arrêté depuis 6 mois ou plus pourra être inclus à condition qu'il ait une reconstitution de ses lignées lymphoïdes et myéloïdes (pratiquer une NFS +/- un immunophénotypage des lymphocytes circulants) et que sa pathologie allergique soit en exacerbation.

A contrario, les cures courtes de corticoïdes ne sont pas une contre-indication à l'inclusion à condition que la dernière ait eu lieu 1 mois auparavant.

Annexe 13

Mail de relance pour les allergologues libéraux :

Bonjour à toutes et à tous,

J'espère que vous allez bien.

Je me permets de rajouter un mail à vos boîtes qui doivent être déjà très chargées pour vous rappeler que le protocole de recherche clinique PREVALL DP dont Claire BERNIER et moi-même sommes responsables est toujours en vigueur.

Je vous rappelle brièvement les patients que nous visons :

- majeur, non fumeur ou fumeur occasionnel, sensibilisés aux acariens*
- asthme, rhinite et/ou dermatite atopique mal contrôlé*
- pas d'immunodépression quelle soit primitive ou acquise*
- non désensibilisé ou ayant eu une désensibilisation il y a plus de 5 ans et dont le bénéfice clinique est perdu.*

Concernant les patients, il y a un manque dans le recrutement des asthmes et dermatites atopiques. Les rhinites allergiques sont plus avancées. Pour boucler les recrutements, nous aurions besoins de :

- X patients atteints d'asthme allergiques*
- Y patients atteints de dermatite atopique*
- Z patients atteints de rhinite allergique*

Merci d'ores et déjà à Dominique Chevallier, Nicolas Prézelin, François Durand-Perdriel, Yann Dubreuil, Philippe Dauplain qui nous ont adressé plusieurs patients.

En vous remerciant d'avance de votre participation

Luc COLAS

Mail de relance pour les dermatologues :

Bonjour à toutes et à tous,

J'espère que vous allez bien.

Je me permets de rajouter un mail à vos boîtes qui doivent être déjà très chargées pour vous rappeler que le protocole de recherche clinique PREVALL DP dont Claire BERNIER et moi-même sommes responsables est toujours en vigueur.

Brièvement nous cherchons des patients :

- majeur, non fumeur ou fumeur occasionnel, sensibilisés aux acariens*
- une dermatite atopique mal contrôlée (SCORAD > ou = à 25) associé ou non à un asthme et/ou rhinite et/ou allergie alimentaire.*
- pas d'immunodépression quelle soit primitive ou acquise*
- non désensibilisé ou ayant eu une désensibilisation il y a plus de 5 ans et dont le bénéfice clinique est perdu.*

Actuellement, nous aurions besoins de :

- Y patients atteints de dermatite atopique*

Si vous avez un/une patient(e) correspondant à ces critères et d'accord pour participer à l'étude, vous pouvez contacter Régis TRIBALIER (IDE de recherche clinique) ou Anne LEBFEVRE pour inclure le ou la patient(e) au 68 386.

En vous remerciant d'avance de votre participation

Luc COLAS

Mail de relance pour les séniors et internes des urgences :

Bonjour à toutes et à tous,

J'espère que vous allez bien. Je m'appelle Luc COLAS (interne d'allergologie et d'immunologie clinique).

Je me permets de rajouter un mail à vos boîtes qui doivent être déjà très chargées pour rappeler à vos bons souvenirs que le protocole de recherche clinique PREVALL DP dont Claire BERNIER et moi-même sommes responsables est toujours en vigueur.

Brièvement nous cherchons des patients :

- majeur, non fumeur ou fumeur occasionnel
- asthme mal contrôlé associé ou en exacerbation ou non à une rhinite et/ou dermatite atopique
- pas d'immunodépression quelle soit primitive ou acquise

Jusqu'à présent nous avons inclus X dont Y inclus par le service des urgences (Merci 😊)

Grâce à vous, il nous reste plus qu'à inclure Z patients atteints d'asthme.

Petit rappel de la marche à suivre si vous prenez en charge un patient asthmatique mal-contrôlé ou en exacerbation :

Proposez-lui une consultation d'asthme post-urgence à la PlateForme Transversale d'Allergologie (PFTA) même s'il est déjà suivi par un confrère pneumologue ou allergologue.

Nous nous mettrons en contact avec notre confrère ou consoeur pour l'avertir.

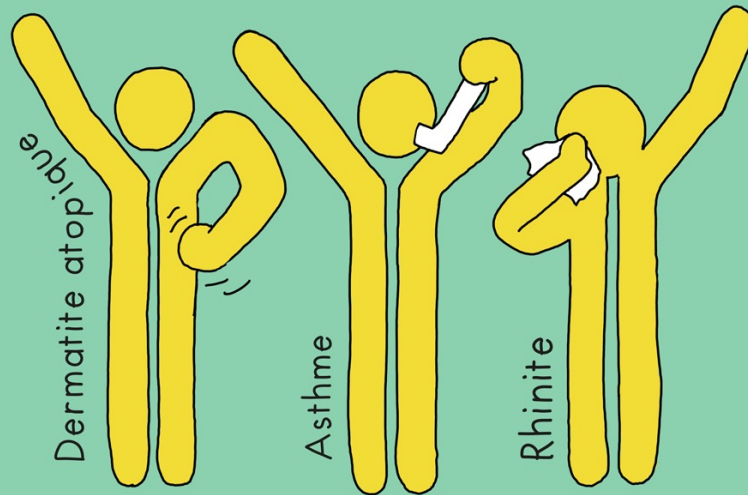
Pour cela inscrivez sur votre synthèse de séjour aux urgences :

- « consultation d'asthme post-urgence + inclusion PREVALL DP »
- Maillez votre demande à plateforme-allergologie@chu-nantes.fr ou bien faxez au 02 53 48 21 81.

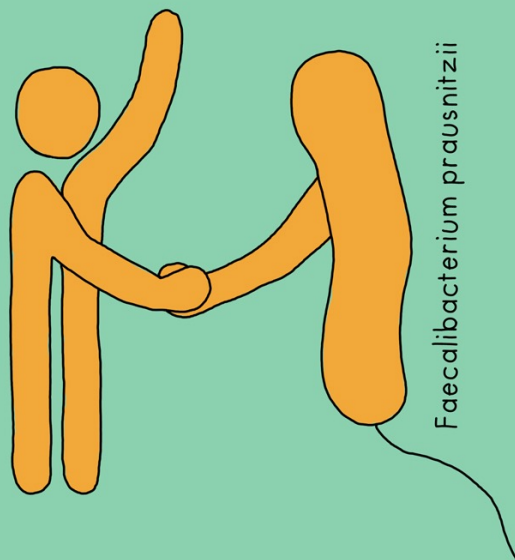
En vous remerciant pour votre participation antérieure et future.

Luc COLAS

Allergique aux acariens ?



Participer à une recherche descriptive sur le lien
entre allergies et flore digestive vous intéresse ?
Vous avez entre 18 et 70 ans, non fumeur ou fumeur occasionnel ?



Parlez en à votre allergologue
ou parlez en à votre pneumologue
ou parlez en à votre dermatologue

BIBLIOGRAPHIE

Jean-Jacques Néré (2012). *Le management de projet*. 3^e édition. Eds PUF.

**QUATRIÈME PARTIE : Mise en place des stratégies d'analyse des lymphocytes T
doubles positifs CD4+ CD8αα spécifiques de *F.prau***

SOMMAIRE

LISTE DES ABBREVIATIONS (p.246)

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX (p.248)

INTRODUCTION (p.249)

MATERIELS ET METHODES (p.250)

1. Patients (p.250)
2. Extraction des PBMC à partir du sang total (p.250)
3. Enrichissement en monocytes CD14+ par tri magnétique (p.250)
4. Tri et clonage des DP8 $\alpha\alpha$ (p.250)
5. Obtention et préparation des symbions (*F.prau* et *B.thet*) (p.251)
6. Détection des DP8 $\alpha\alpha$ spécifiques de *F.prau* via le CD40L (CD154) (p.252)
7. Cytométrie de flux (CMF) (p.252)
8. Les analyses statistiques (p.254)

RESULTATS (p.257)

1. Taux de DP8 $\alpha\alpha$ sur sang total chez les échantillons contrôles issus du protocole GOMMS (p.257)
2. Dosage des DP8 $\alpha\alpha$ à partir de PBMC décongelés (p.258)
3. Détection des DP8 $\alpha\alpha$ spécifiques de *F.prau* (p.259)
4. Analyse de la prolifération des DP8 $\alpha\alpha$ spécifiques de *F.prau* (p.261)
5. CCR6 et $\beta 7$: vers une meilleure identification des DP8 $\alpha\alpha$ spécifiques de *F.prau* ? (p.262)

DISCUSSION ET CONCLUSIONS (p.264)

ANNEXES (p.270)

BIBLIOGRAPHIE (p.285)

Liste des abréviations

APC	AlloPhycoCyanine
<i>B.thetaiotaomicron</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>
BC	Beckman Coulter
BD	Becton Dickinson
BUVX	Brillant Ultra-violet n°X
BVX	Brillant Violet n°X
CCRX	CC Chemokine Receptor protein n°X
CDX	Cluster of Differentiation X
CFSE	Carboni Fluorescein Succinimidyl Ester
CIMNA	Centre d'immune-monitorage Nantes Atlantique
CMF	CytoMétrie de Flux
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
DP8αα	Lymphocytes T doubles positifs CD4 CD8αα
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eCRF	electronic Case Report Form
EDTA	Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid
EFS	Etablissement Français du Sang
<i>F.prausnitzii</i> ou <i>F.prau</i>	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>
FMO	Fluorescence Minus One
GOMMS	Gut and Oral Microbiota Mapping and Sugartypes
HEPES	acide 4-(2-HydroxyÉthyl)-1-Pipérazine Éthane Sulfonique
IL-X	InterLeukine-X
ITS	ImmunoThérapie Spécifique
kD	Kilo Dalton
MICI	Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales
mL	millilitre
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
PBS	Phosphate Buffer Solution

PFTA	PlateForme Transversale d'Allergologie
PHA	Phytohémagglutinine
PREVALL DP	Prévalence des DP8αα dans les maladies allergiques
rpm	rotation par minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SCFA	Short Chain Fatty Acids = acide gras à chaînes courtes.
SVF C-	Serum de Veau Foetal décomplémenté
T reg	Lymphocytes T régulateur
TCR	T Cell Receptor = Récepteur des lymphocytes T
VPD	Violet Proliferation Dye
μL	microlitre

Liste des figures et tableaux

Figures :

Figure 1	Détection des DP8αα sur PBMC décongelés. En rouge = FMO CD8 (BV605) ; en noir = mix total.
Figure 2	Titration du Zombie Nir au 1/100.
Figure 3	Stratégie de gating des DP8αα totaux, CD40L+ ainsi que de leur prolifération.
Figure 4	Dosage des DP8αα sur sang total issu de volontaires sains indépendamment de leur statut atopique.
Figure 5	Dosage des DP8αα à partir de 6 donneurs sains en fonction du nombre de singulets (PBMC) compté en CMF.
Figure 6	Taux de DP8αα spécifiques de <i>F.prau</i> par détection du CD40L en fonction du temps de co-culture (heure) avec des monocytes autologues chargés avec la bactérie.
Figure 7	Prolifération des DP8αα spécifiques de <i>F.prau</i> par dilution du CFSE en fonction du temps de co-culture (heure) avec des monocytes autologues chargés avec la bactérie.
Figure 8	Prolifération des DP8αα CCR6-/β7- ; CCR6+/β7- ; CCR6-/β7+ et CCR6+/β7+ marqués au VPD en co-culture pendant 6h avec des monocytes autologues chargés avec <i>F.prau</i> (MonoF) ou <i>E.coli</i> (MonoE) ou monocytes seuls (mono) ou des billes CD3/CD28.
Figure 9	(a) Taux de DP8αα spécifiques de <i>B.thet</i> par détection du CD40L en fonction du temps de co-culture (heure) avec des monocytes autologues chargés avec la bactérie. (b) Prolifération des DP8αα spécifiques de <i>B.thet</i> par dilution du CFSE en fonction du temps de co-culture (heure) avec des monocytes autologues chargés avec la bactérie. (Annexe 5)
Figure 10	Dilution du CFSE au sein des DP8αα CD40L- (a) des lymphocytes CD4+ CD40L- (b) et lymphocytes CD8+ CD40L- (c) aux différents points horaires de co-culture avec <i>B.thet</i> (Annexe 5)
Figure 11	Dilution du CFSE au sein des DP8αα CD40L- (a) des lymphocytes CD4+ CD40L- (b) et lymphocytes CD8+ CD40L- (c) aux différents points horaires de co-culture avec <i>F.prau</i> (représentatif pour les 3 patients). (Annexe 6)

Tableaux :

Tableau 1	Détail du mix d'anticorps utilisé pour détecter les DP8αα
Tableau 2	Caractéristiques cliniques (âge et sexe) des volontaires sains du protocole GOMMS

INTRODUCTION

PREVALL DP est l'acronyme pour PRÉvalence des DP8α dans les maladies ALLergiques. Le titre complet du protocole est « Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4 CD8αα (DP8αα) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique ». Ce protocole de recherche clinique translationnelle a été conçu sous l'impulsion des Pr Jotereau et Pr Magnan afin de proposer une preuve de concept chez l'Homme d'un des mécanismes d'interactions possibles entre le microbiote intestinal, ses dysbioses (et notamment *F.prau*) et le système immunitaire (en particulier les Treg) dans les maladies allergiques.

L'objectif principal du protocole PREVALL DP suscite plusieurs étapes dans la mise en place de la stratégie d'analyse :

- le dosage des DP8αα totaux sur cellules mononucléées humaines du sang périphérique (PBMC) décongelées.
- le dosage (**détection** et **quantification**) des DP8αα spécifiques de *F.prau* à partir de PBMC décongelés.
- la mise en évidence d'un phénotype régulateur.

Or, la méthode utilisée pour le dosage des DP8αα spécifiques de *F.prau* par l'équipe du Pr Jotereau ne permet pas de déterminer une valeur relative ou absolue du taux de DP8αα spécifiques à partir des PBMC. En effet, le principe de cette méthode est de mettre en co-culture des PBMC humains préalablement marqués avec un marqueur de prolifération (CFSE ou VPD) avec *F.prau* ou une autre bactérie du microbiote intestinal pendant 24h. Au terme, la dilution du marqueur de prolifération est évaluée par Cytométrie de Flux (CMF) permettant de déterminer le pourcentage de cellules spécifiques de la bactérie. Cette méthode présente l'inconvénient d'une prolifération non-spécifique et ne permet pas de déterminer une valeur absolue ou relative du taux de DP dans l'échantillon. Afin de répondre à l'objectif principale du protocole PREVALL DP, il était nécessaire de déterminer une méthode permettant la mesure du taux de DP8αα spécifiques de *F.prau* avant qu'ils n'aient proliféré.

MATERIELS ET METHODES

1. Patients (Annexes 1 & 2)

Les patients ont été recrutés via la PFTA. Ils doivent satisfaire les critères d'inclusion et de non-inclusion au moment de la visite d'inclusion. Les données cliniques (et par la suite biologiques) sont consignées et anonymisées dans un eCRF par le médecin investigateur. A l'issue, une notice d'information et un consentement à la biocollection de l'Institut du Thorax sont remis aux patients. Un prélèvement sanguin de 40mL est réalisé sur tube EDTA dont 5mL sont utilisés pour l'analyse du taux de DP8αα sur sang total dans les 24h et les 35mL restant sont utilisés pour extraire les PBMC et les congeler dans l'azote liquide.

2. Extraction des PBMC à partir du sang total (Annexe 3)

Elle est réalisée sur un gradient de Ficoll (Ficoll-Plaque PLUS, GE Health Care) qui permet de séparer en deux phase le sang total : une phase érythrocytaire (dite « rouge ») sous le gradient de Ficoll et une phase leucocytaire (dite « blanche ») formant un anneau au dessus du gradient de Ficoll. La phase blanche est récupérée, les PBMC sont comptés sur cellule de Malaxe puis congelés dans l'azote liquide à la concentration de 5 à 10 millions par mL dans 40% de milieu de culture RPMI, 50% de DMSO et 10% de sérum de veau fœtal (SVF).

3. Détection des DP8αα sur sang total

Le mix choisi pour détecter les DP8αα est identique à celui utilisé pour les PBMC décongelés (Cf. paragraphe 8. tableau 1).

La phase cellulaire sang total anti-coagulé (cellules rouges et blanches) est d'abord extraite, lavée et ajustée la concentration de 20 millions par mL. 50μL (1 million de cellules) sont marqués avec le mix d'anticorps sus-cité selon le protocole décrit au paragraphe 8.

L'analyse est effectuée par CMF selon la stratégie de gating (Cf. paragraphe 8, figure 3) s'arrêtant à l'étape 5.

4. Tri et clonage des DP8αα

Le clonage est une technique qui permet d'expandre jusqu'à 100 000 fois un ou plusieurs clones d'une population cellulaire d'intérêt afin d'en étudier les propriétés phénotypiques et/ou fonctionnelles. Cette technique est particulièrement utile lorsque la population cellulaire d'intérêt est rare et/ou que l'échantillon primaire ne peut être à

nouveau prélevé. Cette technique est donc bien adaptée aux protocoles de recherche sur tissus humains dont la disponibilité est réduite.

Après avoir marqué les DP8α du sang total, il sont triés à l'aide d'un cytomètre de flux de type ARIA II selon la stratégie de gating (Cf. paragraphe 8, figure 3) s'arrêtant à l'étape 5. Puis chaque DP8α isolé est déposé sur un puits d'une plaque 96 puits. Chaque puit contient 150µL de milieu de culture complet (RPMI (Gibco) avec 10% de SVF C- (Eurobio), 1% de HEPES 1M (Sigma), 1% de pyruvate de sodium 100mM (Gibco), 1% de β-mercapto-éthanol à 10mM (Sigma), Pénicilline 100 UI/mL et Streptomycine 100µg/mL (Gibco) avec 110 000 feeders (100 000 PBMC autologues irradiés à 35Gy et 10 000 LAZ irradiées à 70Gy) et 50 à 100 unités/mL d'IL-2 recombinante humaine (rhIL-2 ; Péprotech).

Une fois les DP8α déposés, on ajoute de la phytohémagglutinine (PHA) à la concentration finale de 1% (soit 1,5µL pour 150µL). On incube par la suite à 37°C en étuve à 5% de CO₂.

La culture est vérifiée tous les jours et la moitié du milieu de culture complet est changé tous les 3 à 4 jours. Au bout de 10 jours le pic de prolifération des clones est atteint, les cellules sont donc affamées pendant 5 jours avec le milieu complet sans rhIL-2. Les clones peuvent-être soit utilisés pour caractérisation phénotypique et/ou fonctionnelle soit transformés en lignée cellulaire.

5. Enrichissement en monocytes CD14+ par tri magnétique (Annexe 4)

Le but de cette technique est d'obtenir une solution cellulaire enrichie avec un haut degré de pureté en monocytes CD14+ qui seront utilisés par la suite dans la détection des DP8α spécifiques de *F.prau* via le CD40L (CD154). Le choix de cette technique repose sur sa fiabilité, sa reproductibilité, sa facilité de mise en oeuvre malgré un coût non négligeable (entre 700 à 1000€ par kit permettant de trier jusqu'à 2x10⁹ cellules).

Le principe de cette technique s'appuie sur un anticorps spécifique de haute affinité d'un marqueur membranaire spécifique (non ou très faiblement exprimé par d'autre type cellulaire) de la population cellulaire choisie (ici le CD14 pour les monocytes). Les anticorps sont couplés à une bille magnétique. Le tri est réalisé par l'application d'un champ magnétique sur la suspension cellulaire marquée qui passe sur une colonne de tri adaptée au nombre de cellules à trier. Il existe trois modalités de tri magnétique :

- tri positif où les cellules d'intérêt sont marquées par l'anticorps couplé à la bille magnétique. L'effluent initial sera donc dépourvu des cellules d'intérêt qui seront récupérées en retirant le champ magnétique.

- tri négatif où les cellules d'intérêt **ne** sont **pas** marquées par l'anticorps couplé à la bille magnétique. L'effluent initial sera donc enrichi des cellules d'intérêt.
- tri séquentiel est un mélange de tri positif et négatif afin de récupérer un ou plusieurs types cellulaires d'intérêt.

Dans notre cas, nous avons utilisé un kit de tri magnétique positif pour les monocytes CD14+. Nous avons également conservé l'effluent dépourvu en monocytes mais contenant les lymphocytes T (notamment les DP8αα). Les billes magnétiques ne gênent pas la mise en culture ni l'analyse ultérieure par cytométrie de flux.

Les PBMC décongelés (10 millions/mL) ont été marqués 20 min avec 20 μL d'anticorps anti-CD14 couplés à des billes magnétiques pour 10 millions de cellules (CD14 isolation kit, Miltenyi). La séparation des cellules a été réalisée sur colonnes aimantées. La fraction négative enrichie en lymphocytes T (notamment les DP8αα) a été également récupérée.

6. Obtention et préparation des symbions (*F.prau* et *B.thet*)

Ces préparations bactériennes nous sont fournies par l'équipe du Pr Philippe LANGELLA de l'institut MICALIS (INRA, Jouy en Josas). Il s'agit de fragments bactériens sans pouvoir de virulence permettant son utilisation en laboratoire de type L2.

F. prausnitzii A2-165 (F) est cultivé pendant 20 heures sur un milieu LYBHI (infusion de cerveau et cœur supplémentée avec 0,5% de levure ; Disco), cellobiose (1 mg/ml; Sigma-Aldrich), maltose (1 mg/ml; Sigma-Aldrich), et cystéine (0.5 mg/ml; Merck) en chambre d'anaérobiose. *Bacteroides thetaiotaomicron* VPI-5482 est cultivé pendant 20 heures à 37°C en chambre d'anaérobiose sur milieu de Wilkins-Chalgren (33 g/l ; Oxoid). Le surnageant et le culot pour chaque espèce bactérienne est obtenu par centrifugation à 1700g pendant 15 minutes à 4°C. Chaque espèce bactérienne est ensuite fragmentée par ultrason pendant 15 minutes.

7. Détection et quantification des DP8αα spécifiques de *F.prau* via le CD40L (CD154)

Cette technique s'inspire de deux publications de protocoles (Frentsch et al., 2005 ; Chattopadhyay et al., 2006) où les auteurs ont détecté à partir des PBMC humains les lymphocytes T CD4+ spécifiques d'antigènes bactériens, viraux, fongiques ou allergéniques via l'expression membranaire du CD40L (= CD154) 6 heures après la mise en co-culture des PBMC totaux et de peptides bactériens, viraux, fongiques ou allergéniques. La spécificité des lymphocytes T repose sur la restriction au CMH et la reconnaissance des antigènes via le

complexe CMH/peptide - TCR. L'engagement de ce complexe engendre un signal 2 dit de co-stimulation avec l'expression membranaire de molécules de co-stimulation. Une des molécules de co-stimulation la plus précocement exprimée (avant prolifération) est le CD40L (CD154). Les auteurs ont par la suite trié ces lymphocytes T CD4⁺ CD40L⁺ (pureté à plus de 80%) pour les expandre en culture courte sur feeders autologues pendant 14 jours afin de les re-stimuler avec les peptides et d'analyser leur activation via le CD40L et la production de cytokine(s) pour vérifier la spécificité à l'antigène. Cette technique permet donc l'identification de lymphocytes T spécifiques (reconnaissance restreinte au complexe CMH/peptide - TCR) de manière indirecte à partir de PBMC humains.

Les monocytes ont été chargés sur la nuit à 37°C avec *F.prau* ou *B.thet* au ratio 1:10. Parallèlement, les lymphocytes T ont été incubés au ratio 10:1. Le milieu de culture standard utilisé pour cette étape est du RPMI (Gibco) avec 10% de SVF C- (Eurobio), 1% de HEPES 1M (Sigma), 1% de pyruvate de sodium 100mM (Gibco), 1% de β -mercapto-éthanol à 10mM (Sigma), Pénicilline 100 UI/mL et Streptomycine 100 μ g/mL (Gibco). Pour les contrôles positifs, des puits ont été coatés avec une solution d'agoniste CD3 à 1 μ g/mL (eBioscience, OKT3). Pour les contrôles négatifs, le ratio monocyte/lymphocyte à 1:10 a été conservé dans les puits sans y adjoindre de fragments bactériens.

Après 24h, 2 μ g/mL d'agoniste CD28 et CD40 (eBioscience, CD28.6 et 5C3), 2 μ M de monensine (BD), le CFSE (Thermofisher, Cell Trace Prolifération kit) selon les données du fabricant et l'anti-CD40L humain couplé au BV421 au 1/5 (BD, TRAP1) ont été ajoutés au milieu de culture. Après lavage, les lymphocytes ont été re-suspendus dans 50 μ L de milieu de co-culture puis transférés dans le puit contenant les monocytes et les bactéries. Les cellules ont été incubées à 37°C à des temps variables (0h, 2h, 4h, 6h, 8h 12h et 24h).

L'analyse de l'expression du CD40L a été détectée par CMF sur un FORTESSA LX20 (BD, Plateforme de cytométrie Cytocell, IRT-UN) et analysée grâce au logiciel FlowJo™.

8. Cytométrie de flux (CMF)

Le mix utilisé pour la détection des DP8αα a été le suivant :

Marqueur	Fluorochrome	Dilution	Clone	Firme
CD3	BUV 395	1/50	UCHT1	BD Biosciences
CD4	APC	1/50	SK1	BD Biosciences
CD8	BV605	1/50	UCHT1	Beckman Colter

Tableau I : Détail du mix d'anticorps utilisés pour détecter les DP8αα

Ce mix a été conçu avec des fluorochromes très brillants pour le CD8 et le CD40L afin de pouvoir discriminer les DP8αα spécifiques de *F.prau*. Il était également essentiel d'éviter les compensations et l'étalement de spectre permettant de gagner en résolution au vu de la rareté des DP8αα. Les concentrations respectives de chaque anticorps ont été déterminées par titration (gamme de concentration : 1/20 => 1/500). Le mix a été validé sur PBMC décongelés de volontaires sains avec la technique de Fluorescence Minus One (FMO) ce qui a permis d'ajuster les concentrations d'anticorps, d'observer d'éventuels étalements de spectre ou problèmes de compensations.

La FMO consiste à analyser un mix en omettant volontairement un fluorochrome afin d'observer son impact sur l'étalement des données et les compensations. Cela permet également de déterminer un seuil au delà duquel on considérera que les cellules expriment un marqueur donné. Dans notre cas, il a été systématiquement réalisé des FMO pour le CD8 (APC) et le CD40L (BV421) afin de bien individualiser les DP8αα totaux et spécifiques de *F.prau* respectivement (Figure 1).

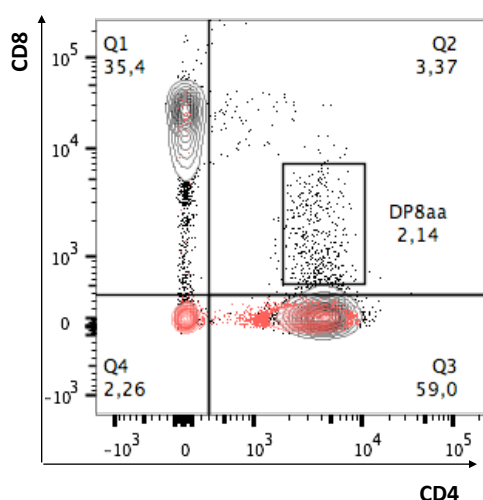


Figure 1 : Détection des DP8αα sur PBMC décongelés. En rouge = FMO CD8 (BV605) ; en noir = mix total.

La concentration optimale de marqueur de viabilité a été déterminée sur PBMC de volontaires sains pour lesquels l'apoptose a été induite par choc thermique (20 minutes à 56°C). Un co-marquage a été effectué avec l'annexine V et le Zombie Nir. La concentration retenue était celle où les cellules annexine V positives étaient co-marquées par le Zombie Nir (1/100) (figure 2).

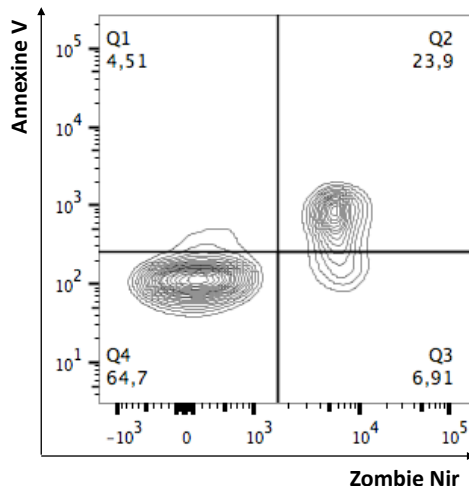


Figure 2 : Titration du Zombie Nir au 1/100

Une fois le mix établi, les cellules décongelées ont été marquées avec 50µl de marqueur de viabilité (Zombie Nir, Biolegend) préalablement dilué au 1/100 pendant 15min à 4°C au noir. Après lavage au tampon CMF (PBS 0,01M (Gibco), 10% de SVF C- (Eurobio), 0,01% d'azide de sodium (Sigma), les cellules ont été marquées 20 minutes dans le noir à 4°C avec le mix décrit ci-dessus puis lavées. Les cellules marquées ont été passées sur FORTRESSA LX20 (BD, Plateforme de cytométrie Cytocell, IRS-UN) et analysées grâce au logiciel FlowJo™. Les DP8αα totaux et CD40L+ ainsi que de leur prolifération ont été analysés suivant la stratégie décrite ci-dessous (Figure 3).

La procédure de marquage extra-cellulaire s'effectue intégralement sur glace pour maintenir une température proche des 4°C pour ralentir les phénomènes de capping, shedding et d'internalisation afin d'améliorer la détection des fluorochromes en complément de l'azide de sodium.

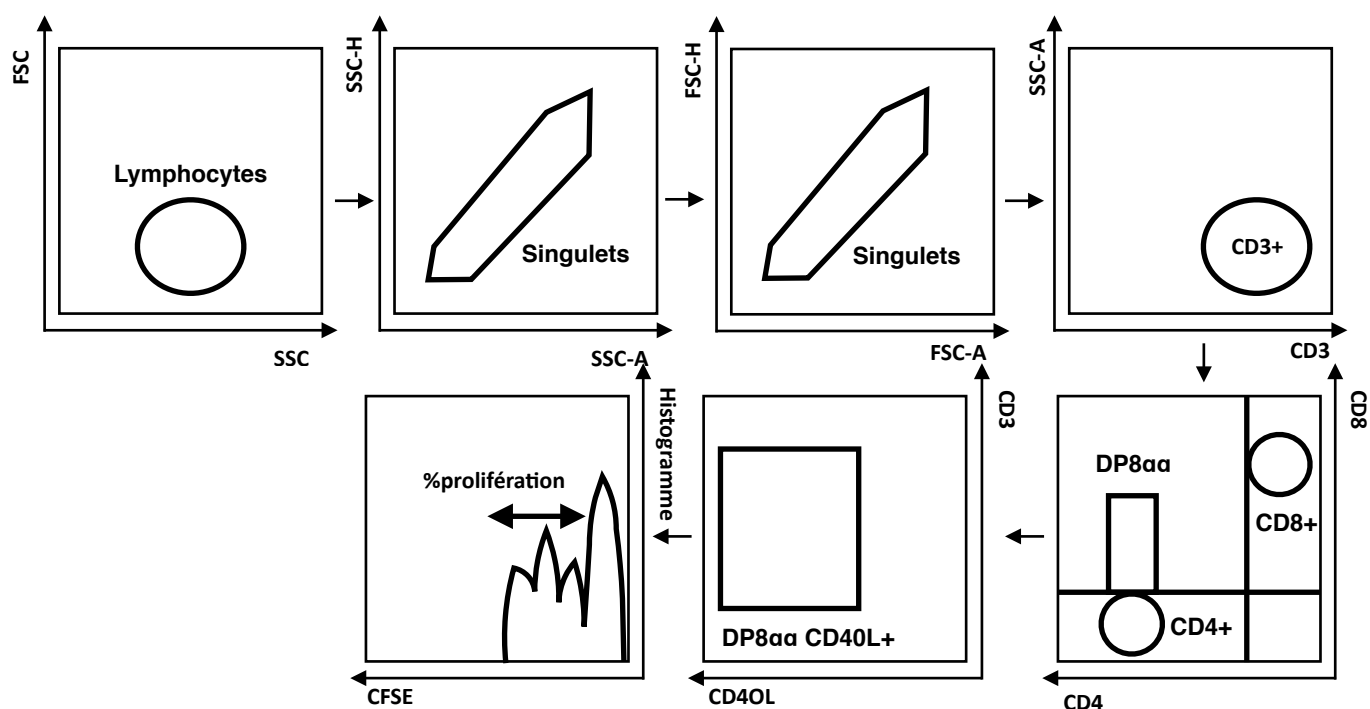


Figure 3 : Stratégie de gating des DP8αα totaux, CD4OL+ ainsi que de leur prolifération.

9. Les analyses statistiques

Elles ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism™. Il a été choisi des tests statistiques non paramétriques pour toutes les analyses pour deux raisons : les effectifs (n) inférieurs à 30 et l'absence de connaissance de la distribution statistique des valeurs. Le seuil du risque de première espèce choisi est de 0,05 %. Le rejet de l'hypothèse nulle est défini par une P-value inférieure à 0,05.

RÉSULTATS

1. Taux de DP8αα sur sang total chez les échantillons contrôles issus du protocole GOMMS

L'un des objectifs du protocole PREVALL DP était de savoir si le taux de DP8αα sur sang total était diminué chez les patients allergiques en comparaison à des volontaires sains que nous avons sélectionnés à partir du protocole GOMMS du laboratoire BIOFORTIS. Pour cela, le CIMNA a réalisé un marquage sur sang total des DP8αα à partir de sang anti-coagulé à l'EDTA. Les inclusions des patients allergiques n'étant pas terminées, nous ne pouvons dévoiler les résultats intermédiaires des patients allergiques sous peine de rompre le simple aveugle de l'étude.

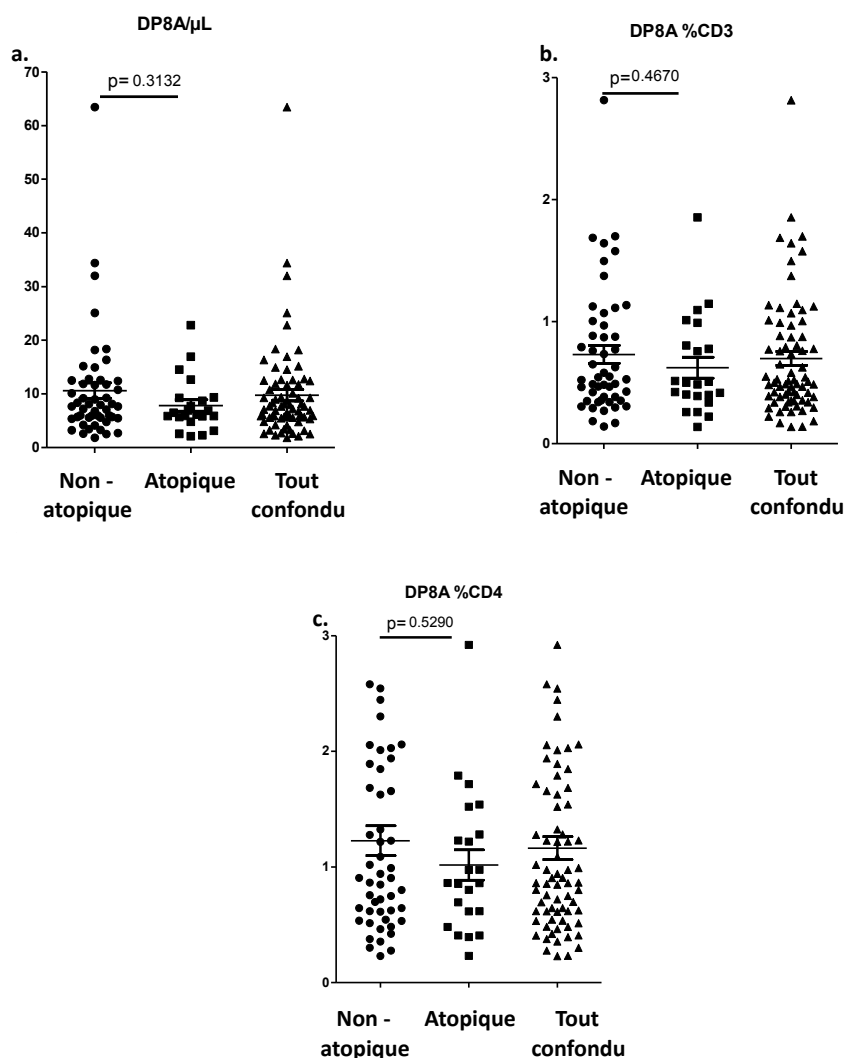


Figure 4 : Dosage des DP8αα sur sang total issu de volontaires sains indépendamment de leur statut atopique. (a) représente le nombre absolu de DP8αα par μL de sang. (b) représente le taux de DP8αα normalisé au taux de lymphocytes T CD3+. (c) représente le taux de DP8αα normalisé au taux de lymphocytes T CD4+. (n= 75)

	Âge en années (min ; max)	Sex ratio (F/M)
Tout confondu (n = 75)	24,6 (18 ; 30)	2,1 (51/24)
Atopique (n = 24)	23,7 (19 ; 30)	0,8 (11/13)
Non atopique (n = 51)	24,7 (18 ; 30)	3,7 (41/11)

Tableau 2 : Caractéristiques cliniques (âge et sexe) des volontaires sains du protocole GOMMS

Le premier résultat intéressant est que l'on retrouve une prévalence de l'atopie dans cette série de patient à 30% ce qui est la prévalence connue dans les pays occidentalisés.

L'analyse des caractéristiques cliniques (âge et sexe) des échantillons contrôles retrouve des moyennes d'âge homogènes sans différence statistique significative. Par contre, on constate un sexe ratio en faveur du sexe féminin dans les groupes « tout confondu » et « non atopique » qui est lié à un biais de recrutement. En effet, les échantillons contrôles sont issus des étudiants à la faculté d'odontologie de Nantes où la proportions de femmes dans les promotions est d'environ de 2 pour 1 homme.

Il faut également noter qu'il n'y a aucune différence statistiquement significative du taux de DP8α sur sang total entre les groupes que ce soit en valeur absolue ou normalisé par rapport au taux de lymphocyte T CD4+ ou CD8+ (test de Mann-Whitney).

Enfin, on observe que la répartition des taux de DP8α forment des trois clusters bien individualisés lorsque l'on normalise avec le taux de lymphocytes T CD4+ ou CD8+. Le facteur variant de chaque cluster est l'âge des volontaires. En effet, plus ils sont jeunes (inférieur à 25 ans) plus le taux de DP8α est bas. Les volontaires ayant le taux de DP8α le plus haut sont entrés dans leur troisième décennie de vie.

2. Dosage des DP8α à partir de PBMC décongelés

Dans un premier temps, il était essentiel de vérifier la reproductibilité et la stabilité du dosage des DP8α sur PBMC décongelés. En effet, on ne sait pas si le phénotype double positif CD4⁺ CD8α⁺ est préservé par la congélation dans l'azote liquide. Pour cela nous avons dosé par CMF (Cf. Matériels et méthodes, paragraphe 8) les DP8α de 6 donneurs volontaires en fonction du nombre de singulets.

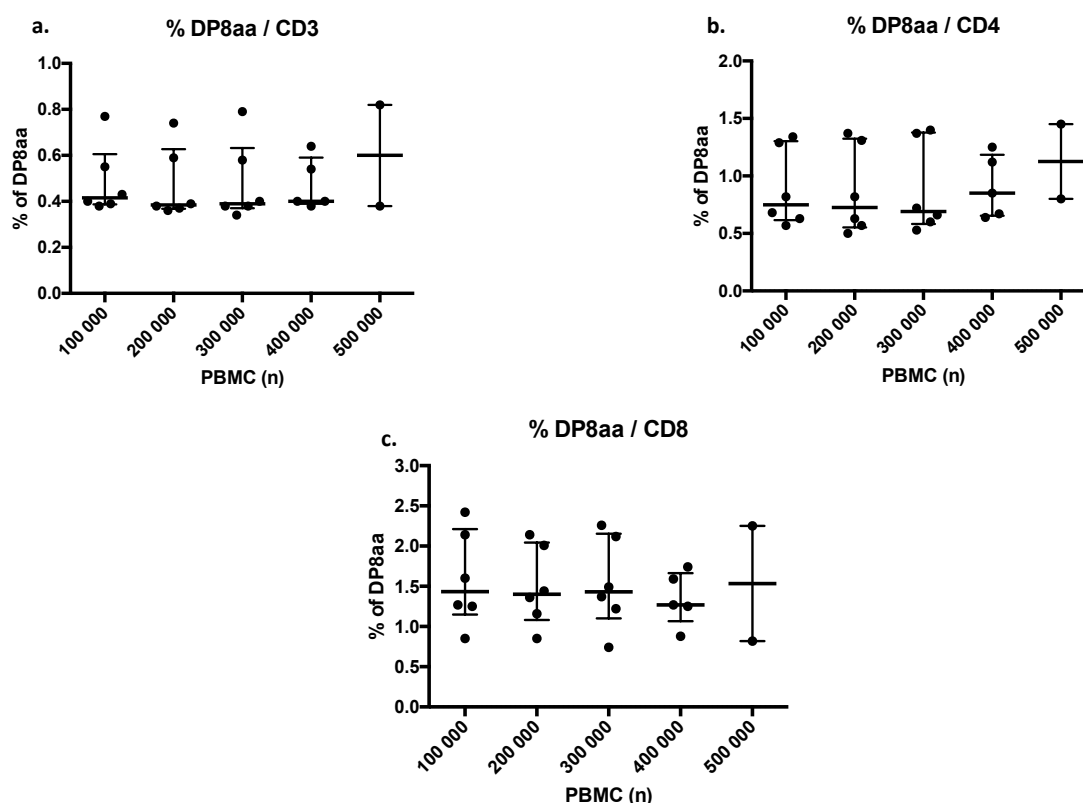


Figure 5 : Dosage des DP8αα à partir de 6 donneurs sains en fonction du nombre de singulets (PBMC) compté en CMF. (a) représente le taux de DP8αα normalisé en fonction du taux de lymphocytes CD3+. (b) représente le taux de DP8αα normalisé en fonction du taux de lymphocytes CD4+. (c) représente le taux de DP8αα normalisé en fonction du taux de lymphocytes CD8+

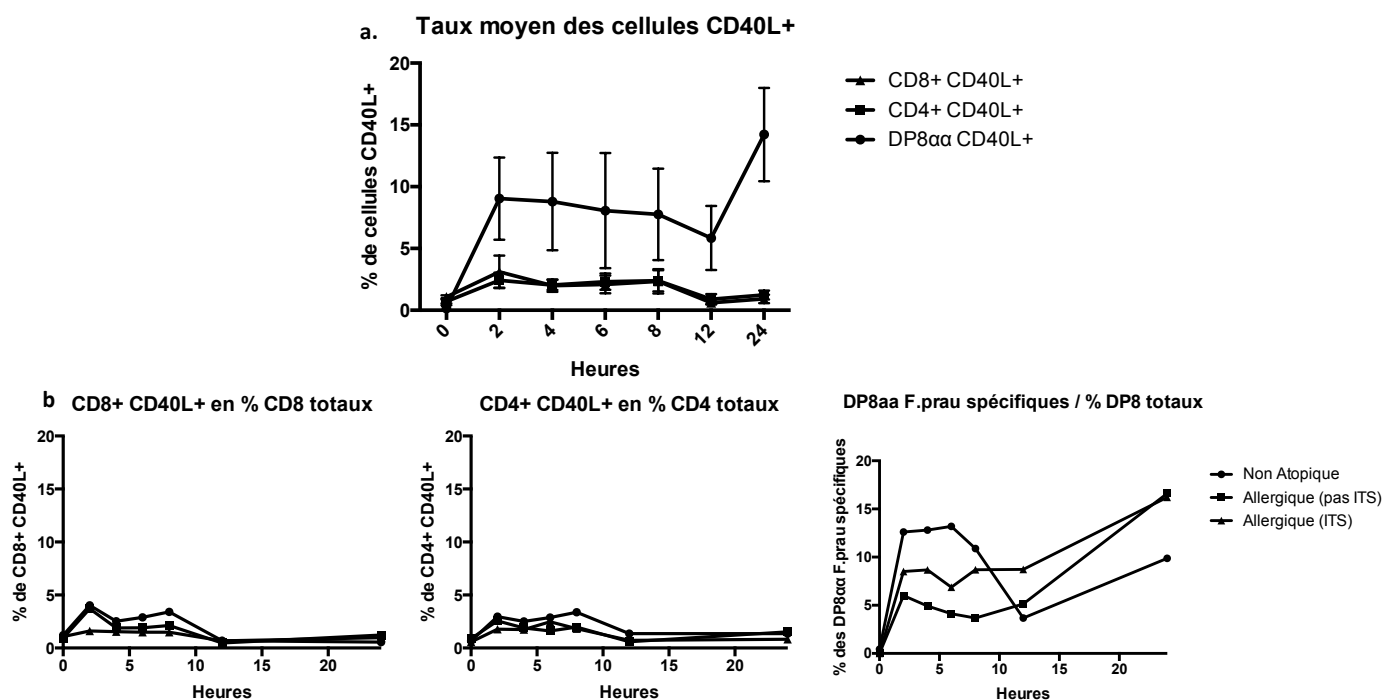
Le taux de DP8αα reste stable quelque soit le nombre de singulets comptés par le cytomètre de flux. Chaque taux de DP8αα a été déterminé de manière indépendante du taux précédent pour les 6 donneurs. L'analyse statistique en ANOVA non paramétrique de Kruskal-Wallis ne met pas en évidence de différence significative (P-value > 0,5) du taux de DP8αα pour un nombre de singulets allant de 100 000 à 500 000. Il n'y a également pas de différence significative en les comparant 2 à 2 (P-value > 0,5 ; Test de Dunn). De plus, il n'y a pas de variation significative des médianes ce qui conforte la stabilité du taux de DP8αα.

Afin de confirmer que le dosage des DP8αα sur PMBC décongelés n'est pas ou peu altéré, il sera nécessaire de comparer les taux obtenus sur sang frais et après décongélation d'un même échantillon.

3. Détection des DP8αα spécifiques de *F.prau*

L'objectif de cette expérience est de tester la technique de détection indirecte via l'expression membranaire du CD40L (Cf. paragraphe 7) des DP8αα spécifiques de *F.prau*. Pour cela, nous avons utilisé les PBMC décongelés de 3 volontaires dont le statut allergique était

connu (non atopique, allergique sous désensibilisation (ITS) et allergique sans désensibilisation (pas ITS).



La méthode de détection des DP8αα spécifiques de *F.prau* via le CD40L semble être pertinente et ce quelque soit le statut vis à vis des maladies allergiques (Figure 6a). En effet, seuls les DP8αα semblent exprimer le CD40L lorsqu'ils sont en co-culture avec des monocytes autologues chargés avec *F.prau*. On observe qu'environ 10% des DP8αα issus des PBMC semblent être spécifiques seulement 2 heures après la mise en co-culture. Ce taux reste stable jusqu'à 12h de co-culture. Concernant le statut allergique, il semble y avoir une différence quant aux taux de réponse à *F.prau*. De plus, le taux de DP8αα semble être plus important à partir de 2 heures de co-culture chez les non allergiques. Également, la présence d'une immunothérapie spécifique de l'allergène semble également augmenter le taux de DP8αα. Afin de confirmer ces résultats, il faudra augmenter le nombre de patients.

Cependant, l'expression du CD40L n'est pas nulle lorsque l'on regarde les lymphocytes CD4+ et CD8+. En effet, entre 2,5 et 3% des lymphocytes CD4+ et CD8+ expriment le CD40L après 2 heures de co-culture. Ce taux reste également stable jusqu'à 24h de co-culture. Par

contre, il ne semble pas y avoir de différence en fonction du statut allergique contrairement aux DP8αα.

4. Analyse de la prolifération des DP8αα spécifiques de *F.prau*

Après avoir montré que la détection des DP8αα spécifiques de *F.prau* était possible grâce à l'expression membranaire du CD40L, le second objectif est de savoir à quel moment la quantification des DP8αα spécifiques de *F.prau* sera la plus pertinente (absence de prolifération). Pour cela, nous avons utilisé la même méthodologie que l'expérience précédente avec les mêmes PBMC des 3 volontaires en ajoutant un marqueur de prolifération (CFSE).

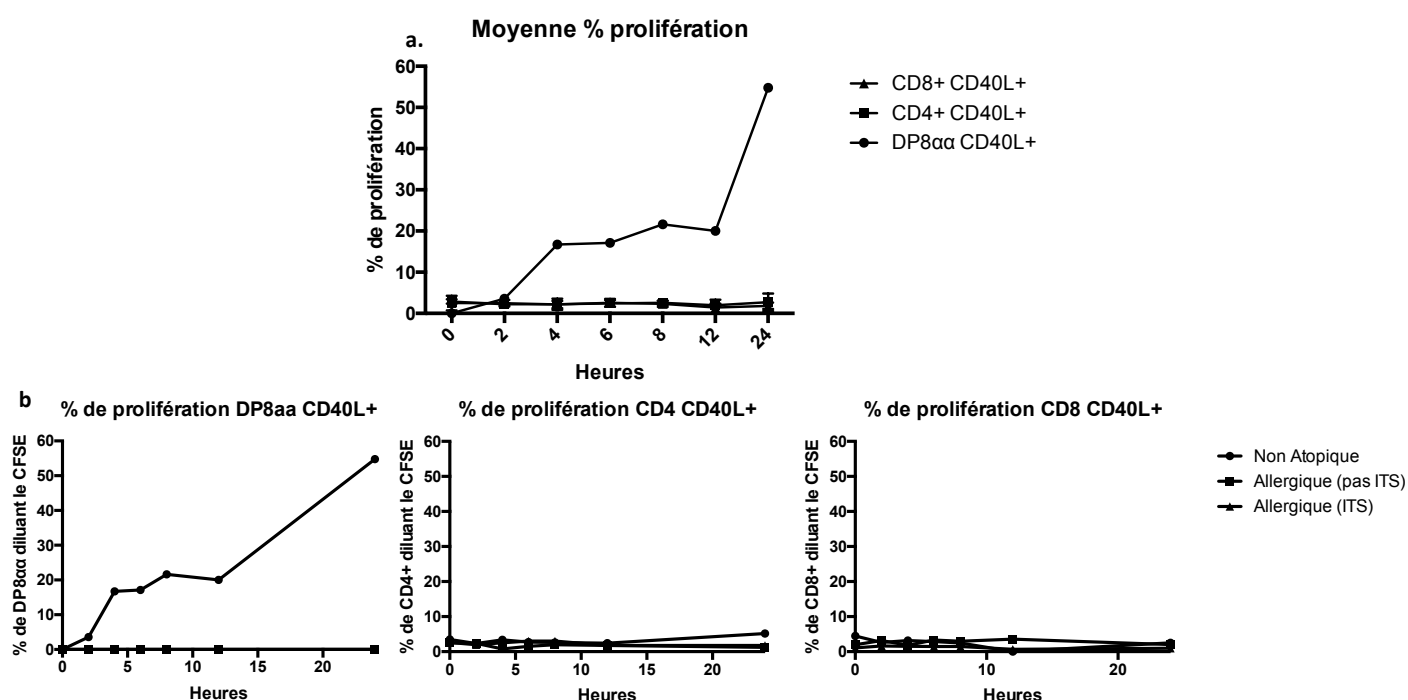


Figure 7 : Prolifération des DP8αα spécifiques de *F.prau* par dilution du CFSE en fonction du temps de co-culture (heure) avec des monocytes autologues chargés avec la bactérie. (a) représente les taux de prolifération des lymphocytes T (CD4+ ; CD8+ et DP8αα). (b) représente les taux de prolifération des lymphocytes T (CD4+ ; CD8+ et DP8αα) en fonction du statut (non atopique, allergique avec et sans ITS). (n = 3)

La prolifération des DP8αα débute précocement entre 2 et 4 heures après co-culture avec *F.prau* contrairement aux lymphocytes T CD4+ et CD8+ qui ne diluent pas le CFSE (Figure 7). Il n'est pas possible de déduire une influence du statut allergique puisque la dilution du CFSE n'a pu être analysée chez les patients allergiques du fait d'un problème technique (absence de marquage à H0). Cependant, on observe qu'en 24h il y a une prolifération d'environ 150% des DP8αα.

Ces expériences ont été menées avec *B.thet* à la place de *F.prau* afin d'avoir un contrôle négatif autre que interne avec les lymphocytes T CD4+ et CD8+. Il n'est pas retrouvé d'expression du CD40L pour les DP8αα, les CD4+ et les CD8+ et ce quelque soit le statut allergique. Il n'y a également pas de prolifération des CD4+ et des CD8+. La prolifération des DP8αα n'a pu être analysée pour la même raison que ci-dessus (Cf. annexe 5). Là également, il faudra augmenter le nombre de patients afin de confirmer ces résultats.

Enfin, on note une dilution du CFSE au sein des DP8αα CD40L- pour *F.prau* et *B.thet* qui laisse supposer une prolifération contrairement au CD4+ et CD8+ CD40L- (Cf. annexe 6). Ces résultats sont inattendus et nécessitent d'être réitérés afin de les confirmer. S'ils venaient à être confirmés, il faudrait alors en décortiquer le mécanisme.

Aucun test statistique n'a été réalisé du fait du faible nombre d'expérience (n=3). Cependant, il faudrait soit faire une ANOVA de Kruskal-Wallis pour chaque point horaire soit utiliser les « analyses de survie » afin d'intégrer la dimension temporelle.

5. CCR6 et β7 : vers une meilleure identification des DP8αα spécifiques de *F.prau* ?

La détection et la quantification des DP8αα semble être pertinente via la détection du CD40L. Cependant, les lymphocytes T doubles positifs restent une population hétérogène (Parel and Chizzolini ; 2004). Nous souhaitons donc pouvoir identifier avec le plus de spécificité les DP8αα spécifiques de *F.prau*. Pour cela nous avons trié des DP8αα clonés selon l'expression des marqueurs de re-circulation via le colon : CCR6 et β7. Puis ils ont été mis en co-culture avec *F.prau* pendant 6 au terme desquelles la prolifération a été analysée par CMF.

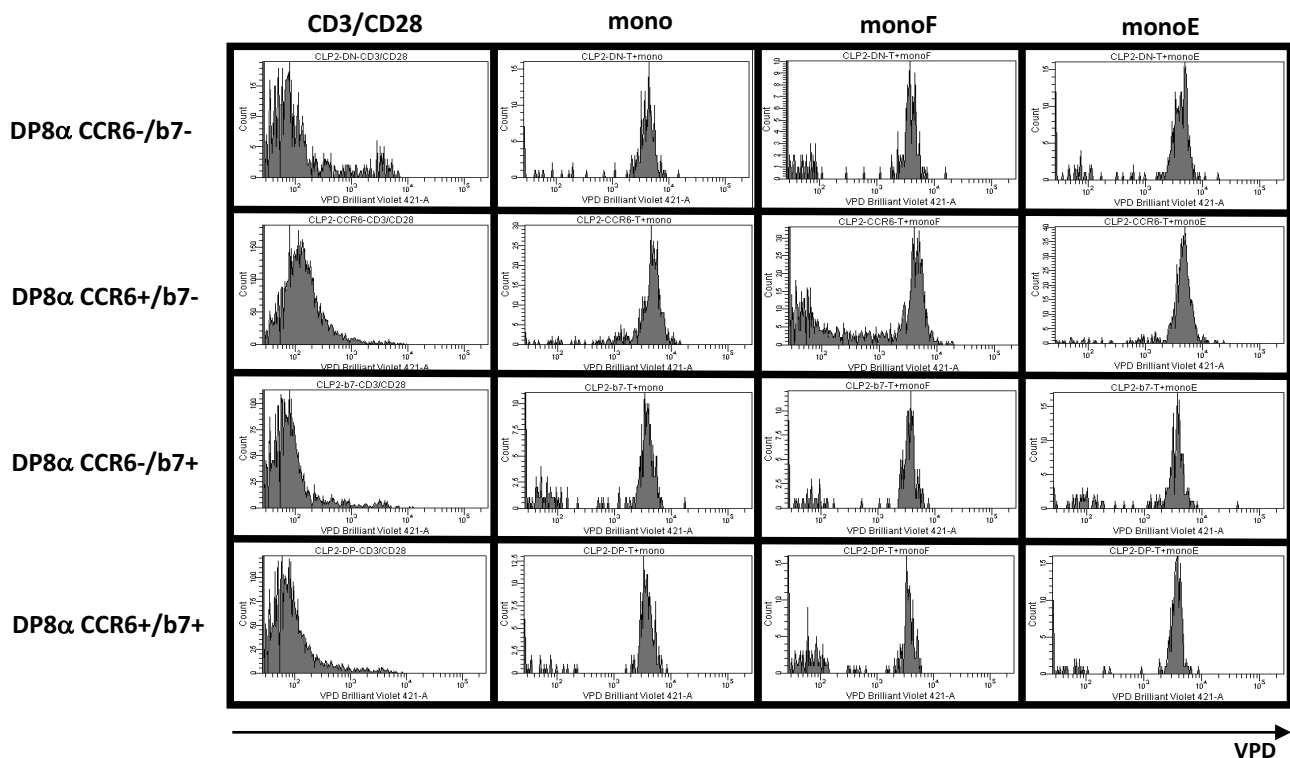


Figure 8 : Prolifération des DP8α CCR6-/β7- ; CCR6+/β7- ; CCR6-/β7+ et CCR6+/β7+ marqués au VPD en co-culture pendant 6h avec des monocytes autologues chargés avec F.prau (MonoF) ou E.coli (MonoE) ou monocytes seuls (mono) ou des billes CD3/CD28.

On observe que la co-culture avec des monocytes seuls n'induit aucune prolifération des DP8α contrairement aux billes coatées avec de l'anti-CD3 et anti-CD28. Les contrôles négatifs (monocytes seuls) et positifs (billes CD3/CD28) étant satisfaisants, nous pouvons interpréter les co-cultures avec les monocytes préalablement chargés.

Lorsque les DP8α sont en co-culture avec des monocytes chargés avec F.prau, on constate que les DP8α qui prolifèrent le plus expriment le CCR6 uniquement. Une faible proportion des DP8α qui prolifèrent également co-expriment le CCR6 et β7 contrairement aux DP8α qui expriment uniquement β7.

Quelque soit leur phénotype, les DP8α en co-culture avec les monocytes chargés avec *E.coli* ne prolifèrent pas.

Ces résultats nécessitent d'être confirmés car réalisés sur un seul échantillon. Ils ont été réalisés par le Dr Emmanuelle Godeffroy actuellement post-doctorante dans l'équipe du Pr Jotereau.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Les DP8 $\alpha\alpha$ sont encore à l'heure actuelle méconnus tant au plan de leur physiologie que de leur(s) rôle(s) au sein du système immunitaire. En effet, la co-expression des marqueurs CD4 et CD8 pose question. D'une part, cela définit une population hétérogène que l'on peut classer en fonction de l'intensité d'expression du CD4 et/ou du CD8 :

- les lymphocytes T double positifs CD4^{high} CD8^{low} (= DP8 $\alpha\alpha$)
- les lymphocytes T double positifs CD4^{high} CD8^{high} (= DP8 $\alpha\beta$)
- les lymphocytes T doubles positifs CD4^{low} CD8^{high}

L'intensité d'expression du CD8 définit s'il s'agit d'un hétéro-dimère ($\alpha\beta$) ou homo-dimère ($\alpha\alpha$). En effet, l'expression de la chaîne β entraîne une forte expression à la membrane des lymphocytes T de l'hétérodimère. Ces lymphocytes présentent également un phénotype mature et ne sont par conséquent pas des thymocytes (Parel, Chizzolini ; 2004).

Il est difficile d'avoir une notion des fonctionnalités de ces lymphocytes T doubles positifs. La raison principale est leur hétérogénéité qui nécessite une identification précise de la population étudiée. Or, beaucoup d'auteurs ne définissent pas la population précisément ce qui aboutit à des conclusions possiblement erronées sur leurs fonctions. Cependant, on retrouve des fonctions de défense anti-virale et allogénique pour les CD4^{low} CD8^{high} (Kitchen et al, 2005). Les DP8 $\alpha\beta$ sont principalement retrouvés au sein d'états pathologiques tels que la transplantation d'organe ou les maladies auto-immunes systémiques (type connectivites) et spécifiques d'organe (thyroïdite auto-immune) (Parel, Chizzolini ; 2004). Les DP8 $\alpha\alpha$ sont très difficilement identifiés dans la littérature hormis ceux spécifiques de *F.prau* dans les MICI (Sarrabayrousse et al, 2014).

Le taux plasmatique de DP8 $\alpha\alpha$ peut-être facilement dosé et semble être dépendant de l'âge du donneur. En effet, plus l'âge du donneur augmente, plus le taux de DP8 $\alpha\alpha$ augmente. Cette observation concorde avec les données de publications datant de la fin des années 1990 (Colombatti et al, 1995 ; Pawelec *et al.*, 1998 ; Zuckermann F et al, 1999). A cette époque, aucune fonction n'a été associée à cette augmentation liée à l'âge.

F.prau est une bactérie anaérobie stricte composant le « core » du microbiote intestinal et donc présente tout au long de la vie d'un individu malgré une diminution sur le 4^e âge (Miquel and al, 2014). Elle possède également une activité immune-modulatrice notamment dans les MICI (Sokol et al, 2008 ; Sarrabayrousse *et al.*, 2014). A la lumière de ces découvertes récentes et de la fonction régulatrice des DP8 $\alpha\alpha$ spécifiques de *F.prau*, on peut émettre l'hypothèse que l'augmentation des DP8 $\alpha\alpha$ avec l'âge relève de la sénescence

du système immunitaire au cours de laquelle il y a une augmentation physiologique du taux de T_{reg}.

Cependant, quelle est l'utilité de co-exprimer un CD8 homodimérique ? A-t-il un rôle dans l'acquisition du phénotype régulateur des DP8 $\alpha\alpha$? Il n'y a pas de réponse claire à ces questions cependant, une hypothèse intéressante est l'amplification de l'activation du TCR après interaction avec le complexe CMH II/peptide(s) bactérien(s). En effet, il a été montré que le CD8 $\alpha\alpha$ possédait des ligands propres (CD1d, les CMH atypique de classe I) qui permettaient de moduler l'activation des lymphocytes T et notamment en amplifiant leur activation mais également en augmentant l'affinité du complexe CMH/peptide - TCR (Zuckermann, 1999 ; Parel and Chizzolini, 2004 ; Sarabayrouse et al, 2015). Cela permettrait aux DP8 $\alpha\alpha$ spécifiques de *F.prau* de s'activer en présence d'une faible quantité d'antigène bactérien puisque le microbiote intestinale est constamment restreint par l'immunité muqueuse afin de ne pas provoquer une inflammation locale et/ou systémique (Hooper and McPherson, 2010).

Le premier objectif était la mise au point d'une technique de détection des DP8 $\alpha\alpha$ spécifiques de *F.prau*. La technique devait obéir à quelques contraintes. En effet, il n'était pas possible d'utiliser la technique des tétramères puisqu'on ne connaît pas à l'heure actuelle les déterminants antigéniques reconnus par les DP8 $\alpha\alpha$, que les patients n'ont pas été génotypés pour le CMH et que la reconnaissance passe par le CMH de classe II (Frentsch *et al.*, 2005). Une autre technique consiste en la détection des cytokines produites par les cellules d'intérêt en contact avec l'antigène. La limite de cette technique est la connaissance de la ou les cytokines produites par les DP8 $\alpha\alpha$ en présence de *F.prau* (Campbell JD, 2003). La technique de détection du CD40L après contact avec *F.prau* permet de s'affranchir des peptides antigéniques, du génotypage des allèles du CMH de chaque patient et du pari sur les cytokines produites tout en gardant les DP8 $\alpha\alpha$ vivants et accessibles à un tri par CMF de type ARIA.

Cependant, on ne peut affirmer la seule spécificité restreinte au CMH par l'expression du CD40L après un certain nombre d'heures de co-culture. En effet, l'accès au répertoire complet d'une population lymphocytaire spécifique d'un antigène est un défi compliqué à relever. Une expérience de 2011 comparant après expansion la détection des lymphocytes T spécifiques d'allergène via les marqueurs d'activation ou via les tétramères d'allergènes concluent à une forte variabilité inter-individuelle et également à une supériorité de la technique des tétramères. Cette publication souffre cependant de plusieurs biais :

- la technique d'expansion des lymphocytes spécifiques d'allergènes utilise un peptide modifié pour mieux s'interagir avec le CMH correspondant. Le point négatif est l'absence de co-stimulation dans ce modèle pouvant aboutir à une anergie de certains lymphocytes T considérés à tort comme non spécifiques.
- la caractérisation fonctionnelle et phénotypique des lymphocytes T spécifiques d'allergènes ne prends pas en compte les différentes polarisation de lymphocytes T CD4 ce qui engendre une erreur dans l'interprétation des corrélations entre détection par les tétramère et les marqueurs d'activation.

Cependant, une conclusion intéressante de cette publication non soulevée par les auteurs est que le couplage de plusieurs marqueurs (phénotypique ou fonctionnelle) augmente la sensibilité et la spécificité des techniques d'exploration du répertoire des lymphocytes T spécifiques d'allergènes et plus généralement d'antigène (Bonvalet et al, 2011).

Pour ces raisons, nous allons utiliser différentes techniques complémentaires afin de mieux conforter la détection des DP8αα spécifiques de *F.prau* via le CD40L. La première étape sera de trier par CMF les DP8αα exprimant le CD40L afin de les expandre en culture sur feeders autologues irradiés pendant 14 jours (Matériels et Méthodes, paragraphe 4). Nous vérifierons par la suite s'il existe un répertoire restreint/biaisé du TCRβ par spectratyping des fragments CDR3 (Memon SA *et al.*, 2012) à défaut de pouvoir vérifier avec un tétramère d'allergène. Nous y couplerons une épreuve fonctionnelle en ajoutant au milieu de co-culture un inhibiteur fonctionnel du CMH de classe II humain en parallèle de la co-culture décrite ci-dessus (Matériels et méthodes, paragraphe 7) devant aboutir à l'absence de détection membranaire du CD40L sur les DP8αα en co-culture avec *F.prau*. Une autre preuve de la spécificité des DP8αα CD40L+ pourra être apporté en les re-stimulant avec des monocytes autologues chargés avec *F.prau*.

Récemment, un article a démontré dans un modèle murin de colite que les Treg induits exprimant le CCR6 avaient un tropisme colique et ce d'autant plus qu'il existait une inflammation colique sous-jacente (Katimura et al, 2016). Un parallèle avec les DP8αα spécifiques de *F.prau* dans les maladies allergiques pourrait être établi puisqu'en 2015, il a été montré un lien entre la rupture de l'intégrité de l'épithélium intestinal et une dysbiose concernant *F.prau* chez les patients adultes atteints de dermatite atopique persistante (Song et al, 2016). Il serait donc pertinent de coupler la détection du CD40L à celle du CCR6.

le deuxième objectif était la quantification des DP8αα spécifiques de *F.prau*. Nous avons choisi d'appliquer la technique de détection indirecte via le CD40L (CD154) pour les

DP8αα spécifiques de *F.prau*. En effet, la spécificité des DP8αα pour *F.prau* a été démontrée comme passant par l'interaction CMH/peptide – TCR (Sarrabayrousse and al, 2014).

Il semblerait que la prolifération des DP8αα commence entre 2 et 4 heures de co-culture avec *F.prau*. Il semblerait donc que l'analyse à 2h de co-culture soit le meilleur moment pour quantifier le taux plasmatique des DP8αα spécifiques de *F.prau*. Cependant, il faudra réitérer l'expérience afin de le confirmer.

Au sein des DP8αα CD40L-, il semble exister une prolifération qui n'engage pas le CD40L. Plusieurs hypothèses peuvent être formulées :

- une hétérogénéité du marquage par le CFSE liée à une trop faible concentration utilisée.
- une internalisation du CD40L malgré l'utilisation de monensine ce qui est peu probable car le contrôle positif l'exprimait sur les 24h de co-culture.
- une prolifération non spécifique liée à l'utilisation de SVF C-. Il faudra refaire l'expérience avec du sérum humain.
- une activation indépendante du CD40L. Il faudra ajouter le CD80 et le CD86 au mix des DP8αα et/ou faire un tri magnétique positif des CD3+ des CD14+ pour s'affranchir des autres types cellulaires pouvant faire une présentation antigénique (lymphocytes B et granulocytes entre autre).
- une prolifération TCR indépendante liée aux DP8αα CD40L+ et/ou aux monocytes chargés et/ou *F.prau* elle-même.

En effet, il a récemment été montré que la souche A2-165 de *F.prau* augmentait l'expression de l'IL-10 par les cellules dendritiques muqueuses dans un modèle murin de colite (Rossi *et al.*, 2016). De plus, l'équipe du Pr Langella a récemment montré que différentes parties de *F.prau* A2-165 n'avaient pas d'activité immunogène (extrait membranaire et cytoplasmique, ADN) mais également qu'il existait un facteur soluble encore non identifié (indépendant des SCFA) ayant une activité anti-inflammatoire (Sokol *et al.*, 2014 ; Miguel *et al.*, 2014).

Tout récemment, il a été identifié un peptide de 15kD dans le surnageant de culture de *F.prau* qui présente une activité anti-inflammatoire lorsqu'il est mis dans le milieu de culture de cellules épithéliales intestinales et ce indépendamment d'une interaction avec une cellule composant le système immunitaire muqueux colique. Les auteurs ont également démontré que ce peptide tirait son activité anti-inflammatoire en inhibant la voie du NF-κB (Quévrain *et al.*, 2016). Il se pose la question de la présence de ce peptide dans les extraits bactériens utilisés qui pourrait induire une activation des DP8αα indépendamment du CD40L. De plus, ce peptide pourrait être l'antigène qui induit le phénotype régulateur des

DP8αα spécifiques de *F.prau*. Il serait intéressant de tester cette hypothèse en comparant la technique du CD40L couplé avec CCR6 et la technique des tétramères.

Une autre limite de la technique de détection indirecte par le CD40L au vu des résultats préliminaires est une possible sur-estimation du taux de DP8αα spécifiques de *F.prau*. En effet, il existe une expression du CD40L pour environ 2,5 à 3% des lymphocytes CD4+ ou CD8+. Or, si on assume que ces derniers sont spécifiques de *F.prau*, la quantité de lymphocytes T mémoires CD4+ et/ou CD8+ spécifiques de *F.prau* est alors énorme en comparaison de la fréquence habituelle de 1/10 000 des lymphocytes T spécifiques d'un antigène (Chatenoud et Bach, 2012). Une autre hypothèse est la présence d'un bruit de fond et/ou d'une activation indépendante de *F.prau*. Lors de l'étape de chargement des monocytes, il a pu se produire :

- un chargement avec un peptide de SVF C-. Il faudra alors renouveler l'expérience avec du sérum humain idéalement autologue.
- une contamination bactérienne qui est peu probable à cause de la pénicilline/streptomycine présentes dans le milieu de culture.
- une activation des monocytes liée à la présence de DAMPS secondaires à la mort de monocytes. Il faudra alors renouveler l'expérience avec un puit contrôle contenant des monocytes seuls avec SVF C- ou sérum humain qui permettra d'évaluer le bruit de fond.

En conclusion, la détection et la quantification des DP8αα spécifiques de *F.prau* via le CD40L à 2 heures de co-culture semble être une méthode prometteuse mais qui nécessite d'être confirmée et affinée. L'utilisation de procédé d'expansion *in-vitro* permettra une analyse plus fine du phénotype et de la fonction (attendue régulatrice) de ces cellules, ainsi que de leur profil d'expression cytokinique. Afin de pouvoir légitimer les travaux qui découleront de cette technique de détection des DP8αα spécifiques de *F.prau* comme le protocole PREVALL DP, il est souhaitable de publier la technique.

Les premiers résultats concernant les DP8αα spécifiques de *F.prau*, sous réserve qu'ils soient confirmés, encouragent à développer l'aspect biomarqueur dans les maladies allergiques. En effet, il serait intéressant suivre une cohorte de patients afin d'établir une corrélation entre l'évolution naturelle de la maladie allergique (phase d'exacerbations et rémissions), l'influence des traitements symptomatiques (anti-histaminique, corticoïdes inhalés, topiques ou systémiques) et les traitements curatifs actuels tels que

l'immunothérapie spécifique d'allergène ou futurs comme la modulation du microbiote intestinal (pré et pro-biotiques).

Enfin, les DP8αα spécifiques de *F.prau* posent question quant à leur(s) rôle(s) dans les axes entre l'intestin et les organes d'interface tels que la peau ou le poumon puisqu'elles circulent et s'activent au niveau de l'épithélium digestif (Marshland *et al.*, 2015 ; Huffnagle GB, 2014).

Pour cela, il est nécessaire de mieux caractériser ces cellules et notamment leur physiologie et leurs partenaires d'interactions. De ce vaste sujet est né l'idée de ma future thèse de science qui s'attachera à décrypter la physiologie des DP8αα spécifiques de *F.prau* ainsi que leurs interactions avec les lymphocytes B et notamment régulateurs dont l'implication dans la physiopathologie des maladies allergiques n'est plus à démontrer (Braza *et al*, 2014) (Annexe 7). La première partie de ce travail de thèse consistera en une revue de la littérature des lymphocytes T doubles positifs CD4⁺ CD8⁺ excluant les thymocytes afin de préciser au mieux les connaissances actuelles de ces cellules que nous souhaitons étudier.

Plus largement, la découverte des interactions entre le microbiote et différents organes (peau, cerveau, poumon, nez..) conduit à une nouvelle approche des maladies chroniques qui y sont associées telles que les maladies allergiques ou à composante immune : les maladies d'interface où il existe une dysfonction des épithélia dont la cause reste encore largement méconnue. Cette approche a l'avantage de pouvoir unir les découvertes concernant ces maladies dans les domaines de la génétique, de l'épigénétique et des influences environnementales.

ANNEXES

Liste des annexes

Annexe 1	Résumé du protocole de recherche clinique PREVAL DP
Annexe 2	Diagramme de flux de l'étude
Annexe 3	Procédure pour la réalisation d'un Ficoll
Annexe 4	Procédure de tri magnétique sur colonne de type Miltenyi
Annexe 5	Résultats de la détection et de la prolifération de DP8αα spécifiques de <i>B.thet</i>
Annexe 6	Dilution du CFSE au sein des DP8αα CD40L- (a) des lymphocytes CD4+ CD40L- (b) et lymphocytes CD8+ CD40L- (c) aux différents points horaires de co-culture avec <i>F.prau</i> ou <i>B.thet</i> (représentatif pour les 3 patients).
Annexe 7	Sujet de thèse de science

Annexe 1

Protocole Prévall DP

RESUME

Titre de l'étude	Etude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T double positifs CD4CD8aa (DP8a) spécifiques d'une bactérie du microbiote intestinal (<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>) dans la dermatite atopique, l'asthme et la rhinite allergique.
Mots clés	Lymphocyte T régulateur, lymphocyte T double positif, <i>F Prausnitzii</i> , sang périphérique, asthme allergique, rhinite allergique, dermatite atopique.
Promoteur de l'étude	CHU DE NANTES
Investigateur coordonnateur	Dr Bernier Claire
Nombre de centres prévus	1 : CHU de Nantes
Type d'étude	Physiologie, physiopathologie
Planning de l'étude	☐ Durée totale : 2 ans ☐ Démarches réglementaires : 4 mois ☐ Période de recrutement : 1 an ☐ Durée de suivi par patient : 1 jour ☐ Durée des analyses : 8 mois
Design de l'étude	☐ Monocentrique ☐ Transversale ☐ Contrôlée ☐ Non Randomisée ☐ Simple insu
Objectifs de l'étude	<u>Objectif principal</u> : Mise en évidence d'une diminution quantitative des lymphocytes T doubles positifs (CD4+/CD8+) du sang périphérique spécifique de <i>F prausnitzii</i> chez les patients atteints d'asthme allergique, de rhinite allergique et de dermatite atopique ainsi que par rapport aux échantillons contrôles. <u>Objectifs secondaires</u> : - existe-t-il une corrélation entre les taux de lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique et le niveau de contrôle de la maladie allergique ? - la mise en évidence d'un phénotype régulateur après prolifération avec <i>F prausnitzii</i> - existe-t-il une corrélation entre le taux de prolifération des lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique spécifiques de <i>F prausnitzii</i> et le niveau de contrôle de la maladie allergique ? - existe-t-il une prolifération des lymphocytes T doubles positifs du sang périphérique en présence d'acariens (<i>Dermatophagoïdes pteronyssinus</i>) ?
Nombre de cas prévisionnel	90 (30 patients par groupes = asthme allergique, dermatite atopique, rhinite allergique)
Calendrier des visites et examens	1 journée à la plateforme transversale d'allergologie pour l'inclusion et le prélèvement, Hôtel Dieu, CHU de Nantes

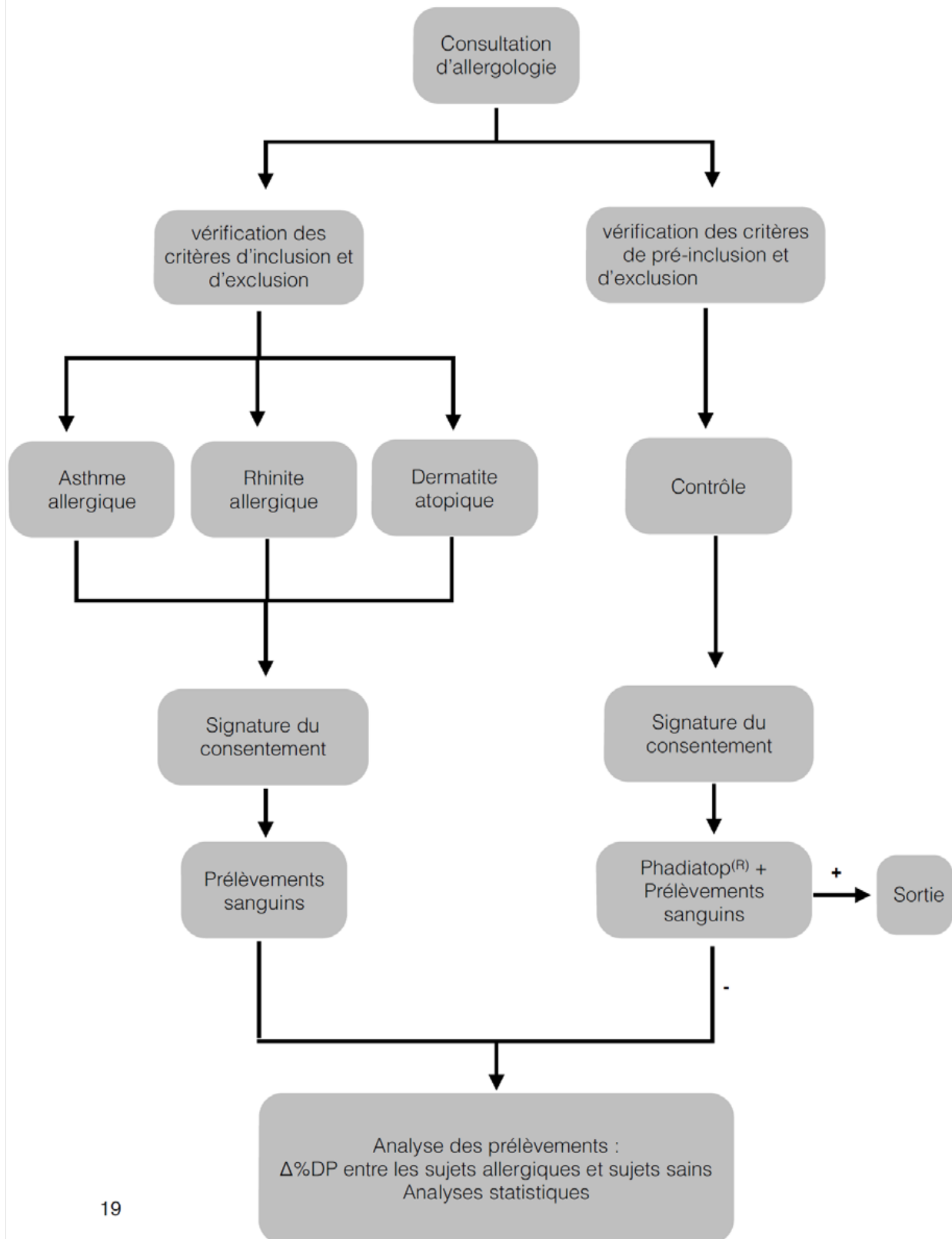
Protocole Prévall DP

Critères d'inclusion	<u>Critères d'inclusion communs :</u> • Patient âgé de 18 à 70 ans • Le patient est non-fumeur • Le patient présente un BMI inférieur à 30 kg/m² Le patient ne présente pas de contre-indication à la réalisation de prick test. • Le sujet a donné son accord pour participer à l'étude et la collection • Le sujet est affilié à un régime de sécurité sociale <u>Critères d'inclusion spécifiques des patients avec rhinite allergiques :</u> • Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique dûment diagnostiquée selon les critères ARIA (cf annexe 7) • Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique classée persistante légère ou persistante modérée à sévère selon les critères ARIA (cf annexe 7) • Le patient présente une rhinite et/ou conjonctivite allergique non contrôlée selon les critères ARIA avec ou sans traitement. (cf annexe 7) • Le patient présente une rhinite et/ou une conjonctivite imputable à la présence d'acariens • Le patient présente une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif pour le laboratoire <u>Critères d'inclusion spécifiques des patients avec dermatite atopique :</u> • Le patient présente une dermatite atopique (cf grille diagnostique) classée modérée (SCORAD entre 25 et 50) ou sévère (SCORAD > 50). (cf annexe 8) • Le patient doit présenter une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif pour le laboratoire <u>Critères d'inclusion spécifiques des patients avec asthme allergique :</u> • Le patient présente un asthme allergique diagnostiqué selon les critères GINA²¹ (cf annexe 6) • Le patient présente un asthme classé persistant léger à persistant sévère selon les critères GINA²¹ (cf annexe 6) • Le patient présente un asthme partiellement contrôlé ou non contrôlé selon l'ACQ²⁴⁻²⁵ (ACQ>1) avec ou sans traitement. (cf annexe 6) • Le patient doit présenter une sensibilisation aux acariens prouvée par prick test et/ou par recherche d'IgE spécifique à taux significativement positif pour le laboratoire
-----------------------------	--

Protocole Prévall DP

Critères de non-inclusion	• Le patient est incapable majeur ou majeur protégé • Le patient prend un traitement antimicrobien (antibiotique, antifongique ou antiviral) au long cours pour quelque raison que ce soit • Le patient a été en contact avec une bactérie multi-résistante • Le patient a bénéficié ou bénéficie d'une immunothérapie spécifique • Antécédent de cancer du système hématopoïétique (mastocytose incluse) • Antécédent de déficit immunitaire acquis par le virus HIV. • Le patient présente un déficit immunitaire congénital • Le patient présente une maladie inflammatoire du tube digestif • Le patient présente une maladie auto-immune et/ou inflammatoire qu'elle soit traitée ou non • Le patient a bénéficié d'une transplantation d'organe solide ou d'une greffe de cellules hématopoïétiques • Le patient est toxicomane • Le patient est une femme enceinte ou en âge de procréer sans contraception efficace • Le patient présente une défaillance d'organe sévère aigue ou chronique (insuffisance cardiaque, insuffisance respiratoire, insuffisance hépatique, insuffisance rénale, malabsorption). • Le patient parle difficilement français et/ou comprend difficilement le français • Le patient est dans l'incapacité de suivre le protocole • Le patient refuse la réalisation des prick-test
Critère de jugement principal	Le critère de jugement principal est le pourcentage moyen de lymphocytes T doubles positifs CD4+/CD8+ par rapport aux pourcentages moyen des lymphocytes T totaux (CD3+), des lymphocytes CD4+ et du nombre total d'éléments figurés du sang périphérique par rapport aux échantillons contrôles.
Critères de jugement secondaires	- La présence ou non d'une prolifération en présence de <i>F prausnitzii</i>. - la mise en évidence de marqueurs régulateurs tels que CTLA4, LAG3, CD25 et GITR sur les DP8 après prolifération avec <i>F prausnitzii</i> - Le taux de prolifération moyen des lymphocytes T doubles positifs spécifiques de <i>F prausnitzii</i> en présence de différentes espèces bactériennes dont <i>F prausnitzii</i>. - Evaluation du degré de sévérité de la maladie allergique : - SCORAD pour la dermatite atopique²³ - Sévérité de l'asthme selon l'ACQ²⁴⁻²⁵ - Sévérité de la rhinite allergique selon l'ARIA²² - Le taux de prolifération moyen des lymphocytes T doubles positifs spécifiques d'acariens (<i>Dermatophagoïdes ptérynyssinus</i>).
Etude ancillaire :	Non applicable
Autres évaluations	Non applicable
Analyse statistiques	Les analyses statistiques porteront sur des analyses descriptives de chaque population de lymphocytes T double positifs CD4+/CD8+. Une comparaison des moyennes de ces populations sera effectuée entre les trois groupes de patients et les échantillons contrôles. Des t-tests et des ANOVA permettront de tester les différences entre les groupes.

Annexe 2



1. Objet

Décrire les modalités pratiques de l'isolation et la congélation des cellules mononuclées (PBMC) à partir de sang total des patients prélevés dans des tubes héparine.

2. Objectifs

Assurer que l'isolation des PBMC soit réalisée dans les mêmes conditions pour chaque patient.

3. Domaine d'application

Ce mode opératoire s'adresse au personnel de l'U1087 responsable de la gestion de la biocollection COLT.

4. Description de la manipulation à réaliser

ATTENTION : Manipulation à réaliser en salle de culture cellulaire

4.1. Matériel nécessaire

- Bain Marie
- Tubes 50 mL et 15 mL
- Tubes 50 mL opaques
- Centrifugeuse (allant jusqu'à 4000g et pouvant contenir les tubes de 50ml)
- Cônes stériles (200 et 1000 µl)
- Crayon indélébile
- Gants
- Glace et contenant pour la glace
- Pipette (10 et 1000µl)
- Pipettes stériles jetables 25 mL, 10 mL et 5 mL
- Pipetteur automatique
- Portoirs 24 tubes 50ml
- Poubelles DASRI
- Tubes Eppendorf 1.5 mL
- Pastette stérile
- Ficoll Paque Plus (17-1440-03, GE Healthcare)
- Lysing Buffer (555899, BD Pharm Lyse)
- Eau stérile
- PBS
- Milieu de culture RPMI + L-Glutamine
- Sérum de Veau Fœtal décomplémenté
- DMSO
- Scepter + tips (Millipore)
- Cryotubes
- Boîte de congélation

4.2. Technique

Préparation de la solution de lyse :

- Dans un tube de 50mL opaque, ajouter 45mL d'eau stérile, puis 5mL de solution de lyse 10X. Mélanger par retournement. La solution se conserve 1 mois à +4°C.

Préparation de la manipulation :

- Allumer le bain-marie et le régler à 37°C.
- Mettre à chauffer le PBS.
- Laisser les tubes de sang à température ambiante au moins 15 min s'ils sont froids.
- Par échantillon, préparer trois tubes de 50mL, annoté avec l'identifiant du patient et la visite.
- Mettre le sang des trois tubes héparine dans un des tubes 50mL.
- Diluer le sang au demi dans du PBS préchauffé (soit généralement env 25mL) pour compléter jusqu'à 50mL. Si le volume de sang est inférieur à 15mL, compléter jusqu'à 30mL seulement et n'utiliser qu'un seul tube de Ficoll par la suite).
- Dans les deux autres tubes 50mL, ajouter 10mL de solution de Ficoll par tube (1/3 Ficoll 2/3 sang).

Réalisation du gradient de densité :

- Mélanger le sang par retournement.
- Incliner le tube contenant le Ficoll et avec une pipette de 25 mL, ajouter très doucement le sang dessus sans qu'il se mélange.
- Faire de même avec le deuxième tube et le reste de sang.
- Equilibrer les deux tubes entre eux.
- Centrifuger à 1900 rpm pendant 20 min à Température Ambiante sans frein ni accélération.

Rinçage et lyse des globules rouges :

- Préparer un nouveau tube 50 mL avec l'identifiant du patient et la visite.
- A l'aide d'une pastette stérile, récupérer l'anneau contenant les PBMC avec une aspiration constante et le mettre dans le tube 50 mL.
- Compléter avec du PBS jusqu'à 45 mL. Mélanger par retournement.

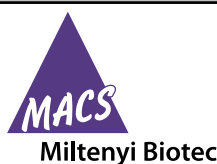
- Centrifuger à 1500 rpm pendant 10 min à +4°C.
- Mettre sur glace.
- Enlever le surnageant et reprendre le culot cellulaire dans 1 ou 2mL de solution de lyse préalablement mis à TA.
- Incuber 5 min à TA dans le noir si possible.
- Ajouter 10 ou 15 mL de PBS.
- Centrifuger à 1000 rpm pendant 10 min à +4°C.
- Mettre sur glace.
- Enlever le surnageant et reprendre le culot dans 1mL (ou 2 selon la taille du culot) de RPMI froid.
- Compter

Comptage des cellules :

- Préparer des tubes Eppendorf avec 990 µL de PBS
- Bien homogénéiser les cellules en RPMI. Prélever 10 µL de cette solution et l'ajouter dans le PBS.
- Bien homogénéiser la dilution.
- Allumer le scepter, ajouter un tips.
- Charger le tips dans la dilution et appuyer sur le piston rose. Le Scepter va aspirer le volume nécessaire et réaliser le comptage.
- Enlever le Tips pour avoir le résultat du comptage.
- Le résultat est donné en nombre de cellules par mL, il faut le multiplier par le facteur de dilution :
 - 100 * 1 pour une dilution au 1/100^{ème} d'une suspension de 1 mL de RPMI,
 - 100 * 2 pour une dilution au 1/100^{ème} d'une suspension de 2 mL de RPMI.
- Les cellules sont congelées à 1×10^7 cellules/mL par ampoule. Calculer le nombre d'ampoules nécessaire par patient.

Congélation des cellules :

- Centrifuger les tubes 10 min à 1500 rpm +4°C
- Préparer deux tubes de 15 mL : A et B
- Préparer les mix de congélation : mix A = 40 %RPMI + 60% SVF, mix B = 80% SVF + 20% DMSO (voir le tableau de correspondance)
- Préparer les cryotubes 2mL et les étiqueter (identifiant patient + visite + concentration cellulaire + nombre d'ampoule + date prélèvement).
- Enlever le surnageant des tubes
- Ajouter le mix A (RPMI + SVF) et bien resuspendre le culot
- Ajouter le mix B (SVF + DMSO), mélanger par aspiration-refoulement et disperser dans les cryotubes.
- Disposer les cryotubes dans les boîtes de congélation et mettre rapidement au congélateur à -80°C pendant 24h avant de les stocker dans l'azote liquide (noter l'emplacement sur le plan de boîte).



CD14 MicroBeads human

Order no. 130-050-201

Contents

1. Description
 - 1.1 Principle of the MACS® Separation
 - 1.2 Background information
 - 1.3 Applications
 - 1.4 Reagent and instrument requirements
2. Protocol
 - 2.1 Sample preparation
 - 2.2 Magnetic labeling
 - 2.3 Magnetic separation
3. Example of a separation using the CD14 MicroBeads
4. References

1. Description

Components	2 mL CD14 MicroBeads, human: MicroBeads conjugated to monoclonal anti-human CD14 antibodies (isotype: mouse IgG2a).
Capacity	For 10 ⁹ total cells, up to 100 separations.
Product format	CD14 MicroBeads are supplied in buffer containing stabilizer and 0.05% sodium azide.
Storage	Store protected from light at 2–8 °C. Do not freeze. The expiration date is indicated on the vial label.

1.1 Principle of the MACS® Separation

First, the CD14⁺ cells are magnetically labeled with CD14 MicroBeads. Then, the cell suspension is loaded onto a MACS® Column which is placed in the magnetic field of a MACS Separator. The magnetically labeled CD14⁺ cells are retained within the column. The unlabeled cells run through; this cell fraction is thus depleted of CD14⁺ cells. After removing the column from the magnetic field, the magnetically retained CD14⁺ cells can be eluted as the positively selected cell fraction.

1.2 Background information

CD14 MicroBeads are used for the positive selection or depletion of human monocytes and macrophages from cord blood or PBMCs, as well as pleural, peritoneal, or synovial fluids or from various tissues, such as spleen and lymph node. The CD14 antigen belongs to the LPS receptor complex. Binding of antibody to CD14 does not trigger signal transduction since CD14 lacks a cytoplasmic domain. CD14 is strongly expressed on most monocytes and macrophages and weakly on neutrophils and some myeloid dendritic cells.

1.3 Applications

- Isolation of CD14⁺ monocytes for *in vitro* generation of dendritic cells¹ or macrophages^{2,3}.
- Isolation of CD14⁺ monocytes for studies on cytotoxicity⁴ and migration⁵.

1.4 Reagent and instrument requirements

- Buffer:** Prepare a solution containing phosphate-buffered saline (PBS), pH 7.2, 0.5% bovine serum albumin (BSA), and 2 mM EDTA by diluting MACS BSA Stock Solution (# 130-091-376) 1:20 with autoMACS™ Rinsing Solution (# 130-091-222). Keep buffer cold (2–8 °C). Degas buffer before use, as air bubbles could block the column.

▲ **Note:** EDTA can be replaced by other supplements such as anticoagulant citrate dextrose formula-A (ACD-A) or citrate phosphate dextrose (CPD). BSA can be replaced by other proteins such as human serum albumin, human serum, or fetal bovine serum. Buffers or media containing Ca²⁺ or Mg²⁺ are not recommended for use.

- MACS Columns and MACS Separators:** CD14⁺ cells can be enriched by using MS, LS, or XS Columns or depleted with the use of LD, CS, or D Columns. Cells which strongly express the CD14 antigen can also be depleted using MS, LS, or XS Columns. Positive selection or depletion can also be performed by using the autoMACS or the autoMACS Pro Separator.

Column	Max. number of labeled cells	Max. number of total cells	Separator
Positive selection			
MS	10 ⁷	2×10 ⁸	MiniMACS, OctoMACS, VarioMACS, SuperMACS
LS	10 ⁸	2×10 ⁹	MidiMACS, QuadroMACS, VarioMACS, SuperMACS
XS	10 ⁹	2×10 ¹⁰	SuperMACS
Depletion			
LD	10 ⁸	5×10 ⁸	MidiMACS, QuadroMACS, VarioMACS, SuperMACS
CS	2×10 ⁸		VarioMACS, SuperMACS
D	10 ⁹		SuperMACS
Positive selection or depletion			
autoMACS	2×10 ⁸	4×10 ⁹	autoMACS, autoMACS Pro

▲ **Note:** Column adapters are required to insert certain columns into the VarioMACS™ or SuperMACS™ Separators. For details see the respective MACS Separator data sheet.

- (Optional) Fluorochrome-conjugated CD14 antibody for flow cytometric analysis, e.g., CD14-FITC (# 130-080-701), CD14-PE (# 130-091-242), or CD14-APC (# 130-091-243). For more information about other fluorochrome-conjugates see www.miltenyibiotec.com.

Miltenyi Biotec GmbH
Friedrich-Ebert-Straße 68, 51429 Bergisch Gladbach, Germany
Phone +49 2204 8306-0, Fax +49 2204 85197
macs@miltenyibiotec.de
www.miltenyibiotec.com

Miltenyi Biotec Inc.
2303 Lindbergh Street, Auburn, CA 95602, USA
Phone 800 FOR MACS, +1 530 888 8871, Fax +1 530 888 8925
macs@miltenyibiotec.com

page 1/4

- (Optional) Propidium iodide (PI) or 7-AAD for flow cytometric exclusion of dead cells.
- (Optional) Dead Cell Removal Kit (# 130-090-101) for the depletion of dead cells.
- (Optional) Pre-Separation Filters (# 130-041-407) to remove cell clumps.

2. Protocol

2.1 Sample preparation

When working with anticoagulated peripheral blood or buffy coat, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) should be isolated by density gradient centrifugation, for example, using Ficoll-Paque™. For details see the General Protocols section of the respective separator user manual. The General Protocols are also available at www.miltenyibiotec.com/protocols.

▲ **Note:** To remove platelets after density gradient separation, resuspend cell pellet in buffer and centrifuge at 200×g for 10–15 minutes at 20 °C. Carefully aspirate supernatant. Repeat washing step.

When working with tissues or lysed blood, prepare a single-cell suspension using standard methods. For details see the General Protocols section of the respective separator user manual. The General Protocols are also available at www.miltenyibiotec.com/protocols.

▲ Dead cells may bind non-specifically to MACS MicroBeads. To remove dead cells, we recommend using density gradient centrifugation or the Dead Cell Removal Kit (# 130-090-101).



2.2 Magnetic labeling

▲ Work fast, keep cells cold, and use pre-cooled solutions. This will prevent capping of antibodies on the cell surface and non-specific cell labeling.

▲ Volumes for magnetic labeling given below are for up to 10^7 total cells. When working with fewer than 10^7 cells, use the same volumes as indicated. When working with higher cell numbers, scale up all reagent volumes and total volumes accordingly (e.g. for 2×10^7 total cells, use twice the volume of all indicated reagent volumes and total volumes).

▲ For optimal performance it is important to obtain a single-cell suspension before magnetic separation. Pass cells through 30 µm nylon mesh (Pre-Separation Filters, # 130-041-407) to remove cell clumps which may clog the column. Wet filter with buffer before use.

▲ Working on ice may require increased incubation times. Higher temperatures and/or longer incubation times may lead to non-specific cell labeling.

1. Determine cell number.
2. Centrifuge cell suspension at 300×g for 10 minutes. Aspirate supernatant completely.
3. Resuspend cell pellet in 80 µL of buffer per 10^7 total cells.
4. Add 20 µL of CD14 MicroBeads per 10^7 total cells.
5. Mix well and incubate for 15 minutes in the refrigerator (2–8 °C).

6. (Optional) Add staining antibodies, e.g., 10 µL of CD14-FITC (# 130-080-701), and incubate for 5 minutes in the dark in the refrigerator (2–8 °C).
7. Wash cells by adding 1–2 mL of buffer per 10^7 cells and centrifuge at 300×g for 10 minutes. Aspirate supernatant completely.
8. Resuspend up to 10^8 cells in 500 µL of buffer.
 - ▲ **Note:** For higher cell numbers, scale up buffer volume accordingly.
 - ▲ **Note:** For depletion with LD Columns, resuspend up to 1.25×10^8 cells in 500 µL of buffer.
9. Proceed to magnetic separation (2.3).



2.3 Magnetic separation

▲ Choose an appropriate MACS Column and MACS Separator according to the number of total cells and the number of CD14⁺ cells. For details see table in section 1.4.

Magnetic separation with MS or LS Columns

1. Place column in the magnetic field of a suitable MACS Separator. For details see the respective MACS Column data sheet.
2. Prepare column by rinsing with the appropriate amount of buffer:
MS: 500 µL LS: 3 mL
3. Apply cell suspension onto the column.
4. Collect unlabeled cells that pass through and wash column with the appropriate amount of buffer. Collect total effluent; this is the unlabeled cell fraction. Perform washing steps by adding buffer three times. Only add new buffer when the column reservoir is empty.
MS: 3×500 µL LS: 3×3 mL
5. Remove column from the separator and place it on a suitable collection tube.
6. Pipette the appropriate amount of buffer onto the column. Immediately flush out the magnetically labeled cells by firmly pushing the plunger into the column.
MS: 1 mL LS: 5 mL
7. (Optional) To increase the purity of CD14⁺ cells, the eluted fraction can be enriched over a second MS or LS Column. Repeat the magnetic separation procedure as described in steps 1 to 6 by using a new column.

Magnetic separation with XS Columns

For instructions on the column assembly and the separation refer to the XS Column data sheet.

Annexe 5

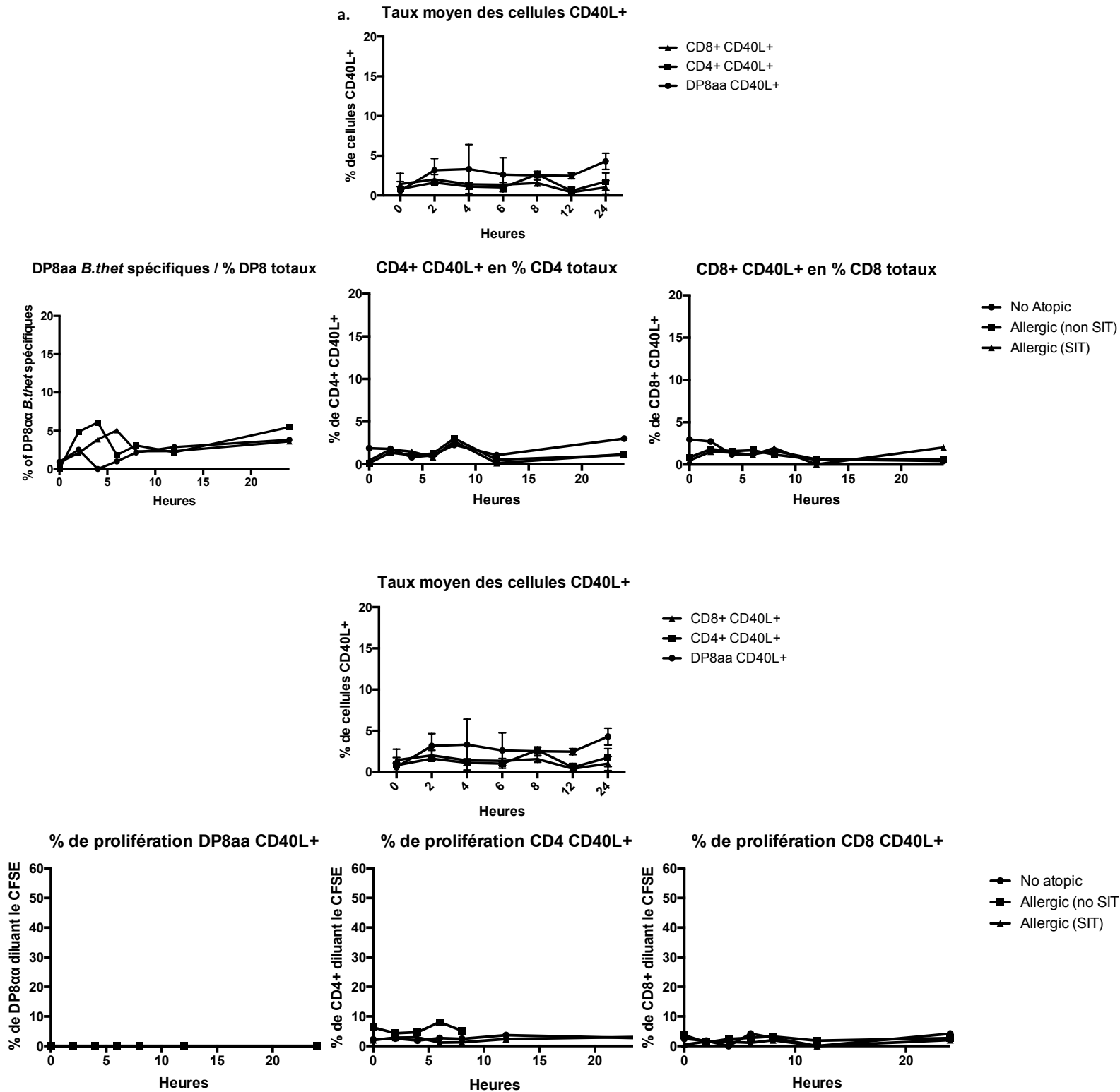
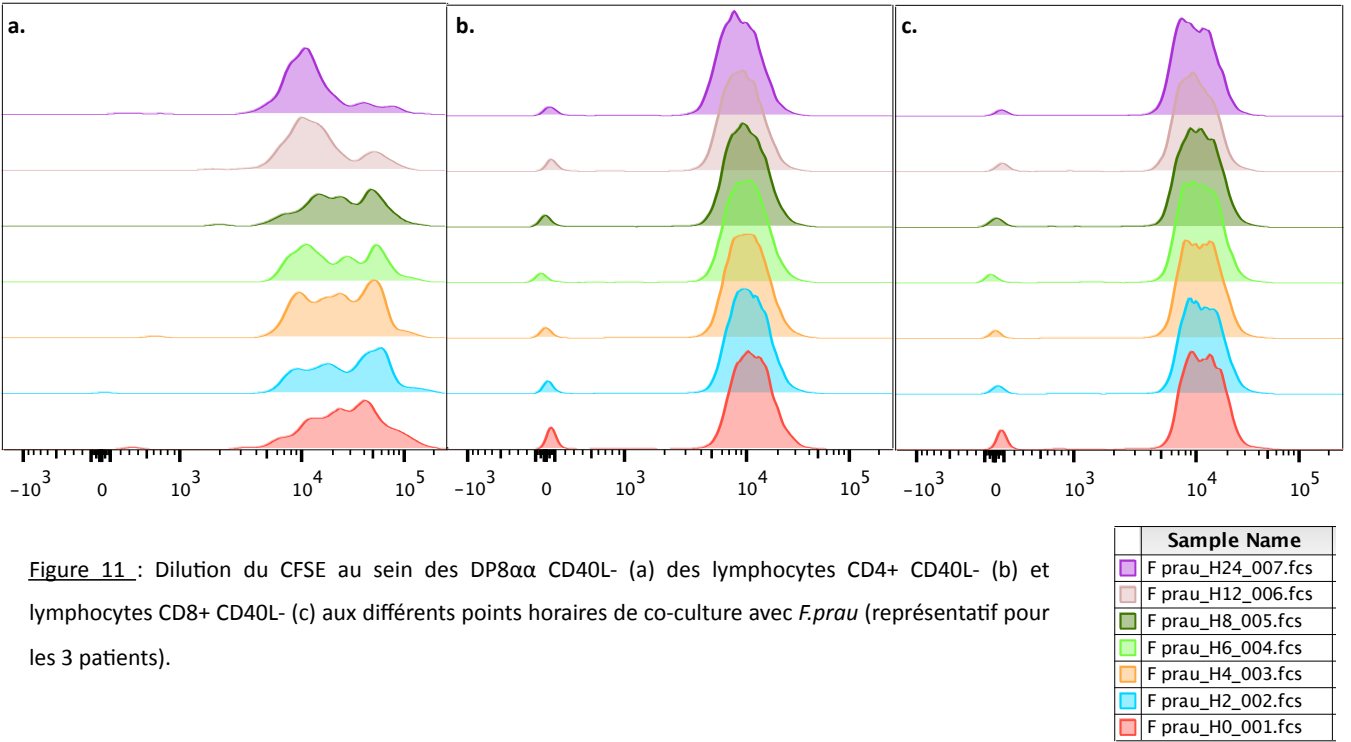
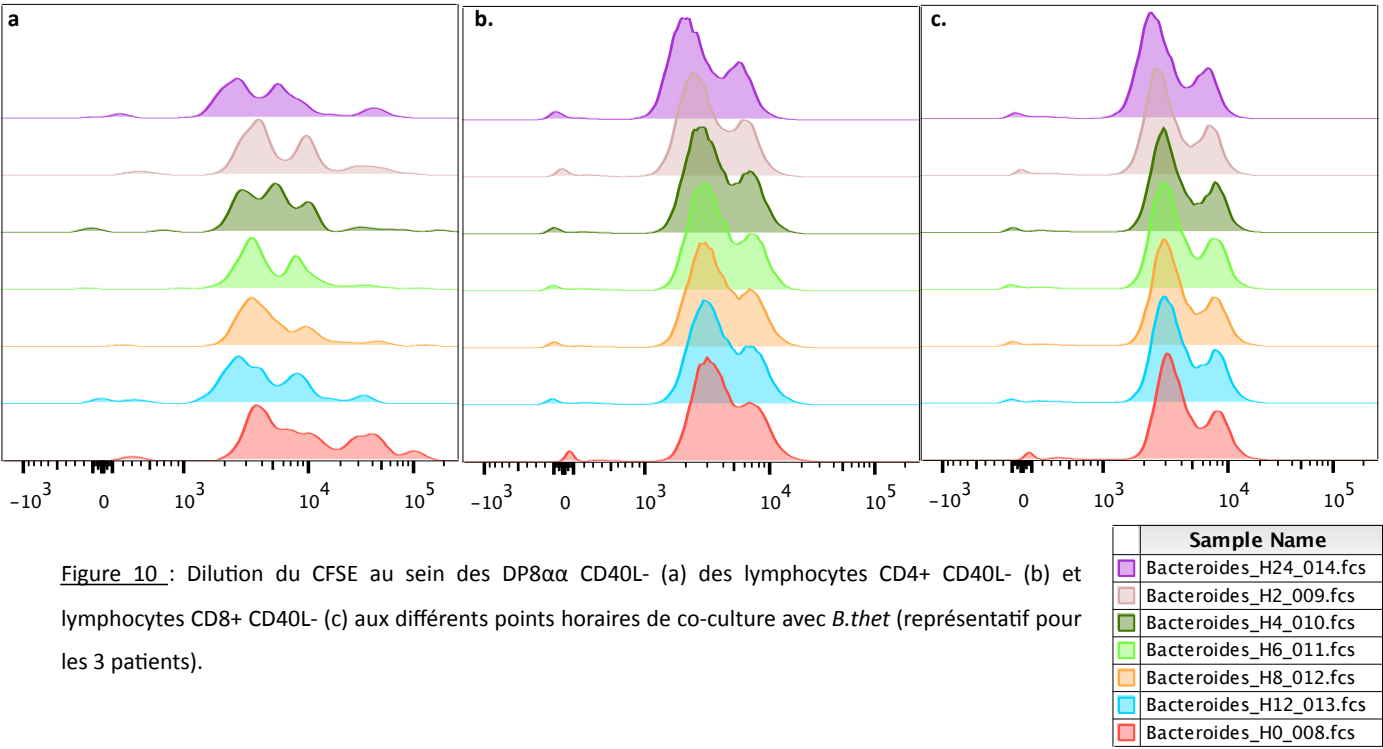


Figure 9 : (a) Taux de DP8aa spécifiques de *B.thet* par détection du CD40L en fonction du temps de co-culture (heure) avec des monocytes autologues chargés avec la bactérie.(b)Prolifération des DP8aa spécifiques de *B.thet* par dilution du CFSE en fonction du temps de co-culture (heure) avec des monocytes autologues chargés avec la bactérie.

Annexe 6



Annexe 7

Sujet

Intitulé français du sujet de thèse proposé (limité à 120 caractères espaces compris) :
Lymphocytes T CD4+CD8+αα spécifiques de *F. prau*: Caractérisation et étude de leurs interactions avec les lymphocytes B.

Intitulé en anglais du sujet proposé : CD4+ CD8+αα T lymphocytes specific for *F.prau* :
Characterization and study of their interactions with B lymphocytes.

Encadrement

Nom et prénom du directeur de thèse (obligatoirement HDR) : Dr Sophie Brouard

% d'encadrement (minimum 40%) : 60%

Mail du directeur de thèse : sophie.brouard@univ-nantes.fr

Téléphone du directeur de thèse : 02 40 08 78 42

Fax du directeur de thèse : 02 40 08 74 11

Nom et prénom du co-directeur de thèse : Pr Antoine Magnan

% encadrement : 20%

Mail du co-directeur de thèse : antoine.magnan@univ-nantes.fr

Téléphone du co-directeur de thèse : 02 28 08 01 26

Fax du co-directeur de thèse :

Nom et prénom du co-encadrant : Pr Francine Jotereau

% encadrement : 20%

Mail du co-encadrant : francine.jotereau@univ-nantes.fr

Téléphone du co-encadrant : 02 28 08 02 44

Fax du co-encadrant : 02 40 35 66 97

Laboratoire d'accueil

Intitulé (avec identification de l'équipe s'il y a lieu) : UMR Inserm 1064

Nom et prénom du responsable du laboratoire : Dr Ignacio Anegón

Nom et prénom du responsable de l'équipe : Dr Sophie Brouard

Etudiant pressenti (s'il y a lieu) : COLAS Luc

Financement acquis

Si oui, continuez la saisie, si non, passez directement à l'étape 7 : Non

Projet de thèse (sera mise en ligne sur le site web de l'ED)

Saisir ou copier coller ci-dessous (limité à 2000 caractères espaces compris) :

Les DP8 $\alpha\alpha$ spécifiques de *F.prau* (DP) ont été mis en évidence dans la lamina propria colique et les PBMC de patients atteints de maladies inflammatoires du tube digestif (Sarrabeyrouse and al, PlosOne 2014). Ces lymphocytes, après un contact TCR dépendant avec la bactérie, acquièrent des fonctions régulatrices et expriment fortement CD40L. Aucune donnée n'est disponible sur leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles chez le sujet sain ni sur leur implication en pathologie. En parallèle, l'implication des lymphocytes B (LyB) dans l'asthme allergique via la diminution des lymphocytes B régulateurs (Breg) CD9+ (Braza and al, Allergy 2015) et la dermatite atopique (Czwarnowicki and a, JACI 2016) via l'augmentation des LyB transitionnels et mémoires sécréteurs d'IgE a été montrée. La présence de ces Breg a été retrouvée en transplantation rénale avec une augmentation des LyB transitionnels, naïfs exprimant fortement granzyme B (Chesneau and al, AJT 2014 – JASN 2015). L'objectif de ma thèse sera dans un premier temps de caractériser les DP8 $\alpha\alpha$. Ils seront isolés et expandus à partir de PBMC de volontaires sains afin d'effectuer une étude transcriptomique qui sera réalisée en collaboration avec l'équipe du Pr Jotereau . Dans un deuxième temps, cette étude transcriptomique nous permettra de formuler des hypothèses sur les interactions avec les LyB via le CD40L et d'étudier les fonctions possibles de ces interactions in vitro. L'implication du microbiote intestinal dont *F.prau* dans la survenue et/ou l'exacerbation des allergies commence à émerger. Une corrélation statistique entre la diminution des bactéries du phylum *Firmicutes* (dont fait partie *F.prau*) et la survenue de complications de la transplantation rénale à 1 mois a également été observée. Le troisième volet de ce travail consistera ainsi à tester la variation quantitative et/ou qualitative des DP8 $\alpha\alpha$ sur des PBMC d'allergiques en exacerbation et de transplantés rénaux ainsi que le ratio DP8 $\alpha\alpha$ /cellules B.

BIBLIOGRAPHIE

- Bonvalet M, Wambre E, Moussu H, Horiot S, Kwok WW, Louise A, Ebo D, Hoarau C, Van Overtvelt L, Baron-Bodo V, Moingeon P (2011). *Comparison between major histocompatibility complex class II tetramer staining and surface expression of activation markers for the detection of allergen-specific CD4⁺ T cells*. Clin Exp Allergy.
- Braza F, Chesne J, Castagnet S, Magnan A, Brouard S (2014). *Regulatory functions of B cells in allergic diseases*. Allergy.
- Campbell JD (2003). *Detection and enrichment of antigen-specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells based on cytokine secretion*. Methods. Oct.
- Chatenoud L et Bach JF (2012). *Immunologie, de la biologie à la clinique*. 6^e édition. Médecine Sciences Flammarion. ISBN : 978-2-257-20529-2
- Chattopadhyay PK, Yu J, Roederer M. (2006) Live-cell assay to detect antigen-specific CD4⁺ T-cell responses by CD154 expression. Nat Protoc..
- Colombatti, A., Doliana, R., Schiappacassi, M., Argentini, C., Tonutti, E., Feruglio, C., Sala, P., (1998). *Age related persistent clonal expansions of CD28⁻ cells: phenotypic and molecular TCR analysis reveals both CD4(+) and CD4(+)CD8(+) cells with identical CDR3 sequences*. Clin. Immunol. Immunopathol.
- Frentsch M, Arbach O, Kirchhoff D, Moewes B, Worm M, Rothe M, Scheffold A, Thiel A (2005). Direct access to CD4⁺ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. Nat Med. Oct
- Hooper LV, Macpherson AJ (2010). *Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota*. Nat Rev Immunol.
- Huffnagle GB (2014). *Increase in dietary fiber dampens allergic responses in the lung*. Nat Med.
- Kitamura K, Farber JM, Kelsall BL (2010). *CCR6 marks regulatory T cells as a colon-tropic, IL-10-producing phenotype*. J Immunol.
- Kitchen SG, Whitmire JK, Jones NR, Galic Z, Kitchen CM, Ahmed R, Zack JA (2005). *The CD4 molecule on CD8⁺ T lymphocytes directly enhances the immune response to viral and cellular antigens*. Proc Natl Acad Sci U S A.
- Marsland BJ, Trompette A, Gollwitzer ES (2015). *The Gut-Lung Axis in Respiratory Disease*. Ann Am Thorac Soc.
- Memon SA, Sportès C, Flomerfelt FA, Gress RE, Hakim FT (2012). *Quantitative analysis of T cell receptor diversity in clinical samples of human peripheral blood*. J Immunol Methods.
- Miquel S, Martín R, Bridonneau C, Robert V, Sokol H, Bermúdez-Humarán LG, Thomas M, Langella P (2014). *Ecology and metabolism of the beneficial intestinal commensal bacterium Faecalibacterium prausnitzii*. Gut Microbes.
- Parel Y, Chizzolini C (2004). *CD4⁺ CD8⁺ double positive (DP) T cells in health and disease*. Autoimmunity review.
- Pawelec, G., Adibzadeh, M., Pohla, H., Schaudt, K., (1995). *Immunosenescence: Aging of the immune system*. Immunol. Today

- Quévrain E, Maubert MA, Michon C, Chain F, Marquant R, Tailhades J, Miquel S, Carlier L, Bermúdez-Humarán LG, Pigneur B, Lequin O, Kharrat P, Thomas G, Rainteau D, Aubry C, Breyner N, Afonso C, Lavielle S, Grill JP, Chassaing G, Chatel JM, Trugnan G, Xavier R, Langella P, Sokol H, Seksik P (2016). *Identification of an anti-inflammatory protein from Faecalibacterium prausnitzii, a commensal bacterium deficient in Crohn's disease*. Gut.
- Rossi O, van Berkel LA, Chain F, Tanweer Khan M, Taverne N, Sokol H, Duncan SH, Flint HJ, Harmsen HJ, Langella P, Samsom JN, Wells JM (2016). *Faecalibacterium prausnitzii A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses*. Sci Rep.
- Sarrabayrouse G, Alameddine J, Altare F, Jotereau F (2015). *Microbiota-Specific CD4CD8 $\alpha\alpha$ Tregs: Role in Intestinal Immune Homeostasis and Implications for IBD*. Front Immunol.
- Sarrabayrouse G, Bossard C, Chauvin JM, Jarry A, Meurette G, Quévrain E, Bridonneau C, Preisser L, Asehnoune K, Labarrière N, Altare F, Sokol H, Jotereau F (2014). *CD4CD8 $\alpha\alpha$ lymphocytes, a novel human regulatory T cell subset induced by colonic bacteria and deficient in patients with inflammatory bowel disease*. PLoS Biol.
- Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humarán LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottière HM, Doré J, Marteau P, Seksik P, Langella P (2008). *Faecalibacterium prausnitzii is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients*. Proc Natl Acad Sci U S A.
- Song H, Yoo Y, Hwang J, Na YC, Kim HS (2016). *Faecalibacterium prausnitzii subspecies-level dysbiosis in the human gut microbiome underlying atopic dermatitis*. J Allergy Clin Immunol.
- Zuckermann F. (1999). *Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells*. Veterinary Immunology and Immunopathology.

PAGE DES SIGNATURES

Vu, le Président du Jury,

Vu, le Directeur de Thèse,

Vu, le Doyen de la Faculté,

RESUME

Nom : COLAS

Prénom : Luc

Titre : Protocole PREVALL DP, étude de la fréquence et de la fonction régulatrice des lymphocytes T doubles positifs CD4CD8 $\alpha\alpha$ induits par une bactérie du microbiote intestinal (*Faecalibacterium prausnitzii*) dans l'asthme allergique, la dermatite atopique et la rhinite allergique : conception et mise en place.

Le protocole de recherche clinique PREVALL DP est une étude translationnelle, monocentrique, en simple aveugle et contrôlée. L'hypothèse de travail repose sur la mise en évidence récente d'une sous population de lymphocytes T régulateurs induits après contact avec une bactérie commensale du tube digestif *Faecalibacterium prausnitzii* (*F.prau*) dont la caractéristique phénotypiques majeure est la co-expression des marqueurs CD4 et CD8 $\alpha\alpha$ (DP8 $\alpha\alpha$). Il existe un lien épidémiologique entre la survenue des maladies allergiques et la présence d'une dysbiose intestinale. Cependant les mécanismes sous-jacents sont actuellement mal connus. L'objectif du protocole PREVALL DP est de mettre en évidence une diminution attendue des DP8 $\alpha\alpha$ spécifiques de *F.prau* quantitative et/ou qualitative chez les patients allergiques en comparaison à des volontaires sains non atopiques appariés sur l'âge. La recherche clinique est une entité particulière dont la réglementation est inscrite dans la loi et le Code de Santé Publique. La conception et la gestion d'un protocole de recherche clinique est un processus dynamique nécessitant un travail en équipe afin d'en valoriser les résultats *in fine*. Ce travail de thèse propose dans un premier temps une vision générale de la législation entourant la recherche clinique en France. Il mettra par la suite l'accent sur les étapes essentielles à la conception et la mise en place du protocole PREVALL DP ainsi que sa gestion en insistant sur le recrutement des patients impliquant une participation des confrères libéraux et la mise en place des stratégies d'analyse des DP8 $\alpha\alpha$ pour l'approche translationnelle du protocole.

Mots clés : Recherche clinique, lymphocytes T doubles positifs CD4+ CD8 $\alpha\alpha$, microbiote intestinal, *Faecalibacterium prausnitzii*, maladies allergiques.