

# Thèse de Doctorat

Philippe LACOSTE

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université de Nantes  
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie Santé

Discipline : biomolécules, pharmacologie, thérapeutique

Spécialité : biologie des organismes

Unité de recherche : Unité INSERM UMR 1087

Soutenue le 02 décembre 2016

Thèse N° :

## Analyse du profil lymphocytaire T au cours du rejet chronique en transplantation pulmonaire dans le cadre de la cohorte COLT

### JURY

|                      |                                                                                                                                                                       |
|----------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Rapporteurs :        | <b>Eliane PIAGGIO</b> , Directeur de recherche, Institut Curie U932, Université Paris V Descartes<br><b>Pascal-Alexandre THOMAS</b> , PU-PH, Université Aix-Marseille |
| Examineur :          | <b>Jean-Christian ROUSSEL</b> , PU-PH, Université de Nantes                                                                                                           |
| Directeur de Thèse : | <b>Antoine MAGNAN</b> , PU-PH, Université de Nantes                                                                                                                   |
| Présidente du Jury : | <b>Sophie BROUARD</b> , Directeur de recherche, Unité INSERM 1064, Université de Nantes                                                                               |

## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord, à remercier Antoine Magnan, de m'avoir accueilli dans son unité depuis mon master 1 en 2011 et de soutenir mes travaux année après année. J'ai conscience que je vous dois beaucoup, notamment celui d'avoir le privilège de pouvoir travailler sur cet outil incroyable qu'est COLT. Merci pour votre soutien, et votre confiance. J'apprécie profondément la qualité et la sincérité de nos rapports.

Un grand merci également au Dr Eliane Piaggio et au Pr Pascal Thomas, d'avoir bien voulu accepter d'être rapporteurs de ma thèse, malgré vos emplois du temps respectif. Votre venue, à Nantes, m'honore.

Je tiens aussi à remercier Sophie Brouard et Jean-Christian Roussel d'avoir bien voulu faire partie de mon jury.

A Maxim Durand, sans qui, je ne vois pas comment, j'aurais pu soutenir ma thèse. Tu es un scientifique intelligent et rigoureux, et un homme de grande valeur. J'ai adoré travailler avec toi, et je te remercie très sincèrement de ton aide, tes explications, tes conseils et ta compréhension devant parfois mes difficultés à jongler de la chirurgie à l'immunologie.

A l'ensemble de l'équipe du laboratoire, que je retrouve avec grand plaisir toutes les semaines (quand la CTCV le permet !) :

- Jennifer Loy et Eugénie Durand : merci pour votre aide indispensable à la sélection des patients, des échantillons ... et tant de choses, et bravo pour les bébés !
- à Marie-Aude, PJ Royer
- à Carole : merci pour ton aide, et parfois tes histoires aussi
- et aux plus récents arrivés : Kelly, Martin (non..Martin...je n'ai pas 40 ans...), luc
- à Laure (dit chatoune),
- à Grégory : nous n'en avons pas fini ensemble, car des souris attendent d'être transplantées !

Mention spéciale à ceux qui ont égayés mon master 2, accompagnés ma thèse de science mais qui ont maintenant choisi d'autres routes :

- Damien Reboulleau : on va bientôt se retrouver grâce à tes cours et tes talents de Kiné
- Sandie Parès et Morane Cavallec : ces résultats sont aussi les vôtres, merci pour votre implication et vos sourires sur ce projet.

Un grand merci à tous les ARC et cliniciens qui font vivre COLT et permettent de réaliser les projets attendants.

A mon Père, mes frères, j'aime tellement les moments que nous passons ensemble, et ils ne sont pas assez nombreux.

A Léo et Valentin, qui grandissent si vite, on peut me voler parfois le temps que je passe avec vous, mais pas l'amour que je vous porte.

A Nini, merci de tenir et de supporter tout ça, après une année très éprouvante. Je suis impressionné par ta façon d'être admirable en toute circonstance, impressionné et très reconnaissant.

A ma Mère, les années passent mais ton étoile brille toujours autant.



# Sommaire

|                                                                                                                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Liste des abréviations .....                                                                                                                                                                  | 5         |
| Avant propos.....                                                                                                                                                                             | 7         |
| I- INTRODUCTION .....                                                                                                                                                                         | 9         |
| <b>1- Immunologie de la transplantation.....</b>                                                                                                                                              | <b>11</b> |
| 1-1 Molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité .....                                                                                                                                   | 11        |
| 1-1-1 Génétique .....                                                                                                                                                                         | 11        |
| 1-1-2 Diversité épidémiologique .....                                                                                                                                                         | 12        |
| 1-2 Présentation d'antigène.....                                                                                                                                                              | 13        |
| 1-3 Réponse lymphocytaire T .....                                                                                                                                                             | 15        |
| 1-3-1 Lymphocytes T CD4+ .....                                                                                                                                                                | 15        |
| 1-3-2 Lymphocytes T CD8+ .....                                                                                                                                                                | 18        |
| 1-4 Principe de l'alloréactivité lymphocytaire T.....                                                                                                                                         | 19        |
| 1-4-1 Reconnaissance du soi et du non soi.....                                                                                                                                                | 19        |
| Figure 4 : les différentes voies de la présentation allogénique .....                                                                                                                         | 23        |
| 1-4-2 Tolérance .....                                                                                                                                                                         | 23        |
| <b>2- Dysfonction chronique du greffon (CLAD) .....</b>                                                                                                                                       | <b>25</b> |
| 2-1- Manifestations cliniques et fonctionnelles.....                                                                                                                                          | 25        |
| 2-1-1 le syndrome de bronchiolite oblitérante .....                                                                                                                                           | 25        |
| Figure 5 : Mesure de volumes pulmonaires et radiographie de patients atteints de bronchiolite oblitérante.....                                                                                | 26        |
| 2-1-2 Le syndrome allogénique restrictif.....                                                                                                                                                 | 26        |
| Figure 6 : Mesures de volumes pulmonaires et radiographie d'un patient atteint d'un RAS. ....                                                                                                 | 27        |
| 2-1-3 arbre décisionnel de diagnostic clinique du CLAD.....                                                                                                                                   | 27        |
| Figure 7 : Algorithme clinique devant une dysfonction du greffon pulmonaire d'après Verleden A new classification system for chronic lung allograft dysfunction. J Heart Lung Transplant..... | 28        |
| 2-2- Rôle de l'immunité innée .....                                                                                                                                                           | 28        |
| 2-2-1- Reconnaissance des molécules exogènes et endogènes .....                                                                                                                               | 28        |
| 2-2-2- Activation des cellules épithéliales bronchiques.....                                                                                                                                  | 29        |
| 2-2-3- Rôle des Polynucléaires Neutrophiles .....                                                                                                                                             | 30        |
| 2-2-4- Rôle des cellules « Natural Killer » .....                                                                                                                                             | 30        |
| 2-2-5- Rôle des Macrophages et Eosinophiles .....                                                                                                                                             | 30        |
| 2-3- Rôle de l'immunité adaptative.....                                                                                                                                                       | 31        |
| 2-3-1- Immunité Th1 .....                                                                                                                                                                     | 31        |
| 2-3-2- Immunité Th17.....                                                                                                                                                                     | 31        |
| 2-3-3- Rôle des cellules régulatrices.....                                                                                                                                                    | 31        |
| 2-3-4- Immunité humorale .....                                                                                                                                                                | 32        |
| 2-4 Les biomarqueurs dans le CLAD .....                                                                                                                                                       | 33        |
| <b>3- Lymphocytes T régulateurs en transplantation pulmonaire .....</b>                                                                                                                       | <b>34</b> |
| 3-1- Identification.....                                                                                                                                                                      | 34        |
| Figure 10 : identification des sous ensemble de Treg humains.....                                                                                                                             | 35        |
| 3-2- Tolérance et effet immunosupresseur.....                                                                                                                                                 | 36        |
| figure 11 : fonctions immunosuppressives des Tregs humains.....                                                                                                                               | 36        |
| 3-3- Treg et CLAD .....                                                                                                                                                                       | 37        |

|                                                                                                                                                                                               |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>4- COhort in Lung Transplantation .....</b>                                                                                                                                                | <b>38</b> |
| 4-1 – protocole COLT .....                                                                                                                                                                    | 38        |
| <i>figure 12 : les différentes visites du protocole COLT.....</i>                                                                                                                             | <i>39</i> |
| 4-2 – Base de données .....                                                                                                                                                                   | 39        |
| <i>figure 13 : schématisation de la méthodologie du protocole COLT.....</i>                                                                                                                   | <i>40</i> |
| <b>II- IMMUNOMONITORING DES LYMPHOCYTES T EN TRANSPLANTATION PULMONAIRE ..</b>                                                                                                                | <b>42</b> |
| <b>1-Introduction .....</b>                                                                                                                                                                   | <b>44</b> |
| <b>2-Material and methods.....</b>                                                                                                                                                            | <b>46</b> |
| <b>3-Results .....</b>                                                                                                                                                                        | <b>48</b> |
| <i>Table 1: demographic characteristics and clinical data.....</i>                                                                                                                            | <i>48</i> |
| <i>Figure 1: Flow cytometric gating strategy.....</i>                                                                                                                                         | <i>49</i> |
| <i>Figure 2 : longitudinal T cell immunomonitoring between 6 stable patients (STA) and 8 patients with Bronchiolitis Obliterans Syndrome (BOS).....</i>                                       | <i>50</i> |
| <i>Figure 4 : relationship between Tregs and BOS.....</i>                                                                                                                                     | <i>52</i> |
| <b>4- Discussion .....</b>                                                                                                                                                                    | <b>53</b> |
| <b>III-DISCUSSION .....</b>                                                                                                                                                                   | <b>56</b> |
| <b>IV- BIBLIOGRAPHIE .....</b>                                                                                                                                                                | <b>60</b> |
| <b>V- ANNEXE: ETUDE DES DONNEES CLINIQUES DE COLT, Résultats des assistances circulatoires per-opératoire en transplantation pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose .....</b> | <b>71</b> |
| <b>PUBLICATIONS ET PRESENTATIONS DURANT LA THESE .....</b>                                                                                                                                    | <b>85</b> |

## Liste des abbréviations

ARN : Acide ribonucléique  
BCR : B cell receptor  
BO : Bronchiolite Oblitérante  
BOS : Bronchiolitis obliterans syndrome  
BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive  
CC16 : Clara cell protein  
CCR/CXCR : Récepteur aux chimiokines  
CD : Cluster de différenciation  
CEB : Cellules Epithéliales Bronchiques  
CMH : Complexe majeur histocompatibilité  
CMV : Cytomégalo virus  
COLT : COhort in lung transplantation  
CPA : Cellule présentatrice d'antigène  
CLAD : Chronique lung allograft dysfunction  
CPT : Capacité pulmonaire totale  
CTGF : connective tissue growth factor  
CTLA-4 : Cytotoxic T Lymphocyte Antigen-4  
CVF : capacité vitale forcée  
DAPI : 4',6'-diamidino-2-phénylindole  
DC : Cellule dendritique  
EGF : epidermal growth factor  
FITC : Fluorescein isothiocyanate  
FGF : fibroblast growth factor  
HGF : Hepatocyte growth factor  
HLA : Human leucocyte antigen  
HTAP : Hypertension artérielle pulmonaire  
ICOS : Inductible Co-Stimulatory molecule  
IFN : Interféron  
Ig : Immunoglobuline  
IGF : Insulin growth factor  
IL : Interleukine

ISHLT : International Society for Heart and Lung Transplantation JAM : Junctional adhesion molecule

LB : Lymphocyte B

LBA : Lavages broncho-alvéolaires

LPS : Lipopolysaccharide

LT : Lymphocyte T

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein 1

MEC : Matrix metalloproteinase

MMF : Mycophenolate mofetil

MMP : Métalloprotéinases matricielles

mTOR : Mammalian target of rapamycin

NK : Natural Killer

NRAD : Neutrophilic reversible allograft dysfunction

PDGF : Platelet growth factor

PRR : Pattern Recognition Receptors

RA : Rejet aigu

RAS : Restrictive allograft syndrome

RGO : Reflux gastro-oesophagien

TCR : T cell receptor

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

TGF : Transforming growth factor

Th : Lymphocyte T helper

TIMP : Tissue inhibitor of metalloproteinase

TLR : Toll like receptors

TME : Transition mésenchymo épithéliale

TNF : Tumor necrosis factor

VEMS : Volume expiratoire maximal expiré par seconde

## Avant propos

Au cours de mon internat de chirurgie cardiaque et thoracique, j'ai réalisé le master 1 de l'université de Nantes « biologie et pathologie du thorax ». Dans le cadre de ce master 1, j'ai réalisé un stage à l'Institut du Thorax UMR1087, sous la direction du professeur Antoine Magnan au sein de l'équipe Avenir « pathologies bronchiques et allergies ». Cette équipe devenue équipe INSERM en 2012 comporte deux axes majeurs de recherche : d'une part, l'étude des mécanismes de l'allergie et de l'asthme sévère, avec le développement d'un modèle murin et de cohortes de patients asthmatiques et/ou allergiques ; d'autre part, l'étude des mécanismes de la dysfonction chronique du greffon pulmonaire, et l'identification de biomarqueurs de cette complication.

Les travaux précédents de l'équipe, menés de façon transversale, ont contribué à la mise en évidence de populations lymphocytaires qui sembleraient jouer un rôle important dans la tolérance du greffon. Dans le but de vérifier ces résultats, une cohorte européenne de transplantés pulmonaires a été mise en place depuis septembre 2009 et est coordonnée par Antoine Magnan. L'objectif de cette cohorte COLT (COhort in Lung Transplantation) de 1000 patients nouvellement transplantés pulmonaires est de rechercher de nouveaux biomarqueurs spécifiques et prédictifs de la dysfonction chronique du greffon (CLAD). Cette cohorte est la seule qui suit les patients de façon longitudinale, sur 5 ans, avec la réalisation de prélèvements sanguins et *in situ* (expectoration induite, lavage broncho-alvéolaire, condensat de l'air exhalé et biopsies trans-bronchiques).

C'est dans cette thématique que s'est effectué mon stage de Master 2 (année de recherche, grâce à une bourse du Fond de Dotation Recherche en Santé Respiratoire). Mon projet de master 2 a consisté à la mise en place d'un modèle expérimental *in vitro*, permettant de tester l'influence des cellules immunitaires allogéniques sur le profil des cellules épithéliales bronchiques (CEB), par l'utilisation de deux lignées cellulaires bronchiques. A partir de ces lignées, j'ai pu établir les conditions expérimentales du modèle et mettre au point les techniques d'investigation nécessaires à son étude. Ce stage a permis le travail de thèse de Mallory Pain qui a donné lieu à un article original dont je suis co-auteur, actuellement en révision pour *American Journal of Transplantation*.

Dans la continuité de ce travail, j'ai poursuivi en thèse, en parallèle de mon clinicat dans le service de chirurgie thoracique et cardio-vasculaire du CHU de Nantes. Mon projet de thèse a porté sur l'identification d'un nouveau biomarqueur du CLAD par l'analyse du profil immunitaire des lymphocytes T grâce à l'utilisation des prélèvements et des données cliniques de la cohorte COLT. L'immunophénotypage des lymphocytes T régulateurs s'est réalisé en collaboration avec Maxim Durand, doctorant de l'équipe du Dr Sophie Brouard (UMR INSERM 1064). J'ai également, au cours de ma thèse au sein du laboratoire, contribué au développement d'un modèle de transplantation pulmonaire orthotopique chez la souris en collaboration avec le Dr Grégory Bouchaud.

Ce manuscrit de thèse est articulé autour d'une introduction générale, suivie de la présentation des résultats sous la forme d'un article, et d'une discussion générale présentant les perspectives. Enfin, l'analyse des données cliniques de COLT m'a permis, entre autres, d'étudier les résultats de l'assistance circulatoire en transplantation pulmonaire, résultats présentés sous la forme d'un article en dernière partie.

L'introduction générale présente le système immunitaire inné et adaptatif avec ses principaux acteurs, ainsi que la réaction immunitaire spécifique du contexte de transplantation. Une seconde partie s'attache plus particulièrement à décrire la dysfonction chronique du greffon pulmonaire. Une troisième partie détaille le rôle des lymphocytes T régulateurs en transplantation pulmonaire, et enfin la quatrième partie décrit la cohorte COLT.

## I- INTRODUCTION

Certains patients ayant une maladie respiratoire au stade d'insuffisance respiratoire peuvent bénéficier d'une transplantation pulmonaire. Les trois principales indications sont la mucoviscidose, la fibrose pulmonaire, et la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO). En 2015, en France, 345 patients recevaient une transplantation pulmonaire, chiffre en constante augmentation depuis 10 ans (184 en 2005, 244 en 2010).

Il peut s'agir de transplantation pulmonaire uni ou bilatérale, à partir de greffons prélevés sur des sujets en mort encéphalique.

L'attribution du greffon se fait en respectant l'identité pour le groupe sanguin ABO (possibilité de dérogation pour une attribution en ABO compatible) et une congruence anatomique (capacité pulmonaire totale (CPT) théorique, taille). La dérogation de groupe sanguin restreinte en groupe A (pour les malades AB) et en groupe O (pour les malades AB, A ou B) doit faire l'objet d'une demande spécifique.

Pour des raisons de logistique, de pénurie de greffon, de pronostic vital du receveur engagé à court terme, il n'est pas possible de respecter :

- l'identité HLA des patients (contrairement à ce qui peut être fait en allogreffe de cellules souches),
- la concordance entre le donneur et le receveur pour le sexe, le statut sérologique CMV ou EBV.

La contrainte immunologique difficilement contournable est l'exclusion de donneurs ayant un «HLA interdit», c'est à dire contre lequel le receveur a développé des anticorps. Cette contrainte est encore plus prégnante en greffe rénale avec une priorisation des greffons en fonction des spécificités anti-HLA et avec des patients hyper-immunisés et immunisés prioritaires.

Afin d'éviter la survenue de rejet aigu du greffon, le receveur reçoit un traitement immunosuppresseur comprenant :

- un traitement d'induction associant de fortes doses de corticostéroïdes et une molécule anticalcineurine (ciclosporine ou FK506), non systématiquement associés à une immunosuppression lymphocytaire déplétive (sérum anti lymphocytaire (Thymoglobulines®), anticorps anti CD52 (Alemtuzumab, Mabcampath ®)) ou non (inhibiteur du récepteur à l'IL2 (Basiliximab, SIMULECT®)) ;

- puis un traitement d'entretien par une association de corticostéroïdes, d' anticalcineurines et d'une molécule antiproliférative inhibitrice du métabolisme des bases puriques (mycophénolate mofétil ou azathioprine).

Les contreparties de ce traitement immunosuppresseur sont principalement :

- infectieuses : avec la survenue plus fréquente d'infections à bactéries pyogènes ou à pathogènes opportunistes notamment à CMV et champignons filamenteux (aspergillus, mucormycose),
- prolifératives : lymphoprolifération généralement induite par l'EBV, survenue de cancer solide (notamment cutané basocellulaire ou spinocellulaire),
- métaboliques : diabète, ostéoporose, néphrotoxicité.

La courbe de survie post greffe est biphasique :

- une phase précoce avec une mortalité importante de l'ordre de 20% dans la première année liée aux complications postopératoires (hémorragie, lâchage de suture, défaillance primaire du greffon), infectieuses précoces bactériennes, virales ou fongiques, la survenue de rejet suraigu, de complications bronchiques (ischémie, sténose) ou d'infections opportunistes.
- une phase tardive avec une mortalité à 5 ans de l'ordre de 50%{Christie:2012ki} due à la dysfonction chronique du greffon (ou CLAD pour «chronic lung allograft dysfunction»), aux infections opportunistes, syndromes lymphoprolifératifs et autres troubles métaboliques. Il a été récemment admis que le CLAD ne se réduisait pas au syndrome de bronchiolite oblitérante (BOS) mais comprenait aussi le « Restrictive Allograft Syndrom » ou RAS. La dénomination « rejet chronique » largement retrouvée dans la littérature tend par ailleurs à être abandonnée à la lumière des connaissances concernant la physiopathologie du CLAD, qui ne se limite pas à des mécanismes immunologiques liés à l'allogénicité.

A gravité de maladie équivalente, la transplantation apporte un gain de survie et de qualité de vie par rapport aux patients non greffés (1). Cependant les résultats sont moins bons que dans les autres transplantations d'organes solides avec une mortalité plus importante, plus de défaillances chroniques du greffon et la nécessité de maintenir une immunosuppression plus importante.

Les enjeux futurs de la recherche en transplantation pulmonaire sont :

- i) la possibilité d'élargir le pool de greffons disponibles, notamment avec le préconditionnement ex vivo des greffons,
- ii) diminuer la survenue de complications bronchiques ischémiques/anastomotiques,
- iii) mieux comprendre la réponse immune dans ce contexte chimérique (pour son rôle de protection anti infectieuse ou dans la tolérance/rejet du greffon),



iv) mieux comprendre et prédire la survenue de défaillance chronique du greffon afin d'en améliorer le traitement (2).

## 1- Immunologie de la transplantation

L'introduction dans un organisme d'une allogreffe (organe ou tissu provenant d'un individu différent appartenant à la même espèce) bouleverse ses équilibres immunologiques préexistants. Le système immunitaire va être stimulé de manière intense et persistante dans un contexte au moins initialement inflammatoire (période post opératoire, ischémie reperfusion) par différents signaux présentés par le greffon. Dans cette situation artificielle et inédite, le receveur va avoir naturellement tendance à rejeter le greffon reconnu comme n'appartenant pas au « soi ». Ce chapitre propose une revue non exhaustive des principaux acteurs et mécanismes mis en jeu dans cette situation.

### 1-1 Molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) ou Human Leukocyte Antigen (HLA) chez l'Homme désigne un ensemble de gènes, pour certains très polymorphes, qui ont une place centrale dans le système immunitaire adaptatif (3). Il doit son nom à sa fonction dans le rejet de greffe, qui a permis son identification. Les molécules dites classiques CMH I et II jouent un rôle clef dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes T. Le polymorphisme de ces molécules permet de définir l'identité immunologique d'un individu. Pour des raisons de commodité, en dehors de la description des différents sous types de molécule, les termes CMH ou HLA seront utilisés indifféremment. Le CMH classique se caractérise par son *polymorphisme génique* (plusieurs centaines d'allèles par molécule), son *polygénisme* (plusieurs allèles chez un même individu), sa *transmission en bloc par haplotype* et son *expression codominante*, permettant une combinaison de HLA quasi unique pour un individu donné.

#### 1-1-1 Génétique

L'ensemble immunogénétique est situé sur le bras court du chromosome 6 et couvre 2000 kb. Il comprend 3 régions :

La région de classe I avec les gènes codant pour :

- les chaînes  $\alpha$  des molécules de classe 1, dites classiques : HLA-A, B, C. Ce sont elles qui joueront un rôle fondamental dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes T CD8+.

- les molécules de classe I dites non classiques : HLA-G, E et F.
- les molécules apparentées aux molécules de classe I : notamment les gènes MIC (« MHC class I chain related ») qui jouent un rôle dans la modulation de la réponse NK surtout et à un moindre degré celle des lymphocytes T  $\alpha\beta$  et  $\gamma\delta$ .

La région de classe II avec :

- les gènes codant pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  des molécules dites classiques de classe II HLA-DR, DQ, et DP, qui présentent les antigènes aux lymphocytes T CD4+ ;
- les gènes codant pour les molécules dites non classiques HLA DM et DO, jouant un rôle dans l'étape de chargement peptidique des molécules classiques de classe II.

La région de classe III avec des gènes codants pour différentes fractions du complément, des cytokines (TNF $\alpha$  et TNF $\beta$ ) et différentes enzymes.

Les gènes dits non classiques ont un polymorphisme beaucoup plus réduit et ne sont pas impliqués directement dans le rejet d'allogreffe. Il ne faut pas les confondre avec les antigènes mineurs d'histocompatibilité, situés hors du CMH mais impliqués dans le rejet d'allogreffe iso-HLA.

### 1-1-2 Diversité épidémiologique

Pour chacun des allèles des HLA dits classiques (HLA-A, B, C, DR, DQ, DP), il existe, au sein d'une population, un polymorphisme important. La fréquence de chacun de ces allèles diffère selon les populations considérées. En novembre 2008, 3304 allèles HLA différents étaient décrits: 2292 pour le HLA-1 et 1012 pour le HLA-2 (<http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>). Leur polymorphisme réside essentiellement dans une zone hypervariable, située entre les zones  $\alpha 1$  et  $\alpha 2$ , au sein de la région acceptant le peptide. La diversité théorique est réduite dans la réalité par la transmission par bloc d'haplotype. Chaque individu hérite de deux haplotypes, chacun venant de l'un de ses parents. En raison de recombinaisons géniques germinales lors de la méiose, l'haplotype transmis n'est pas exactement identique à l'haplotype parental. Potentiellement une cellule peut exprimer à sa surface les 12 allèles de molécules de HLA classiques.

Les molécules de CMH I sont exprimées par tous les types cellulaires (y compris globules rouges et placenta) avec cependant des différences quantitatives. Les cellules exprimant le plus de molécules de CMH I sont les lymphocytes T et B, les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules épithéliales et endothéliales. Leur niveau d'expression (et donc leur densité membranaire) peut être augmenté par l'IFN $\gamma$ .

Les molécules de CMH II sont exprimées à l'état basal par les cellules présentatrices d'antigènes professionnels. Dans les autres populations cellulaires, leur expression peut être induite par l'IFN- $\alpha$ ,  $\beta$  ou  $\gamma$ .

Le rôle premier des molécules classiques de HLA est de présenter à la surface de la cellule un pool de peptides. Les molécules de HLA non chargées de peptides sont très instables et donc très rares à la surface cellulaire. Ce pool de peptides est constitué à partir de la dégradation de protéines endogènes ou exogènes (pathogènes). Une cellule peut exprimer à sa surface de l'ordre de  $10^4$  à  $10^5$  molécules de HLA présentant en situation basale (sans infection, ni mutation tumorale) des peptides endogènes issus du processus normal de turn-over protéique. Il est maintenant établi qu'une part importante de ces peptides provient de synthèses protéiques incomplètes ou erronées (« DRiPs » ou « defective ribosomal product ») et pas seulement de protéines normales (4).

## 1-2 Présentation d'antigène

### Apprêtement de l'antigène

Les lymphocytes T naïfs circulent dans les différents organes lymphoïdes secondaires (ganglions, tissus lymphoïdes associés aux muqueuses) où ils vont pouvoir rencontrer des cellules présentatrices d'antigènes (CPA), principalement les cellules dendritiques (DC). Les CPA détectent et apprêtent les antigènes au niveau d'un tissu. Ils migrent ensuite dans l'organe lymphoïde secondaire drainant le tissu où ils vont présenter l'antigène aux lymphocytes.

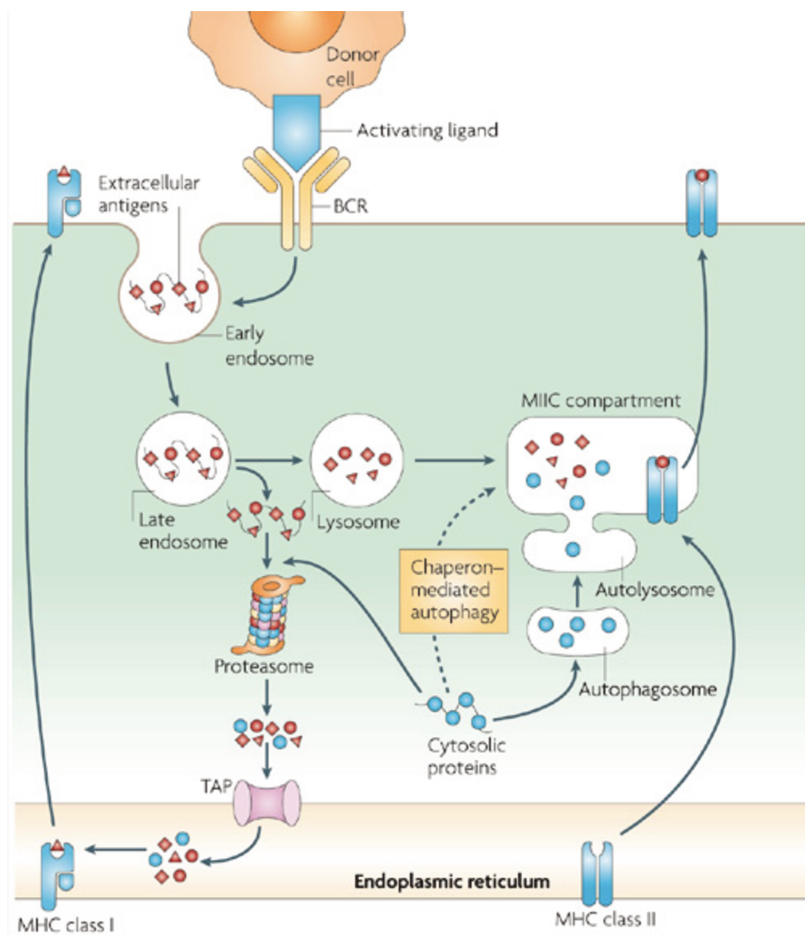
Classiquement on décrit deux voies d'apprêtement selon le type d'antigène :

- la voie exogène : les antigènes sont capturés par phagocytose ou endocytose (pathogènes extra cellulaires, produits de dégradation de cellules endommagées/tumorales), puis dégradés et finalement présentés sous forme de différents peptides de 8 à 17 acides aminés par une molécule du CMH II.
- la voie endogène : les antigènes sont produits à partir de molécules cytoplasmiques (particules virales, protéines de pathogènes intracellulaires, protéines cellulaires normales ou pathologiques), dégradées par le protéasome en oligopeptides qui seront transférés dans le réticulum endoplasmique et finalement présentés sous la forme de peptides de 8-10 acides aminés par des molécules de CMH I.

Il est maintenant bien établi qu'il existe une présentation croisée (**figure 1**):

- de peptides issus de molécules extracellulaires sur des molécules de CMH I via le transfert d'oligopeptides du compartiment endosomal vers le cytosol (5);
- de peptides issus de molécules intracellulaires cytosoliques sur des molécules CMH II via notamment le mécanisme d'autophagie.

Enfin le mécanisme de « cross dressing » a été récemment décrit dans le cadre de présentation d'antigènes viraux : des fragments de membranes de cellules infectées comprenant des molécules de CMH chargées en peptides antigéniques viraux sont transférées à la membrane plasmique des CPA. Ce type de présentation croisée a également été décrit en transplantation et correspond à une troisième voie de présentation antigénique dite « semi-directe » (6).



**Figure 1 : Dialogue entre les voies de présentation d'antigène des molécules de CMH de type I et II (d'après « Specificity of T-cell alloreactivity » par Nathan J. Felix and Paul M. Allen, *Nature review immunology*)**

Initialement considérées comme n'ayant aucune interaction, il est maintenant établi qu'il existe un « crosstalk » entre les voies de présentation peptidique des molécules CMH I et CMH II. Les molécules de CMH de classe I peuvent présenter des peptides d'origine extra-cellulaire par différents mécanismes, notamment le passage d'antigènes phagocytés du compartiment endocytaire au compartiment cytoplasmique.

Les molécules de CMH II peuvent présenter des antigènes cytosoliques via le processus d'autophagie. Ainsi les deux voies de présentation sont capables de présenter des peptides d'origine intra ou extra cellulaire.

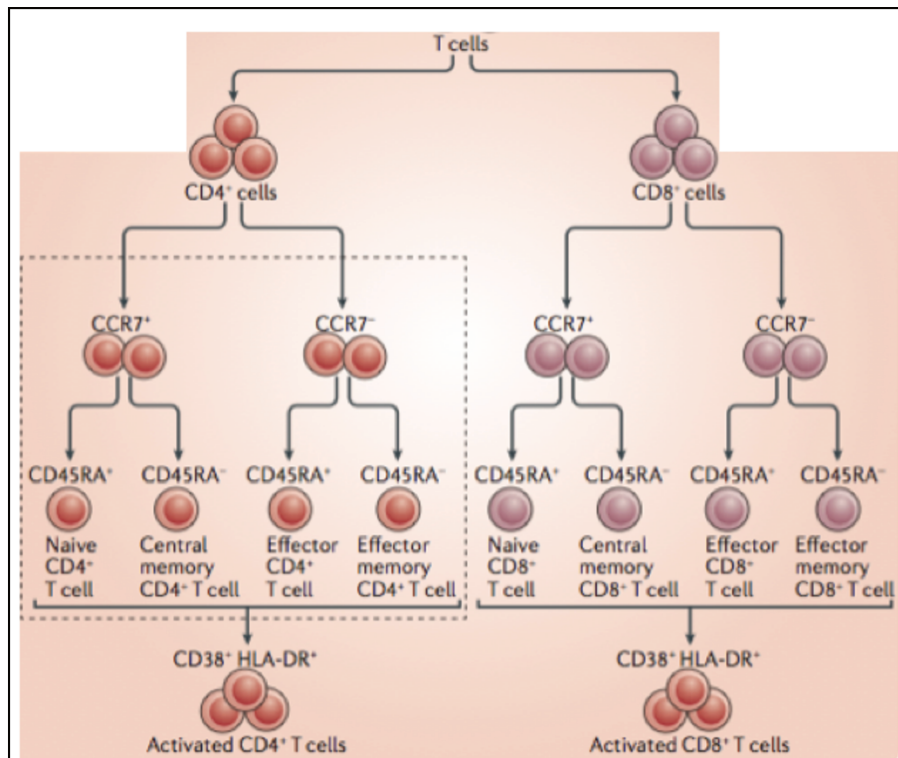
## 1-3 Réponse lymphocytaire T

### 1-3-1 Lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes T CD4+ jouent un rôle d'orientation et d'amplification de la réponse adaptative. Après une stimulation antigénique par les CPA, les lymphocytes T CD4+ (dits « helper » ou «auxiliaires») naïfs vont devenir effecteurs, capables de reconnaître de nouveau l'antigène et de produire des cytokines qui orienteront et amplifieront la réponse adaptative (7). Après une stimulation initiale et une phase d'amplification de la réponse, lorsque le stimulus initial disparaît/diminue, la réponse spécifique diminue également mais persiste (phase de «contraction»). Lors d'une seconde stimulation (réintroduction de l'antigène ou augmentation d'une stimulation persistante), cette population lymphocytaire mémoire spécifique sera mobilisable plus rapidement (8).

Il est possible de distinguer plusieurs sous populations de lymphocytes T CD4 + selon leur degré de différenciation (9, 10) (**figure 2**) :

- Naïves (N) :  $CD45RA^{+}/CCR7^{+}/CD27^{+}/CD28^{+}$
- Central mémoire (CM) :  $CD45RO^{+}/CCR7^{+}/CD27^{+}/CD28^{+}$
- Effectrices mémoires (EM):  $CD45RO^{+}/CCR7^{-}/CD27^{+/-}/CD28^{+}$
- Différenciation tardive (DT) ou effectrices ou T:  $CD45RA^{+}/CCR7^{-}/CD27^{-}/CD28^{-}$



**Figure 2 : stratégie d'immunophénotypage des lymphocytes T d'après Maecker Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* (11)** les différentes populations de lymphocytes T CD4+ et CD8+ peuvent être identifiées en fonction de l'expression à leur surface de différentes molécules détectables en cytométrie de flux. Le tri successif selon l'expression de CD4 ou de CD8 puis de CCR7, puis de CD45RA permet de quantifier les proportions respectives des 8 sous-populations ainsi déterminées.

Selon le type de stimulus initial, sa persistance ou disparition, la population lymphocytaire T CD4+ spécifique d'un antigène sera principalement CM ou EM ou DT.

On peut également distinguer des sous populations lymphocytaires T CD4+ selon le type de cytokines sécrétées :

- Population « TH1 » (T helper type 1). Elle présente comme marqueurs phénotypiques IL12R, IFN $\gamma$ R, et CXCR3. Elle est induite par IL12, se différencie sous le contrôle des facteurs de transcription T-bet (surtout), STAT4 et STAT1, et produit de l'IL2, IFN $\gamma$  et TNF $\alpha$ . Elle oriente vers une réponse cellulaire cytotoxique médiée par les lymphocytes CD8+, et une activation de la lyse intramacrophagique (par induction d'iNOS) de pathogènes intracellulaires (classiquement *Leishmania major*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium spp*).

- Population « TH2 » (T helper type 2). Elle présente comme marqueurs phénotypiques IL4R, IL33R, CCR4, IL17RB, CRTH2. Elle est induite par IL4, IL25, IL33 et IL15, se différencie sous le contrôle des facteurs de transcription GATA3 surtout, mais aussi STAT6, DEC2 et MAF, et produit surtout de l'IL4, IL5, IL13, IL10. Elle oriente vers i) une réponse adaptative humorale, permettant l'éradication de pathogènes extracellulaires pouvant également s'intégrer dans ii) une réponse allergique et participer au recrutement de polynucléaires éosinophiles.

- Population « TH17 » (T helper type 17). Elle présente comme marqueurs phénotypiques IL23R, CCR6, IL1R, CD161, est induite par IL23, IL21, TGF $\beta$ , IL1- $\beta$ , IL6, et se différencie sous le contrôle des facteurs de transcription STAT3, ROR $\alpha$  et ROR $\gamma$ . Elle oriente, par la production d' IL17A, IL17F, IL21, IL22, CCL20, vers une réponse inflammatoire avec recrutement de polynucléaires neutrophiles, impliquée dans l'immunité protectrice contre des bactéries pyogènes extracellulaires, certains champignons pathogènes, et différentes maladies inflammatoires et auto-immunes (12, 13).

- Population « Treg » (lymphocytes T régulateurs). Cette population sera étudiée plus en détail au chapitre « tolérance ». Elle présente comme marqueur phénotypique l'expression élevée de CD25 (IL2-R) et de FoxP3. Elle est induite par IL10 et TGF $\beta$ . Elle oriente la réponse immunitaire vers une tolérance périphérique par la production de TGF $\beta$ , d'IL10 et l'induction d'apoptose.

- Population TH9. Cette population proinflammatoire est induite par une stimulation cytokinique par TGF $\beta$  (via le facteur de transcription PU.1), IL4 (via GATA-3 et IRF-4) et IL1/IL25. Sa production d'IL9 est associée à la physiopathologie de l'asthme et de pathologies auto-immunes (14).

- Population "FTH" (Follicular T helper). Cette population présente dans les organes lymphoïdes secondaires dans les centres germinatifs (sur le site de rencontre CPA et LB) est caractérisée par l'expression du marqueur phénotypique CXCR5. Elle est induite par IL6, IL21 et/ou IL27 et IL12, via l'activation de STAT3, 4, 1 et les facteurs de transcription BCL6, IRF4, MAF et BATF. Elle oriente la réponse lymphocytaire B (activation et différenciation), la production d'anticorps, la permutation de classe d'anticorps, et la maturation d'affinité par mutation somatique (15).

### 1-3-2 Lymphocytes T CD8+

Les lymphocytes T CD8+ sont la « main armée » de l'immunité adaptative cellulaire. Ils sont stimulés par des peptides présentés par une molécule du CMH I. Une cellule T CD8+ naïve est initiée à un antigène par une CPA. Lors de la seconde rencontre antigénique (présentation peptide-CMH I par une cellule pathologique) le lymphocyte T CD8+ pourra selon son degré de différenciation soit produire des cytokines soit avoir une activité cytolytique. La réponse (prolifération, différenciation, fonction) peut être amplifiée par une réponse T CD4+ TH1 concomitante et colocalisée.

Il est possible de distinguer différentes sous populations de lymphocytes T CD8+ en fonction de leur degré de différenciation (16-18) **figure 2**:

Naïves (N) :  $CD45RA^+ / CCR7^+ / CD27^+ / CD28^+$

Central mémoire (CM) :  $CD45RO^+ / CCR7^+ / CD27^+ / CD28^-$

Effectrices mémoires (EM) :  $CD45RO^+ / CCR7^- / CD27^+ / CD28^{+/-}$

Différenciation tardive (DT) ou effectrices ou T:  $CD45RA^+ / CCR7^- / CD27^- / CD28^-$

Selon le type de stimulus initial et sa chronologie (exposition unique, intermittente, répétée, limitée dans le temps ou persistante), la population T CD8+ spécifique d'un antigène sera principalement CM ou EM ou DT. Selon son degré de différenciation la population CD8+ aura comme fonction la production de cytokines pro TH1 (IL2,  $IFN\gamma$ ,  $TNF\alpha$ ) ou la cytolyse (production de granzyme, perforine) (19, 20). Plus récemment, une nouvelle sous population T CD8+ aux propriétés régulatrices a été décrite. Caractérisées phénotypiquement par l'expression de CD25+ et de FoxP3+, ces cellules ont une action dépendant principalement du contact entre les cellules (21).



## 1-4 Principe de l'alloréactivité lymphocytaire T

L'immunité peut se définir comme l'ensemble des mécanismes qui permettent à un organisme à la fois de reconnaître le soi et le tolérer et de reconnaître le non soi et le rejeter. Les dysfonctionnements possibles de ce système sont soit de reconnaître *le* soi comme non soi avec le risque de générer de l'auto-immunité, soit de ne pas reconnaître le non soi au risque de laisser se développer une maladie infectieuse, néoplasique ou allergique.

On peut définir le soi comme ce qui est accepté par le système immunitaire. Cette définition suppose un ensemble de signaux cellulaires qui font qu'une cellule est acceptée par le système immunitaire d'un organisme.

On peut considérer différents «non soi», i) le non soi exogène provenant de pathogènes, d'allogreffe ou de xénogreffe, ii) le non soi endogène avec des autoantigènes modifiés (néo-autoantigènes) par exemple pour les cellules cancéreuses, infectées par un virus, sénescents iii) les situations de « soi manquant » avec un défaut d'expression de certaines molécules inhibant la destruction de la cellule.

### 1-4-1 Reconnaissance du soi et du non soi

#### ***Le soi manquant ou identité d'espèce***

Trois mécanismes mènent à l'élimination des cellules :

- Le défaut d'expression de molécules HLA induit un défaut d'inhibition de la cytotoxicité de cellules NK amenant à la destruction de la cellule cible.
- Le défaut d'inhibition du système du complément : la fraction C3 du complément se dépose à la surface de toutes les cellules d'un organisme. Alors que les cellules autologues ou orthologues (même espèce) inhibent la C3-convertase par l'expression membranaire de molécules comme CD46 ou CD55, les cellules hétérologues n'ont pas ce système d'inhibition de la C3 convertase ce qui aboutit à leur lyse cellulaire et/ou leur phagocytose par activation du complément.
- Le défaut d'expression d'acide sialique : l'acide sialique est un hydrocarbure pouvant s'intégrer à des glycolipides et des glycopeptides membranaires. Les molécules SIGLELS exprimées par les cellules dendritiques, macrophages ou polynucléaires neutrophiles, reconnaissent les molécules comprenant de l'acide sialique. Les cellules (cellules infectées, cancéreuses, sénescents) n'exprimant pas d'acide sialique sont interprétées comme «pathogènes» et phagocytées. Le CD22 est une molécule analogue du SIGLELS exprimée par les lymphocytes B (LB), qui permet d'inhiber l'activation de LB autoréactifs.

### ***Identité individuelle-le système d'alloantigène***

L'histocompatibilité est une notion introduite par Snell et Gorer en 1930, qui propose l'existence de molécules provoquant un rejet de greffe par un organisme receveur de même espèce génétiquement distinct (allogreffe). Différents systèmes antigéniques participent à l'identité d'un individu : le système ABO-Rhésus, les antigènes majeurs d'histocompatibilité (CMH ou HLA) et les antigènes mineurs d'histocompatibilité (liés au polymorphisme protéique associé en partie au chromosome Y). La contrainte ABO-rhésus étant toujours respectée (identité ou compatibilité donneur receveur) elle ne participe pas en pratique à l'alloréactivité.

Dans le cadre des transplantations d'organe solide, il existe le plus souvent au moins une incompatibilité HLA qui génère une réponse alloimmune intense, témoignant du fort pouvoir immunogène des molécules du CMH. L'allogreffe iso-HLA génère une réponse alloimmune de moindre intensité mais réelle (GVH chez les patients allogreffés de cellules souche HLA compatible).

### ***Comment une cellule allogénique est-elle reconnue comme telle ?***

Les cellules d'un même organisme ont en commun un pool de molécules membranaires uniques qui définissent son unicité. Une cellule présente à sa surface deux molécules de chacune des séries alléliques de chaque classe du CMH, soit 12 allèles différents pour les molécules de classes I et II. Etant donné le polymorphisme important du CMH il est très peu probable que deux sujets (non jumeaux) présentent la même combinaison de molécules du CMH.

Chaque molécule va présenter à la surface un pool de peptides endogènes dépendant :

- de l'affinité de la molécule de CMH et du peptide,
- du fond génétique (polymorphisme protéique et pool peptidique issu du renouvellement des protéines domestiques),
- de la modification du turn-over des peptides domestiques présentés par une cellule selon qu'elle est dans son état basal ou en situation pathologique («stress», carcinogénèse, infection, etc...).

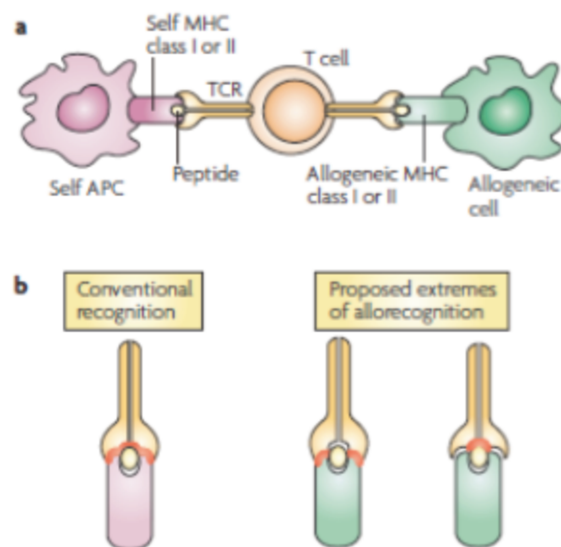
C'est la diversité des complexes CMH-peptides présentés à la surface cellulaire qui va définir l'identité d'un sujet. Dans un contexte d'allogreffe isoHLA, les alloantigènes sont des antigènes mineurs liés au polymorphisme des protéines endogènes, ou à l'incompatibilité sur le sexe (antigènes liés à la présence du chromosome Y).

En face de cette cible potentielle, le répertoire lymphocytaire T du receveur : la double sélection thymique a permis de supprimer les cellules T ne reconnaissant pas les CMH du soi et étant trop autoréactives. Mais elle n'a pas «cherché à empêcher» la génération de T-Cell Receptor (TCR) capables de reconnaître des complexes CMH-peptides allogéniques (situation artificielle à

laquelle l'organisme n'est à priori pas préparé). Ainsi le pourcentage de lymphocytes T alloréactifs avant toute stimulation alloimmune est de l'ordre de 10-30% (6). Il peut s'agir de populations lymphocytaires ayant une autre vocation (lymphocytes spécifiques du CMV ayant une réactivité croisée avec une molécule de CMH allogénique) ou de lymphocytes naïfs n'ayant pas encore rencontré d'antigène spécifique dans le contexte CMH autologue (22).

Formellement, on peut considérer trois cas de figures selon que l'immunogénicité sera liée principalement (23, 24) :

- à la molécule CMH et peu au peptide (interaction dégénérée avec le peptide soulignant la possibilité pour un TCR de reconnaître un nombre limité de complexes peptide-CMH allogéniques ou du soi (polyspécificité)),
- au peptide et peu à la molécule CMH (interaction hautement spécifique du peptide, notamment quand les deux molécules de CMH sont similaires)
- au complexe CMH-peptide (**figure 3**).



**Figure 3 : Reconnaissance par les lymphocytes T de complexes CMH-peptide conventionnel et allogénique (d'après « Specificity of T-cell alloreactivity » par Nathan J. Felix and Paul M. Allen, *Nature review immunology*).**

a) Plusieurs TCR peuvent reconnaître à la fois des complexes peptide-CMH du soi et peptide-CMH allogénique, bien que ces TCR n'aient pas rencontré d'alloantigène pendant leur développement thymique.  
b) La reconnaissance conventionnelle par le TCR du complexe peptide-CMH se fait à la fois par contact avec le peptide et la molécule de CMH. L'alloreconnaissance peut se faire selon plusieurs modalités non exclusives en privilégiant la reconnaissance du peptide ou de la molécule ou, de manière analogue à la reconnaissance conventionnelle, avec une interaction avec le complexe peptide-CMH allogénique.

Dans tout les cas, cette interaction CMH-peptide est déterminée par le polymorphisme CMH. Il touche le site de fixation du peptide et induit une différence de configuration spatiale entre deux complexes peptide-CMH (CMH du soi et CMH allogénique par exemple) présentant un même peptide. Cette différence est graduelle allant de la modulation à l'extinction du signal d'activation du TCR. Il touche également les zones de contact TCR-CMH et peut ainsi moduler l'interaction TCR et CMH. Ainsi un TCR modérément afin pour une molécule CMH du soi peut l'être beaucoup plus pour une molécule CMH allogénique.

Si la sélection thymique encadre l'affinité des TCR pour les molécules du CMH du soi, elle n'a évidemment pas anticipé celle pour les molécules CMH du greffon, qui peut avoir une amplitude de variabilité plus importante.

Enfin l'état d'activation de la cellule présentant l'alloantigène conditionnera l'orientation de la réponse immune spécifique.

*In vivo*, on distingue trois formes d'initiation des lymphocytes alloréactifs (**figure 4**):

- **Initiation directe**: peptide du donneur présenté par une CPA du donneur avec une molécule CMH allogénique.

- **Initiation indirecte** : peptide du donneur présenté par une CPA du receveur avec une molécule CMH du soi. Dans ce cas la source peptidique inclut des fragments cellulaires ou membranaires de cellules du greffon, capturés par endocytose ou phagocytose de cellules mourantes.

Il est classiquement admis que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> allostimulés auront une orientation principalement TH1 (25) et vont donc contribuer et amplifier la réponse T CD8<sup>+</sup>. Ces derniers seront ensuite capables de reconnaître l'antigène présenté par le CMH allogénique et de détruire la cellule allogénique.

Ces deux modalités de reconnaissance classiques respectent un des aspects de la restriction CMH: les peptides présentés par des molécules soit de CMH I soit de CMH II sont reconnus soit par des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> soit par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>.

- **Initiation semi-directe** : où des cellules dendritiques (DC) du receveur vont présenter à leur membrane des fragments membranaires de cellules du greffon contenant des molécules de CMH du donneur. Enfin, la présentation d'antigènes peut se faire par des cellules présentatrices non professionnelles, notamment par les cellules endothéliales (26) ou épithéliales.

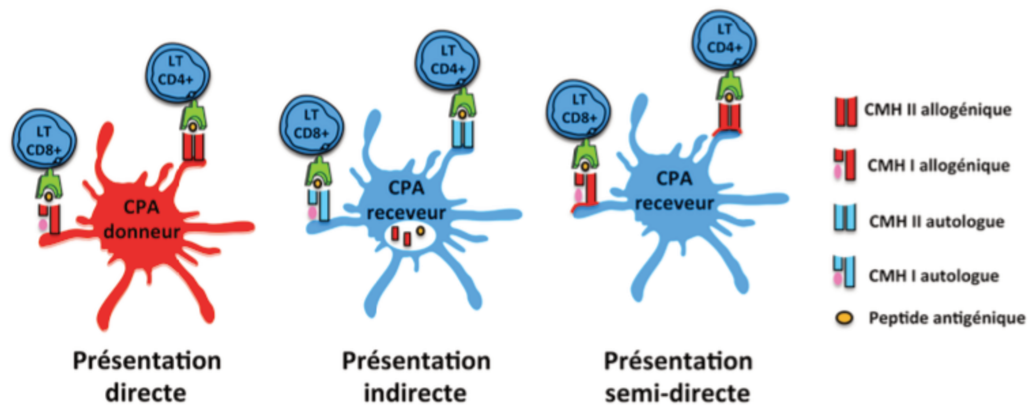


Figure 4 : les différentes voies de la présentation allogénique  
d'après Herrera et al. (27)

#### 1-4-2 Tolérance

Cliniquement la tolérance se définit comme l'acceptation d'allogreffe sans immunosuppresseur. Immunologiquement cela correspond à l'absence de réponse immune contre un antigène. Cette absence de réponse peut s'expliquer par différents mécanismes :

- l'action des **lymphocytes T régulateurs** (Treg) qui contre-balancent la réponse effectrice *in situ*. Elle dépend du ratio Treg/T effecteur et de la fonctionnalité de chacune de ces deux sous populations.
- l'**ignorance (anergie)** : absence de réponse effectrice pouvant être liée à i) une présentation d'antigène sans cosignal (par DC immature/non activée ou tolérogène) ou ii) à une stimulation antigénique trop importante.
- la **sanctuarisation** ou absence de présentation de l'antigène : soit par dissimulation (stratégie d'échappement du CMV) soit par absence de recrutement des cellules spécifiques sur le site cible (tolérance induite par l'inhibition CXCR3, dans des modèles de transplantation pulmonaire)(28)

Les Treg sont des acteurs importants de la tolérance. On distingue **les lymphocytes T CD4+ régulateurs centraux** (ou naturels) formés tôt dans le thymus dont la spécificité est principalement orientée vers des autoantigènes, et **des lymphocytes T CD4+ régulateurs périphériques**, formés après une exposition antigénique conditionnée par le microenvironnement cytokinique. Leur spécificité antigénique n'est pas réduite aux auto-antigènes. Pour cette population il est possible que le statut «régulateur» ne soit pas stable dans le temps.

Le rôle des Treg dans des maladies autoimmunes ou inflammatoires digestives a été mis en évidence dans différents modèles animaux avec déplétion en Treg. Leur phénotype est

caractérisé par une expression membranaire importante de CD25 et du facteur de transcription FoxP3. La différenciation à partir de cellules T CD4<sup>+</sup> naïves est orientée par la production (notamment par les CPA) d'IL2 et TGF  $\beta$  et l'absence (absolue ou relative) de cytokines orientant vers d'autres fonctions (absence d'IL12, IL17, IL6, IL4, etc...). Le facteur de transcription FoxP3 permet la régulation positive de CD25 et CTLA4 et négative de cytokines proTH1.

Les mécanismes d'action des Treg sont multiples :

- production cytokinique paracrine de TGF  $\beta$  et IL10 inhibant les lymphocytes effecteurs,
- inhibition de la fonction effectrice par interaction métabolique (production d'adénosine, de catabolites du tryptophane, d'augmentation de l'AMPcyclique intracellulaire par transfert intercellulaire),
- interaction cellulaire directe inhibitrice de la maturation/activation des CPA (CTLA4-B7),
- interaction déplétante avec la population T effectrice par cytolysse et la production de Perforine-Granzyme,
- compétition entre les Treg/lymphocytes T effecteurs *in situ*, pour l'accès à la cible et l'utilisation des cytokines.

Il a également été mis en évidence une population de lymphocyte T CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup> qui aurait des propriétés régulatrices similaires.

## **2- Dysfonction chronique du greffon (CLAD)**

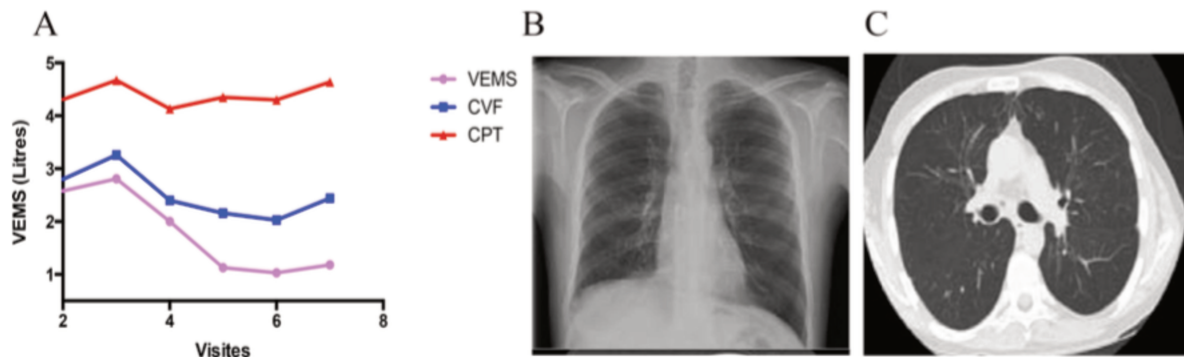
En transplantation pulmonaire, l'évolution des techniques chirurgicales et les progrès concernant le management péri-opératoire ont permis d'améliorer sensiblement la survie à court terme. Cependant la survie à long terme reste décevante avec une survie à 10 ans autour de 27%, ce qui fait de la transplantation pulmonaire l'intervention avec la moins bonne survie à long terme, comparée aux autres transplantations d'organe solide comme le rein (58%), le foie (70%), le cœur (56%), le pancréas (77%), ou l'intestin (44%) (29). Or la dysfonction chronique du greffon ou CLAD affecte 50% des patients à 5 ans. Depuis longtemps, le syndrome de bronchiolite oblitérante (BOS, Bronchiolitis obliterans Syndrome) était considéré comme la seule manifestation de la dysfonction chronique du greffon (30). Cependant, depuis 2011, une nouvelle entité nosologique est caractérisée, appelée le Restrictive Allograft Syndrome (RAS). Dans l'article princeps de Sato, la probabilité de développer un CLAD à 5 ans est de 50%, 35% avec un phénotype BOS, 15% avec un phénotype RAS.

### **2-1- Manifestations cliniques et fonctionnelles**

#### **2-1-1 le syndrome de bronchiolite oblitérante**

Le syndrome ventilatoire obstructif survient plusieurs années après la transplantation et est la conséquence de l'oblitération des petites voies aériennes ou BOS. La bronchiolite oblitérante fut décrite pour la première fois en 1984 (université de Stanford) chez un patient transplanté cœur-poumon qui avait une diminution progressive du volume maximal expiré en une seconde (VEMS). La biopsie transbronchique a révélé un dépôt fibromyxoïde intraluminal et un infiltrat d'eosinophiles dans la sous-muqueuse bronchique. Ces lésions anatomiques contribuent à l'apparition du BOS qui se définit par une obstruction progressive des voies aériennes associée à une détérioration de la fonction respiratoire. Il existe également une atteinte vasculaire, qui est la forme la moins fréquente et la moins morbide, caractérisée par une athérosclérose de la vascularisation pulmonaire (31).

Le BOS aboutit à la perte du greffon, à une insuffisance respiratoire terminale et à terme à une indication de re-transplantation (32). Si certains facteurs de risques sont suspectés ou confirmés, les mécanismes du BOS sont encore mal connus. Il n'existe aucun marqueur précoce prouvé qui en permettrait un diagnostic et une prise en charge précoce.



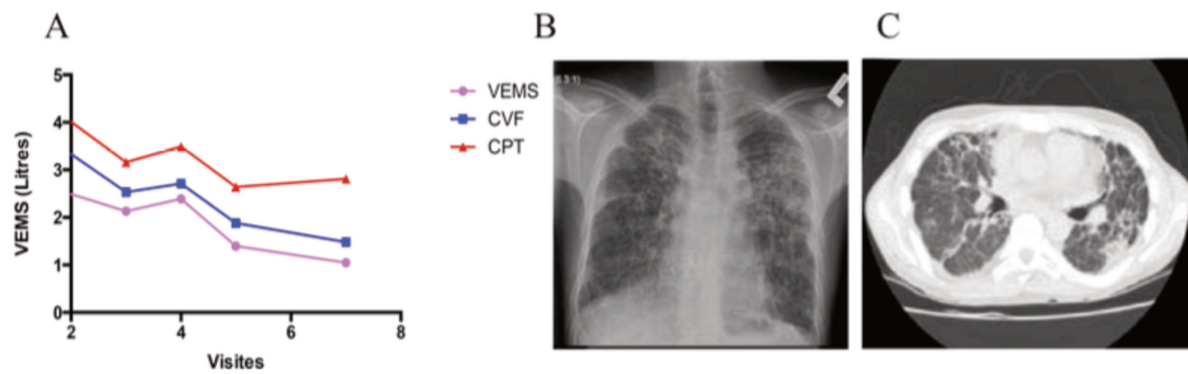
**Figure 5 : Mesure de volumes pulmonaires et radiographie de patients atteints de bronchiolite oblitérante.**

(A) Mesures du VEMS, de la capacité vitale forcée (CVF) et de la capacité pulmonaire totale (CPT) chez un patient atteint de BOS. On observe la diminution rapide et franche du VEMS avec une stabilité de la CPT caractéristiques (B) Radiographie pulmonaire (diminution des vaisseaux en périphérie) et (C) Scanner thoracique d'un patient atteint de BOS (piégeage expiratoire). D'après M. Sato, *JHLT* 2011, Vol13 issue 7, pages 735-742.

### 2-1-2- Le syndrome allogénique restrictif

De récentes publications ont identifié un syndrome restrictif, appelé RAS (Restrictive allograft syndrome) qui correspond à un autre groupe de dysfonction chronique du greffon (30). Du à un processus fibrosant intra-parenchymateux, il se traduit par une diminution des volumes expirés maximaux et une diminution de la capacité pulmonaire totale (CPT) (Figure 6). Le diagnostic est établi par l'existence d'un syndrome restrictif associé à des lésions parenchymateuses se traduisant par un syndrome interstitiel radiologique (Figure 6). Ce syndrome restrictif semblerait corrélé avec l'inflammation et le processus fibrotique, pouvant à terme contribuer à la dysfonction chronique du greffon. Le diagnostic d'un RAS chez un patient est associé à un plus mauvais pronostic.



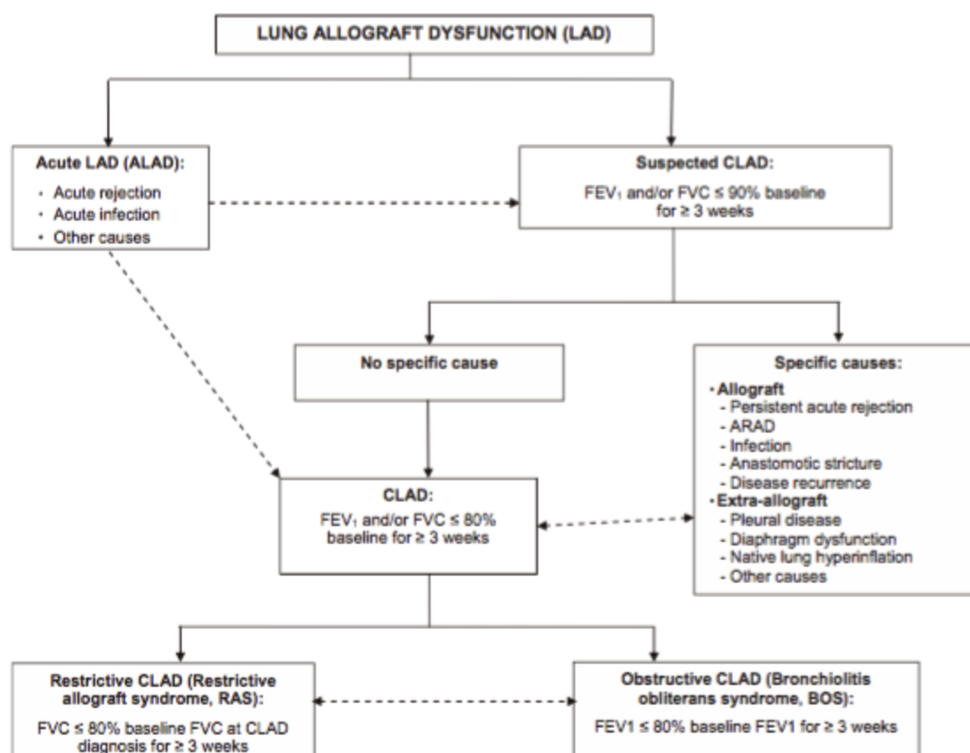


**Figure 6 : Mesures de volumes pulmonaires et radiographie d'un patient atteint d'un RAS.**

(A) Mesures du VEMS, de la CVF et de la CPT chez un patient atteint de RAS. On observe la diminution de tous les volumes pulmonaires y compris la CPT (B) Radiographie pulmonaire et (C) Scanner thoracique d'un patient atteint de RAS. On observe les opacités parenchymateuses bilatérales diffuses et non systématisées, alvéolaires et interstitielles caractéristiques dans le contexte de transplantation pulmonaire. D'après M. Sato, *JHLT* 2011, Vol13 issue 7, pages 735-742.

### 2-1-3- arbre décisionnel de diagnostic clinique du CLAD

Dans le contexte de définition récente du CLAD, Verleden *et al* proposent une définition et un algorithme clinique (**Figure 7**) de diagnostic du CLAD afin de faciliter les démarches diagnostiques permettant d'éliminer les nombreux diagnostics différentiels correspondant à des causes spécifiques de dysfonction du greffon (33).



**Figure 7 : Algorithme clinique devant une dysfonction du greffon pulmonaire d'après Verleden A new classification system for chronic lung allograft dysfunction. J Heart Lung Transplant**  
 forced expiratory volume in 1 second (FEV) ; forced vital capacity (FVC) ; acute lung allograft dysfunction (ALAD) ; chronic lung allograft dysfunction (CLAD) ; bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) ; azithromycin-responsive allograft dysfunction (ARAD) ; restrictive allograft syndrome (RAS).

## 2-2- Rôle de l'immunité innée

### 2-2-1- Reconnaissance des molécules exogènes et endogènes

Les poumons sont continuellement exposés à l'environnement. L'immunité innée est donc continuellement stimulée par des pathogènes, allergènes et polluants. Le système immunitaire inné reconnaît les « pathogen associated molecular patterns » (PAMPs) par l'expression d'un large éventail de « pathogen recognition receptors » (PRRs). Parmi eux, les « Toll Like Receptors » (TLR), représentent une famille de 13 membres exprimés par les cellules hématopoïétiques ou parenchymateuses impliqués dans la reconnaissance des pathogènes (34). TLR2, TLR4 et TLR9, impliqués dans la reconnaissance bactérienne ou virale, seraient susceptibles de participer au développement du CLAD (35, 36).

Les infections bactériennes, virales ou fongiques sont connues comme un facteur de risque de rejet chronique dans le développement du CLAD (37-39). La colonisation Aspergillaire

est un facteur de risque de BOS (40), tout comme la colonisation de novo de *Pseudomonas aeruginosa* (41).

Outre les pathogènes, les TLR peuvent être les cibles d'endotoxines présentes dans le liquide gastrique des patients transplantés pulmonaires présentant un reflux gastro-oesophagien (RGO).

Aussi, les polluants sont connus comme des activateurs de l'immunité innée (42), et des travaux récents mettent en évidence une relation entre la pollution liée au trafic et le risque de développer un CLAD (43).

La durée d'ischémie froide du greffon et l'ischémie reperfusion sont connus comme déterminants pour la survie à long terme après une transplantation pulmonaire (44).

Les molécules exogènes et endogènes activent l'inflammation et libèrent des cytokines et des chimiokines activant l'immunité innée.

### 2-2-2- Activation des cellules épithéliales bronchiques

L'épithélium bronchique est la première ligne de défense contre les pathogènes, particules, polluants ou allergènes. Les cellules épithéliales bronchiques (CEB) expriment un large éventail de TLR (45), **ou** autres PRR tels que les NOD-Like Receptor (NLR), ou RIG-I-Like Receptor (RLR) (46), et elles sont en première ligne en cas d'agression. Leur impact majeur dans l'immunité pulmonaire (47) est ainsi clairement établi. Dans le contexte de la transplantation, les CEB peuvent sécréter des cytokines pro-inflammatoires, chémokines et facteurs de croissance par des stimuli allo-dépendants et allo-indépendants (48).

Parmi ces molécules :

- Il-8 : associée à l'infiltration alvéolaire des neutrophiles dans le poumon transplanté (49)
- Il-1 alpha : produite après une infection à *Pseudomonas aeruginosa*, responsable de l'activation fibroblastique (50)
- CCL-2 : chemoattractant des monocytes, dont l'expression est augmentée chez les patients développant un CLAD.
- CXCL9- CXCL10 : chemoattractants les monocytes, produits au cours du rejet aigu et ayant un effet inflammatoire sur le greffon (51)

### 2-2-3- Rôle des Polynucléaires Neutrophiles

Plusieurs études rapportent un taux élevé de neutrophiles dans les lavages broncho-alvéolaires (52), expectorations (53) et biopsies pulmonaires (54), de patients transplantés développant un CLAD. L'Il-8 est le médiateur permettant le recrutement et l'activation des neutrophiles après la transplantation pulmonaire. Or l'Il-8 peut être sur-exprimée en cas de RGO, d'infections, ou lors de l'exposition aux polluants. La persistance locale des neutrophiles et de leurs produits de sécrétion induisent des dommages épithéliaux, précédant la formation de cicatrices caractéristiques du CLAD, faisant de l'infiltration alvéolaire par des neutrophiles un biomarqueur prédictif du CLAD (55).

Les neutrophiles sont ainsi historiquement associés au développement du CLAD. Cependant l'usage d'azithromycine, un antibiotique macrolide ayant des propriétés anti-inflammatoires notamment en cas d'inflammation à neutrophiles a modifié la nosologie de la dysfonction chronique en améliorant la fonction respiratoire de certains patients présentant une altération des volumes expirés maximaux (56), et amenant ainsi la définition d'un nouveau phénotype de dysfonction pulmonaire appelé « azithromycin responsive allograft dysfunction » (ARAD) ou « neutrophilic reversible allograft dysfunction » (NRAD), qui se distingue du CLAD (**Figure 7**).

### 2-2-4- Rôle des cellules « Natural Killer »

Les cellules NK sont associées au rejet aigu et au CLAD en transplantation pulmonaire (57). L'activation des cellules NK peut être dépendante des anticorps (58) via les récepteurs membranaires CD16, CD32 et CD56, mais aussi indépendante des anticorps via le récepteur de chimiokine CX3CR1 présent sur les cellules NK (59).

De plus, l'épithélium en condition de stress est capable d'activer les cellules NK via le récepteur NKG2D (60). Une fois activées les cellules NK peuvent libérer un large arsenal cytotoxique (61) :

- protéines cytolytiques : granzymes A, B, perforine, fasL, TRAIL
- cytokines : TNF alpha, IFN gamma

Enfin, lors du rejet chronique les cellules NK ont une propension à migrer dans les poumons (62).

### 2-2-5- Rôle des Macrophages et Eosinophiles

Le rôle des macrophages dans le développement du CLAD est suggéré par la réduction de la dysfonction du greffon après avoir bloqué leur infiltration(63).

Des travaux récents montrent une association entre les éosinophiles et la dysfonction du greffon (64). Les éosinophiles peuvent participer au développement du CLAD par la libération de ROS (destruction du greffon), ou TGF-beta (remodelage aberrant) (65-67).

## **2-3-Rôle de l'immunité adaptative**

### **2-3-1- Immunité Th1**

Le développement de la réponse immunitaire cellulaire alloimmune (et auto immune) repose généralement sur la migration des cellules présentatrices de l'antigène dans les organes lymphoïdes secondaires où elles rencontrent et activent les lymphocytes T.

Le rôle de l'immunité Th1 dans le développement du CLAD est suggéré par l'augmentation des cellules Th1 ou le niveau des cytokines ou granzymes B dans le sang ou le LBA des patients développant un BOS (68). De plus, l'inhibition des lymphocytes T cytotoxiques par HLA-G a été suggérée chez les patients stables (69). Cette alloreconnaissance implique principalement une présentation indirecte des CMH I et II du donneur (70).

### **2-3-2- Immunité Th17**

L'agression des tissus par l'ischémie, la défaillance primaire du greffon, l'infection ou les réactions allo-immunes modifient l'accessibilité des domaines protéiques antigéniques. L'autoimmunité joue un rôle de plus en plus évident dans le développement du CLAD: les épitopes normalement masqués peuvent être exposés au système immunitaire conduisant à une réponse autoimmune. En effet l'expression de Col(V), un antigène du collagène, spécifique de l'intensité de la réponse T, est corrélé à l'incidence et la sévérité du BO, en raison d'une réponse autoimmune anti-Col(V) dépendante de Il-17. De plus, l'immunité Th17 est liée à l'inflammation chronique et aux neutrophiles dans le poumon. Dans la transplantation pulmonaire, l'immunité Th17 favorise la dysfonction chronique du greffon par la fibrose des voies aériennes, l'induction des BALT, le chimiotactisme des neutrophiles et l'expansion des autoanticorps (71).

### **2-3-3- Rôle des cellules régulatrices**

Le rôle des Lymphocytes T régulateurs dans le développement du CLAD sera détaillé dans un chapitre spécifique (Cf ci-dessous).

### 2-3-4- Immunité humorale

L'association entre l'immunité humorale et le développement du CLAD est bien documentée. L'accumulation des cellules B est observée dans les tissus pulmonaires des patients développant un CLAD (72). La présence d'antigènes spécifiques du donneur (DSA), est corrélée au développement du BOS (73), et les thérapies ciblant les DSA diminuent l'incidence de la dysfonction chronique (74). Les anticorps anti Col(V) et anti K alpha1 tubuline ont été associés au processus de BOS, indépendamment des DSA (75).

Les anticorps anti-greffon induisent une activation du système du complément et une dégradation du tissu pulmonaire. Le polymorphisme de la protéine CD59 régulatrice du complément a été associé au développement du BOS (76) suggérant que la régulation de l'activation du complément peut contrôler le développement du CLAD. L'activation du complément a été largement étudiée comme potentiel marqueur de rejet humoral, via le marquage du composant C4d.

L'activation répétée de réactions immunitaires induit une destruction des tissus et une dégradation des processus de réparation de l'épithélium. Ces mécanismes sont difficilement contrôlables par l'immunosuppression et un processus de remodelage aberrant de l'épithélium prend place et conduit finalement à la perte de fonctionnalité du greffon.

La figure 8 résume les mécanismes physiopathologiques du CLAD. Les facteurs de risques endogènes (CMH mismatch, agression du greffon, auto-antigène) ou exogènes (infection, polluants, allergènes) conduisent à une activation du système immunitaire inné et adaptatif après transplantation pulmonaire. L'exposition continue à l'environnement et le développement de l'autoimmunité favorisent la persistance de l'inflammation et de l'agression des tissus. La destruction du greffon et les processus de blessure/cicatrisation favorisent le remodelage du greffon pulmonaire et le développement du CLAD.

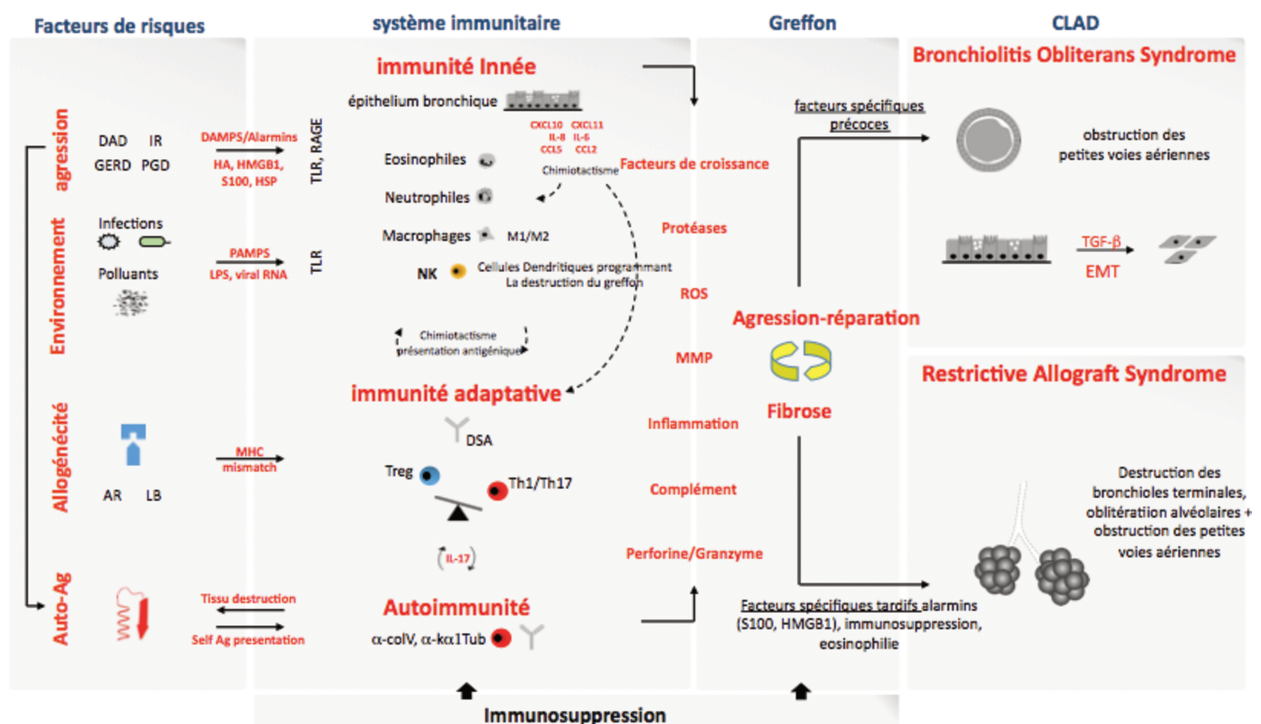


Figure 8 : mécanismes physiopathologiques du CLAD d'après PJ Royer Chronic Lung Allograft Dysfunction. *Transplantation* 2016 (77)

## 2-4 Les biomarqueurs dans le CLAD

Le diagnostic tardif du CLAD incite à valider des biomarqueurs précoces issus des connaissances sur la physiopathologie du CLAD. En effet les nombreuses études humaines et animales ont démontré l'importance des interactions entre récepteurs / cytokines / chimiokines dans la pathogénèse de la dysfonction du greffon.

Plusieurs biomarqueurs potentiels ont ainsi été proposés dans le CLAD : Il-6, Il-8, Il-17, Il-18, Il-23, Il-13, IFN-Gamma, TGF-beta, pH, acides biliaires, trypsine (en cas de RGO), et TLR.

Aujourd'hui, aucun de ces biomarqueurs résumés dans la figure 9, n'a d'implication en pratique clinique, et des études complémentaires sont nécessaires afin de clarifier au mieux l'importance de chacun.

### 3- Lymphocytes T régulateurs en transplantation pulmonaire

L'existence de lymphocytes T capables d'inhiber les réponses immunitaires et inflammatoires a été proposée dans les années 1970. Les Tregs sont depuis les années 2000 identifiés comme une sous-population cellulaire très importante dans de nombreuses pathologies: allergies, pathologies auto-immunes, infections virales, parasitaires et bactériennes, cancer, rupture de tolérance, et dans différentes situations inflammatoires: polyarthrite rhumatoïde, sclérodermie, myopathie, athérosclérose. Ils font d'ailleurs partie des candidats prometteurs dans le cadre de protocoles de thérapie cellulaire (78, 79) et sont des cibles potentielles dans le traitement de plusieurs cancers (80, 81). De nombreuses études ont été menées afin d'une part d'identifier les marqueurs spécifiques de ces lymphocytes T régulateurs et d'autre part d'en connaître les mécanismes de régulation.

#### 3-1-Identification

Plusieurs études ont mis en évidence l'existence de lymphocytes T régulateurs induits en périphérie de phénotype CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> CD127<sup>low</sup> présentant un développement et une activité régulatrice dépendante de l'expression du facteur de transcription FoxP3 (82, 83).

Plus récemment, d'autres études ont démontré que l'expression de ce marqueur n'était pas suffisante pour générer des Tregs stables et fonctionnels et que l'analyse de population Tregs CD4<sup>+</sup> devait s'appuyer sur l'étude épigénétique du gène codant FoxP3 (84, 85).

Jusqu'à maintenant, le marquage standard CD127, CD25 et FoxP3 était utilisé pour quantifier les Tregs circulants (11).

Le groupe de Sakagushi a montré que ces lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> FoxP3<sup>+</sup>, pouvaient être subdivisés en trois sous-populations, les Tregs mémoire (mTregs), les Tregs naifs (nTregs) et les non-Tregs (non-Tregs) qui expriment différenciellement les marqueurs FoxP3 et CD45RA et présentent des activités régulatrices différentes (86, 87) :

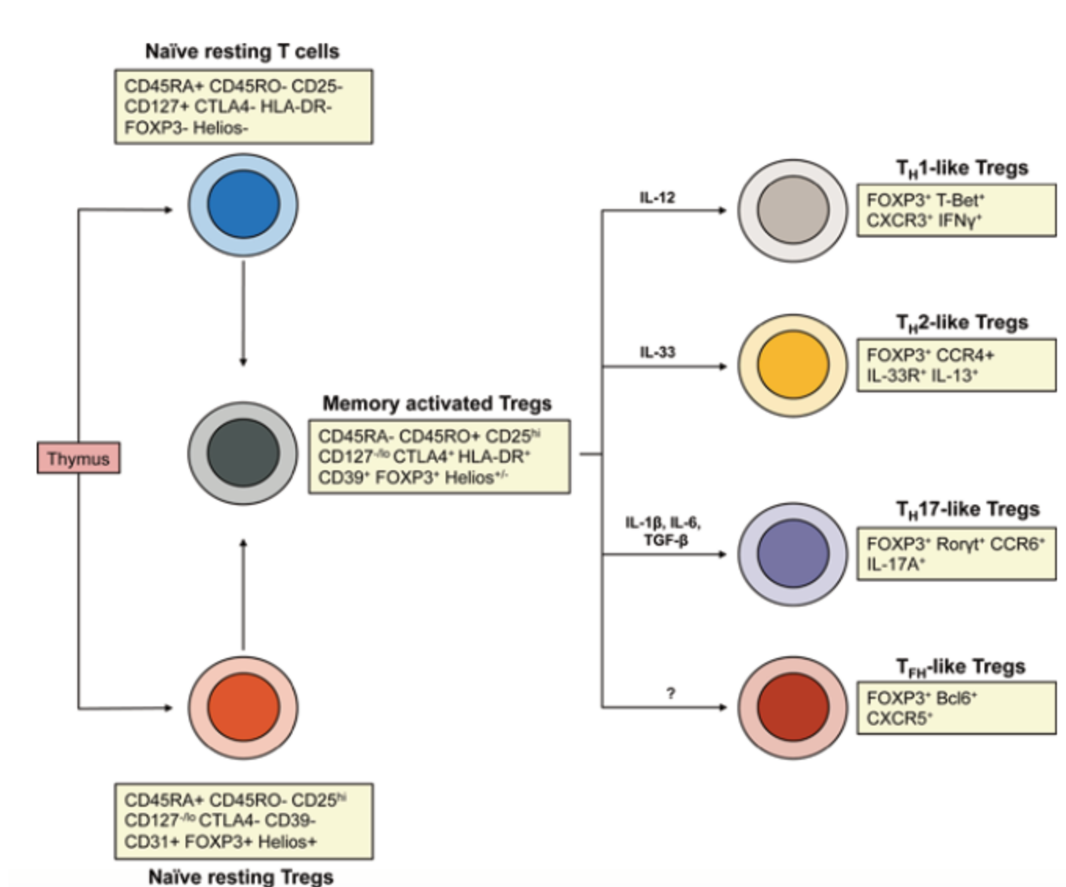
- naïves Treg (nTreg) : TCD45RA<sup>+</sup> CD45RO<sup>-</sup> Foxp3<sup>low</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>lo</sup>
- memory Treg (mTreg) : TCD45RA<sup>-</sup> CD45RO<sup>+</sup> Foxp3<sup>high</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>lo</sup>
- non Treg (non-Treg) : TCD45RA<sup>-</sup> CD45RO<sup>-</sup> Foxp3<sup>low</sup> CD25<sup>+</sup> CD127<sup>lo</sup>

La Figure 10 résume la stratégie d'identification des sous populations de Tregs chez l'homme. Les nTregs sont caractérisés par une faible expression des molécules de Tregs effecteurs (CTLA-4, Lag3, GITR, Il-10, Il-35, granzyme-B) comparés au mTregs (14-34). Helios est un marqueur



d'identification des Treg stables et probablement des Treg dérivés du thymus chez l'homme. Une fois activés, les nTreg se différencient en CD45RO+ mTreg et surexpriment des molécules de Tregs effecteurs (88), comme CD27 (89), CD39, CTLA-4, GITR, Lag3, et HLA-DR (90).

Il est ainsi maintenant clairement établi que les Treg humains peuvent se diviser en plusieurs sous-ensembles dépendants de leur état d'activation/différenciation et de leur localisation mais de plus amples analyses et investigations restent nécessaires afin de trouver des marqueurs plus spécifiques des ces sous-ensembles (91).



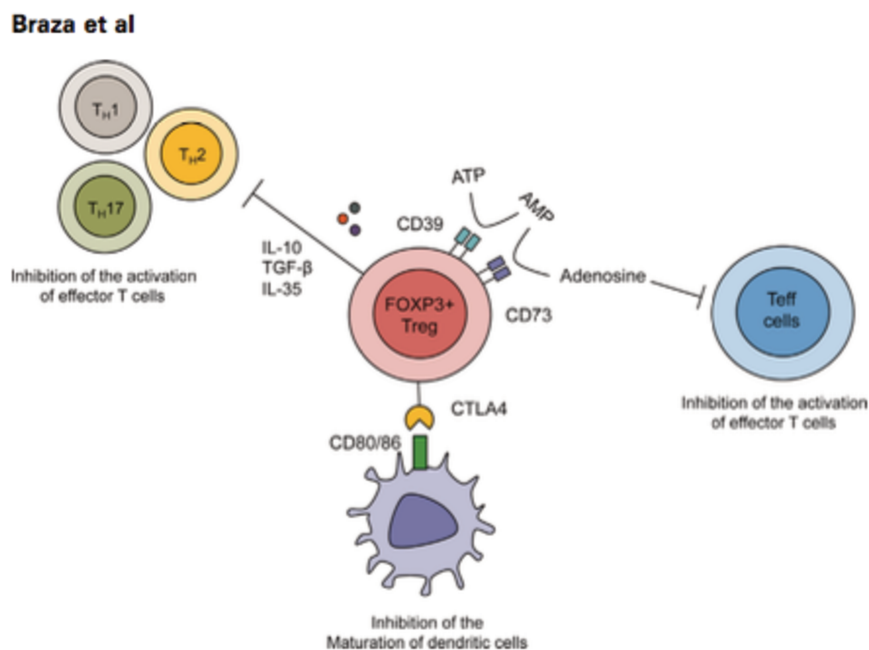
**Figure 10 : identification des sous ensemble de Treg humains**

D'après Braza et al. 2015 (92)

### 3-2- Tolérance et effet immunosupresseur

En transplantation rénale, un sous-groupe de patients (appelé « tolérant ») tolèrent leurs greffons sans l'utilisation de traitement immunosupresseur (93). Il a été démontré, dans ce contexte, une fréquence plus importante de Tregs circulants, notamment des Treg avec une déméthylation du FoxP3 (87). L'augmentation des mTreg n'est retrouvée que chez les patients tolérants. Ces mTreg expriment davantage CD39 et GITR et ont donc des propriétés suppressives plus importantes.

Les Tregs peuvent être la cible des composants de l'immunité innée et acquise afin de réguler les exacerbations inflammatoires et promouvoir la tolérance du greffon. Plusieurs mécanismes supresseurs médiés par les Tregs ont été identifiés, résumés dans la figure 9. Les Tregs peuvent inhiber l'inflammation par la production de cytokines immunosuppressives (IL-10, TGFbeta et IL-35) (94), l'expression de molécules inhibitrices telles que CTLA-4 (95) et par la libération d'adénosine par la voie de CD39-CD73 (96).



**figure 11 : fonctions immunosuppressives des Tregs humains**  
D'après Braza et al. 2015 (92)

Quelle que soit la population Treg étudiée, ses capacités régulatrices dépendent de mécanismes divers : cytolysse et inhibition dépendantes du contact des lymphocytes T effecteurs, induction de leur apoptose, arrêt de leur cycle cellulaire, blocage de la co-stimulation et de la prolifération des cellules dendritiques (97), induction d'un environnement anti-inflammatoire via la sécrétion de cytokines telles que l'IL-10 ou le TGF- $\beta$  (98), dégradation de l'ATP extra cellulaire en adénosine décrite pour sa fonction immunomodulatrice (99). Enfin, l'activité basale de la cellule T régulatrice elle-même, c'est à dire principalement son activité mitochondriale permettant la synthèse d'ATP intracellulaire influence les capacités régulatrices des cellules CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> FoxP3<sup>+</sup> (100).

### 3-3- Treg et CLAD

Les Treg regroupent une grande diversité de populations cellulaires immunosuppressives caractérisées par des mécanismes d'action et une ontogénèse spécifiques. Des études ont montré une corrélation entre la présence de Treg dans le greffon pulmonaire ou le sang et l'absence de dysfonction chronique (55). Plus spécifiquement, c'est la balance Th17/Treg qui pourrait déterminer l'évolution du greffon. En effet des modèles murins ont montré une down régulation » de l'immunité Th17 par transfert adoptif au profit des cellules Treg (101). De plus, la plasticité est une caractéristique des Treg, et un environnement inflammatoire peut favoriser une différenciation en cellules Th17 (102). Ainsi l'IL-6, facteur important de la balance Th17/Treg, est connu comme marqueur de la dysfonction chronique (66). Ainsi également, des études ont proposé de stimuler l'activité des Treg et de moduler la balance Th17/Treg. Par exemple des études ont montré une amélioration de la fonction respiratoire chez les patients atteints de CLAD traités par photophérèse extracorporelle, dont l'efficacité est supposée liée à l'induction de Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> (103). A contrario, les traitements immunosupresseurs, dont on pense qu'ils altèrent les Treg et affectent la balance Th17/Treg, favorisent le développement de la dysfonction chronique (104).

En outre, parallèlement aux Treg, des B régulateurs (Breg), produisant de l'IL-10 et du TGF beta, ont récemment été caractérisés. Dans un modèle murin, ils sont impliqués dans l'inhibition du développement de la bronchiolite oblitérante (105). Le challenge reste de définir l'impact de ces populations régulatrices dans le développement du CLAD afin de développer des thérapies immunosuppressives (106).

## 4- COhort in Lung Transplantation

La physiopathologie du CLAD est encore largement inconnue et a finalement peu été étudiée, essentiellement en raison de la rareté des malades atteints et de la difficulté d'accès à des prélèvements, et faute d'étude prospective longitudinale permettant d'identifier des événements biologiques précoces. La cohorte COLT (Cohort in Lung Transplantation) a vocation à répondre à ces limitations, en offrant aux centres participants l'infrastructure de recherche clinique nécessaire aux études multicentriques longitudinales prospectives, et en facilitant l'accessibilité à des prélèvements provenant de transplantés pulmonaires à des laboratoires de recherche intéressés par la biologie de la transplantation pulmonaire.

La cohorte COLT, coordonnée par le CHU de Nantes, consiste en la mise en commun d'une biocollection associée au recueil prospectif par les centres participants des données cliniques et fonctionnelles des malades dans une base commune.

### 4-1 – protocole COLT

COLT consiste en la mise en commun par les centres participants des données cliniques, biologiques, fonctionnelles et radiologiques des malades, recueillies de façon prospective, homogène et standardisée dans une base de données commune, associée à la réalisation d'une biocollection comprenant des échantillons d'ARN sanguin et de tissus, de biopsies de tissus, d'ADN, de sérum et de plasma, instituée dans le cadre du Centre de Ressource Biologiques du CHU de Nantes.

L'objectif de cette cohorte est de réaliser une étude longitudinale du développement du CLAD chez des patients transplantés pulmonaires suivis sur 10 ans après la transplantation, dans le but d'identifier et de valider de nouveaux biomarqueurs du développement du CLAD. L'étude COLT implique tous les centres de transplantation Français. Elle s'ouvre depuis 2012 à l'Europe, avec un centre en Belgique.

Les patients inclus après avoir été informés et avoir donné leur consentement éclairé signé pour la biocollection, sont revus à la date de la transplantation, à 1 et à 6 mois après la greffe, tous les 6 mois pendant 5 ans et tous les ans pour 5 ans supplémentaires. Lors de la transplantation un prélèvement sanguin du donneur et du receveur sont réalisés, et une biopsie de poumon natif stockée. A chaque visite de suivi, un prélèvement sanguin est réalisé (**figure 10**). Un surnageant d'expectoration induite, un condensat d'air exhalé ou du liquide et des cellules de lavage broncho-alvéolaire sont obtenus selon les habitudes des équipes dans le

cadre du suivi systématique des transplantés pulmonaires, ou en cas de suspicion de rejet, d'infection pulmonaire ou de CLAD.

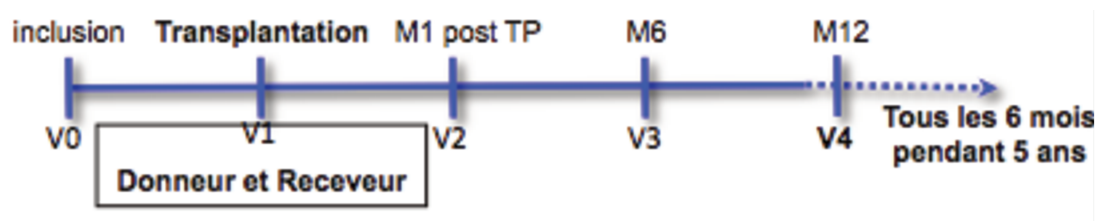


figure 12 : les différentes visites du protocole COLT

## 4-2 – Base de données

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

Les données cliniques, fonctionnelles et biologiques, ainsi que les résultats scientifiques, obtenus de façon prospective, sont entrés en temps réel par les assistants et infirmiers de recherche clinique (ARC et IRC) dans la base de données COLT.

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

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

données scientifiques et les ARC de la promotion (lecture seule des données, sans possibilité de saisie).

Le codage des patients est fait de la manière suivante. La première lettre du nom, la première lettre du prénom, et la date de naissance sont les seules informations qui figurent dans la base de données et qui permettent de rattacher à posteriori le CRF au patient. Le responsable de la recherche est également tenu de rendre anonyme tous les documents qu'il pourrait avoir en sa possession (compte-rendus d'examens d'imagerie, de biologie...) qui seraient joints au CRF.

Des comités d'adjudication, réunissant les cliniciens de chaque centre, avec les imageries et les épreuves fonctionnelles des patients transplantés pulmonaires suivis prospectivement, permettent de classer les patients selon leurs phénotypes stables, BO ou RAS.

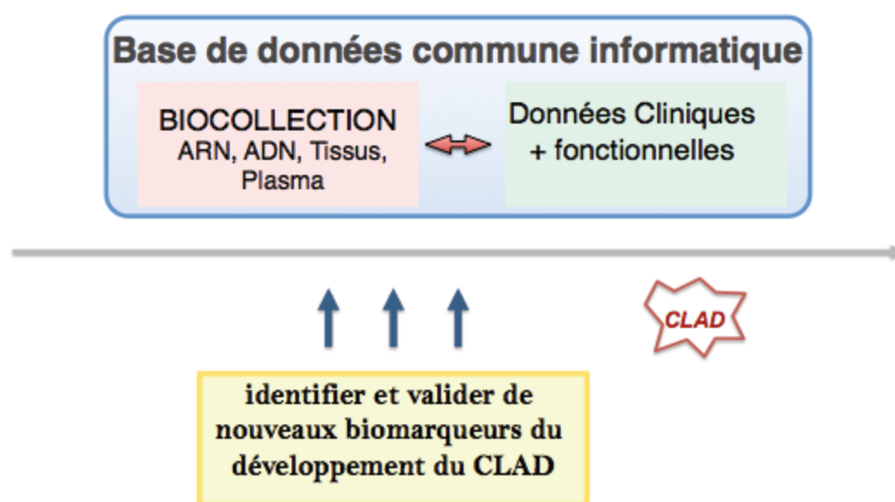


figure 13 : schématisation de la méthodologie du protocole COLT

## OBJECTIFS

Ainsi, sur la bases de ces données, notre étude consiste à caractériser phénotypiquement et fonctionnellement les lymphocytes T régulateurs chez les patients inclus dans la cohorte COLT présentant un CLAD comparés aux patients présentant une fonction stable de leur greffon pulmonaire (STA) au cours des différentes visites de suivi. Cette étude sera étendue à la visite V0 avant la greffe et la perspective d'intégrer les visites jusqu'au rejet chronique nous permettra de mieux comprendre la cinétique de cette réponse T régulatrice aux cours des épisodes de stabilité, de rejet aigu et de rejet chronique.

Cette analyse comprendra ainsi des données phénotypiques, épigénétiques et fonctionnelles portant sur les différentes sous-populations T régulatrices concourant à définir et valider l'existence d'un biomarqueur prédictif spécifique du rejet chronique d'allogreffe pulmonaire (CLAD). Dans un second temps

## II- IMMUNOMONITORING DES LYMPHOCYTES T EN TRANSPLANTATION PULMONAIRE

### High regulatory T cells rate after lung transplantation is associated with Bronchiolitis Obliterans Syndrome

Maxim Durand<sup>1,2,3\*</sup>, Philippe Lacoste<sup>2,3\*</sup>, Carole Brosseau<sup>1,2, 3</sup>, Eugénie Durand<sup>2, 3</sup>, Jennifer Loy<sup>2, 3</sup>, Pierre J Royer<sup>2, 3</sup>, Antoine Magnan<sup>2, 3</sup>, Sophie Brouard<sup>1, 3</sup> & COLT Consortium

<sup>1</sup> ITUN-INSERM U1064, Nantes, France

<sup>2</sup> l'institut du thorax, INSERM U1087/CNRS U6291, Nantes, France

<sup>3</sup> University of Nantes, Nantes, France

\*M.D. and P.L. contributed equally to this report

*Key words: Lung Transplantation, Bronchiolitis obliterans, Lymphocytes, Regulatory T cells*

#### Rationale:

Although immunosuppressive drugs and surgical technics dramatically improved acute rejection management after lung transplantation, the irreversible chronic lung allograft dysfunction remains a therapeutic challenge for long-term survival. For Bronchiolitis Obliterans Syndrome, the main form of chronic dysfunction, both immune mechanisms involved and predictive biomarkers have to be better defined.

#### Objectives

The COhort in Lung Transplantation, initiated in order to understand the pathophysiology of chronic lung allograft dysfunction, gave us the opportunity to analyse the T lymphocyte profile of the patients from the transplantation to the bronchiolitis obliterans syndrome occurrence.

#### Methods

First the T cell profile of 6 stable and 8 patients with bronchiolitis obliterans syndrome was investigated before transplantation, 1 to 6 months after transplantation, at the lung dysfunction diagnosis and 6 months before. PBMCs were analysed by flow-cytometry with the “classical” T-cells markers: CD3, CD4, CD25, CD45RA, and FoxP3. CXCR3, CCR6, CD39, CD73 CD15s and PD1 were also added to go deeper in the helper (Th) and regulatory T cell (Treg) subsets.

#### Measurements and main results

T cell profile monitoring highlights an increase in FoxP3<sup>+</sup> Treg proportion 1 to 6 months post-transplantation in bronchiolitis obliterans syndrome patients compared to stable patients (3,36% and 0,85% respectively, p<0,005). We validated this profile on 37 stable and 24 bronchiolitis obliterans syndrome patients (1,61% and 3,18% respectively, p<0,001). These regulatory T cells denote a memory phenotype with an expression of CD25, CD45RA, PD1



and CD39. The bronchiolitis obliterans syndrome-free survival is significantly increased in patients with a low proportion of regulatory T cells early after transplantation (41% and 75% in  $_{hi}$ Tregs and  $_{low}$ Tregs respectively,  $p<0,01$ ).

### Conclusions

In conclusion, we identify regulatory T cell profile as new potential predictive biomarker of bronchiolitis obliterans syndrome as early as 1 to 6 months after lung transplantation.

## 1-Introduction

Lung transplantation is a well-established treatment of end-stage pulmonary diseases. Despite the improved surgical techniques and the use of immunosuppressive drugs, relatively low survival rates of 50% after 5 years are still reported (2). The major limitation to long-term survival relates to the development of chronic lung allograft dysfunction (CLAD) in its Bronchiolitis Obliterans Syndrome (BOS) form with fibrous obliteration of bronchioles (33). BOS development has long been associated with various immunologic and non-immunologic factors (107-110). It is defined by an irreversible decline in lung function compared to the maximum post-transplantation and affects 50% of lung-transplanted patients within the 5 years after transplantation. This clinical surrogate marker will occur after BOS has already developed (111), so that both immune mechanisms involved and predictive biomarkers have to be better defined to allow diagnosis prior to BOS development and design new therapies.

The initial description of suppressor T cells in the 1970s (112) was refined in the 1990s with the identification of a distinct CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T cell subset able to regulate inflammatory immune responses (113, 114). This regulatory T cell subpopulation (Tregs) was later characterized by the expression of FOXP3, a central transcription factor necessary for their survival and suppressive function (82, 83, 115). Tregs encompass a wide diversity of immunosuppressive populations characterized by specific ontogeny or mechanisms of action (116). The recent identification of Tregs able to express T-helper-associated transcription factors and to secrete pro-inflammatory cytokines, raises the question of their heterogeneity and stability, under chronic inflammation or immunosuppressive therapy (117, 118). Sakaguchi's group show in 2009, that human FoxP3<sup>+</sup> Tregs were composed of three phenotypically and functionally distinct subpopulations: CD45RA<sup>+</sup> FoxP3<sup>lo</sup> naïve Tregs (nTregs), and CD45RA<sup>-</sup> FoxP3<sup>hi</sup> memory Tregs cells (mTregs), both of which were suppressive in vitro, and cytokine-secreting CD45RA<sup>-</sup> FoxP3<sup>lo</sup> non suppressive T cells (non-Tregs){Sakaguchi:2010fc}. The proportion of the three subpopulations differed between cord blood, aged individuals, and patients with immunological diseases.

Although the function of Treg subsets in clinical transplantation has not been fully clarified, they are believed to suppress the effector CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells alloreactivity, and thereby contribute to the allograft survival (91, 119-121). Understanding mechanisms of graft

maintenance in humans is a matter of great interest, particularly in lung transplantation, because the long-term survival of patients is threatened by chronic rejection.

The COLT (Cohort in Lung Transplantation), initiated in order to understand the pathophysiology of CLAD, gave us the opportunity to follow the immune profile of the patients from the lung transplantation to the BOS occurrence. Then, here we investigate the longitudinal profile of Tregs in the peripheral blood of lung transplant recipients (LTR) included in the COLT cohort. We compared LTR developing BOS with stable patients, we analysed the T cell proportions and phenotypes, focusing on Tregs in order to identify a possible specific early biomarker of BOS.

## **2-Material and methods**

### **Patients and study design**

The University Hospital Ethical Committee of Nantes and the Committee for the Protection of Patients from Biologic Risks approved this study. All patients who participated in this study gave informed consent. Blood samples were selected from LTR included in the multicentric longitudinal cohort COLT (COhort in Lung Transplantation, NCT00980967). COLT consists in monitoring LTR during 5 years from transplant in order to detect predictive factors of CLAD. Pulmonary function tests, clinical data and blood were collected at inclusion before transplantation (Visit 0, V0), the day of transplantation (V1), one-month later (V2) and every six months after transplantation up to 5 years (V3 to V12).

The criteria for stability (STA) or bronchiolitis obliterans syndrome (BOS) were described in detail elsewhere (33). STA and BOS phenotypes were confirmed by an adjudication committee of clinicians and researchers upon pulmonary function tests, computerized tomography, and after elimination of confounding factors in line with the charter ISHLT/ERS/ATS (27).

A total of 61 age and sex-matched LTR from COLT were included in this study, and a summary of the clinical data is presented in Table 1. For each patient, 4 time points were analyzed: the visit at the inclusion before TP, one to six months after transplantation (samples of V2 and V3 were analyzed together), 18 months after transplantation for stable patients and the visit for which CLAD was diagnosed and 6 months before CLAD for BOS patients.

The lymphocyte profile of 6 stable (STA) and 8 BOS patients was investigated on those 4 time points, then we validated the V2-V3 profile on 37 stables and 24 bronchiolitis obliterans syndrome patients. Each patient has a minimum of 3 years of follow-up.

### **Cytometry, and Cell Sorting**

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated by Ficoll-Paque (GE Healthcare, Marolles-en-Hurepoix, France) gradient centrifugation, frozen and stored at the Centre de Ressources Biologiques (CRB) of Nantes. PBMC were rapidly thawed by placing cryovials at 37°C, washed and stained. The following antibodies and reagents were used for flow cytometry and cell sorting: CD3-BUV 395; CD4 V500; CD25 BUV737; CD45RA PerCP Cy5,5; FoxP3-PE; CD39 PE-CF 594; CXCR5 Alexa 647; CXCR3 BV421; CCR6 FITC;

CD73 BV605; PD1 PE-Cy7; CD15s BV71; CD45RA-PE; CD4 FITC (BD Biosciences), CD25-Alexa Fluor 647.

Dead cells were excluded using the Zombie NIR™ Fixable Viability kit (BioLegend, London, UK) for immunomonitoring and DAPI for cell sorting.

### **Secretion assay**

For this assay, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were sorted, plated  $1.10^6$ /mL and activated for 5 hours with 50 ng/mL PMA, 1 µg/mL. Supernatants were recovered and cytokines secretion was measured by immunoassay (ProcartaPlex Human Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg Cytokine Panel, eBioscience) according to manufacturer recommendations.

### **Statistical Analyses**

We compared patient group characteristics using chi-squared testing as appropriate. Categorical variables were compared using the Fisher exact test. For continuous variables, comparisons were performed using the Student t test or Mann–Whitney test, whenever appropriate. Differences were defined as statistically significant for a p value < 0.05. Correlations were analyzed using linear regression. All statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (version 6).

### 3-Results

| Demographic characteristics           | STA           | Groups<br>BOS | p-value  |
|---------------------------------------|---------------|---------------|----------|
| Participants, n                       | 37            | 24            |          |
| Recipient gender, n (%)               |               |               |          |
| Male                                  | 22 (59)       | 11 (46)       | 0,4305   |
| Female                                | 15 (41)       | 13 (54)       |          |
| Recipient age (yr), median (min-max)  | 40 (16-63)    | 47 (15-65)    | 0,2179   |
| Donor gender, n (%)                   |               |               |          |
| Male                                  | 22 (59)       | 11 (46)       | 0,4305   |
| Female                                | 15 (41)       | 13 (54)       |          |
| Donor age (yr), median (min-max)      | 38 (14-60)    | 49 (14-68)    | 0,0164   |
| Pretransplant diagnosis, n (%)        |               |               |          |
| CF                                    | 20 (54)       | 6 (25)        | 0,0347   |
| Emphysema/COPD                        | 7 (19)        | 7 (29)        | 0,5343   |
| PAH                                   | 2 (5)         | 2 (8)         | > 0,9999 |
| IPF                                   | 4 (11)        | 6 (25)        | 0,1714   |
| Other                                 | 4 (11)        | 3 (13)        | > 0,9999 |
| Transplant type, n (%)                |               |               |          |
| Bilateral                             | 31 (83)       | 17 (71)       | 0,3377   |
| Single                                | 3 (8)         | 4 (17)        | 0,4178   |
| Lobar                                 | 1 (3)         | 2 (8)         | > 0,9999 |
| Heart Lung                            | 2 (6)         | 1 (4)         | 0,5559   |
| Ischemic time (min), median (min-max) | 292 (110-267) | 260 (176-415) | 0,3678   |
| Induction agent, n (%)                |               |               |          |
| Basiliximab                           | 14 (38)       | 3 (13)        | 0,0418   |
| Thymoglobulin                         | 11 (30)       | 17 (70)       | 0,0034   |
| None                                  | 12 (32)       | 4 (17)        | 0,2373   |
| IS therapy, n (%)                     |               |               |          |
| Steroids                              | 36 (97)       | 21 (88)       | 0,2904   |
| Tacrolimus                            | 17 (46)       | 6 (25)        | 0,1142   |
| Cyclosporine                          | 15 (40)       | 17 (71)       | 0,035    |
| MMF                                   | 17 (46)       | 13 (54)       | 0,6051   |
| Acute cellulars rejections, n (%)     |               |               |          |
| Ever A1 grade                         | 14 (38)       | 7 (29)        | 0,5859   |
| Ever ≥A2 grade                        | 8 (21)        | 4 (17)        | 0,7488   |

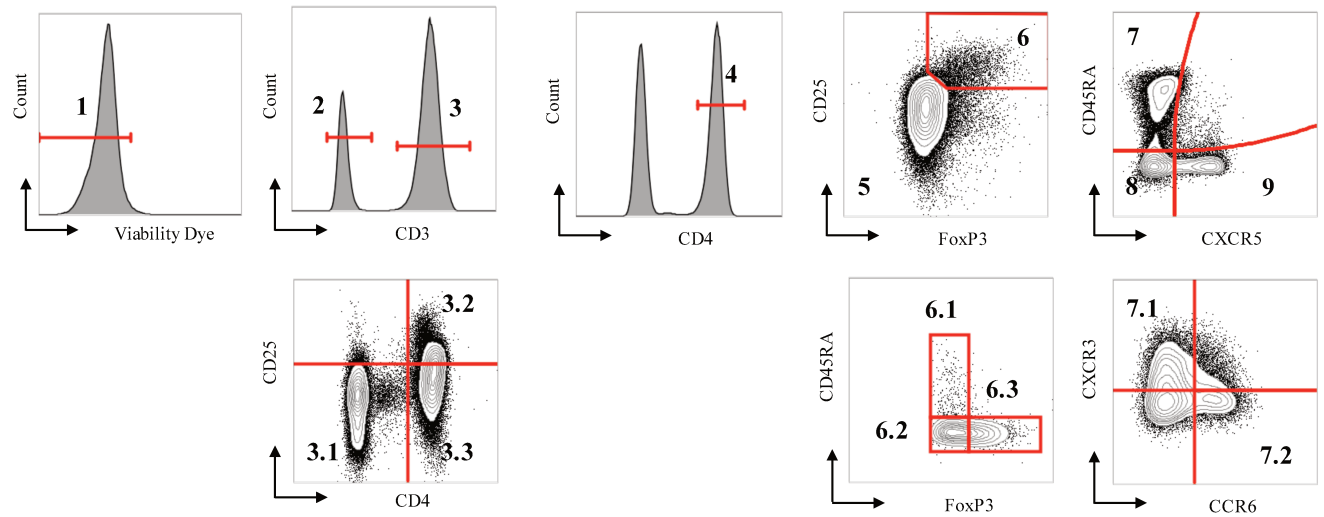
**Table 1: demographic characteristics and clinical data**

#### Clinical data

Demographic characteristics and clinical data of the 37 stable (STA) and the 24 BOS LTR are compared in table 1. None of the usual risk factor of CLAD is different between the two groups. We can note that there is no difference concerning the presence or grade of acute

cellular rejection episodes. There are more patients treated by thymoglobulin and cyclosporine among BOS LTR, and more patients treated by Basiliximab in STA group.

## Gating strategy

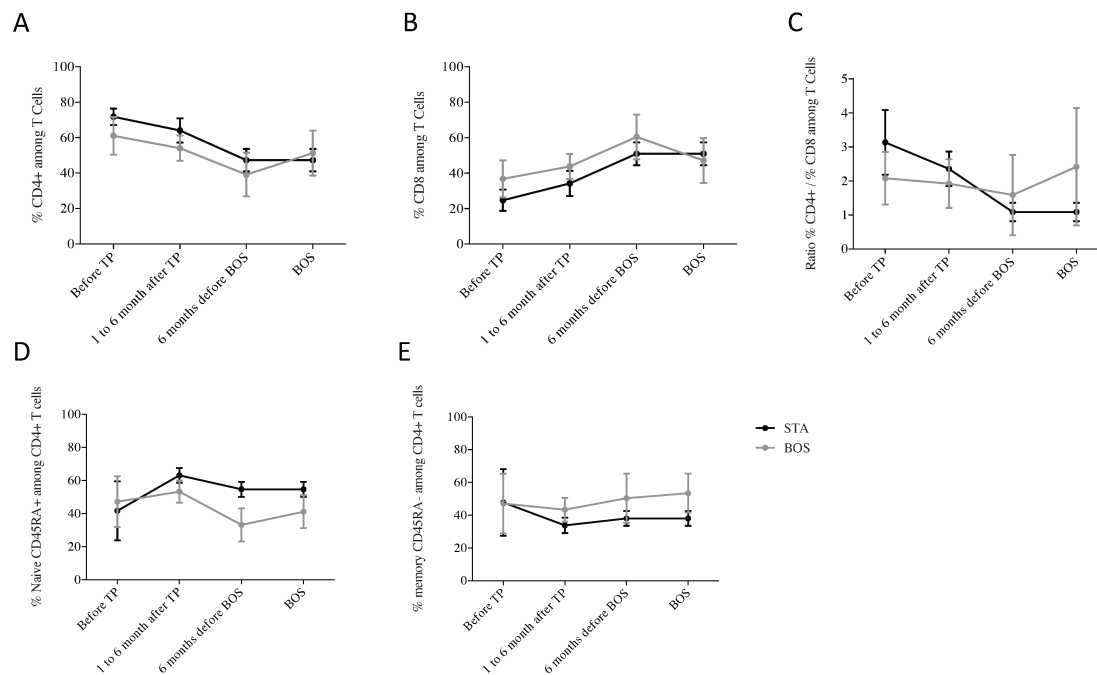


1. Live cells
2. CD3- live cells
3. CD3+ T cells
  - 3.1. CD8+ T cells
  - 3.2. CD4+ CD25+ T cells
  - 3.3. CD4+ CD25- T cells
4. CD4+ T cells
5. Non Tregs CD4+ T cells
6. CD25<sup>hi</sup> FoxP3+ Tregs
  - 6.1. Naive Tregs
  - 6.2. Non FoxP3+ T cells
  - 6.3. Memory Tregs
7. CD45RA+ CD4+ T cells
  - 7.1. Th1 CD4+ T cells
  - 7.2. Th17 CD4+ T cells
8. Memory CD4+ T cells
9. Follicular helper T cells

**Figure 1: Flow cytometric gating strategy**

Figure 1 represents our flow cytometric gating strategy. Tregs are CD25<sup>hi</sup> FoxP3<sup>+</sup> circulating CD4<sup>+</sup> T cells. Naive Tregs are CD45RA<sup>+</sup> FoxP3<sup>lo</sup>, and memory Tregs are CD45RA<sup>-</sup> FoxP3<sup>+</sup>. Expression of CXCR5, CXCR3 and CCR6 permits to detail the CD4<sup>+</sup> subsets : Th1, Th17, memory and follicular helper.

## No difference in the effector T cell profile between STA and BOS in the longitudinal immunomonitoring



**Figure 2 : longitudinal T cell immunomonitoring between 6 stable patients (STA) and 8 patients with Bronchiolitis Obliterans Syndrome (BOS)**

A- % CD4<sup>+</sup> among T cells

B- % CD8<sup>+</sup> among T cells

C- Ratio CD4/CD8 among T cells

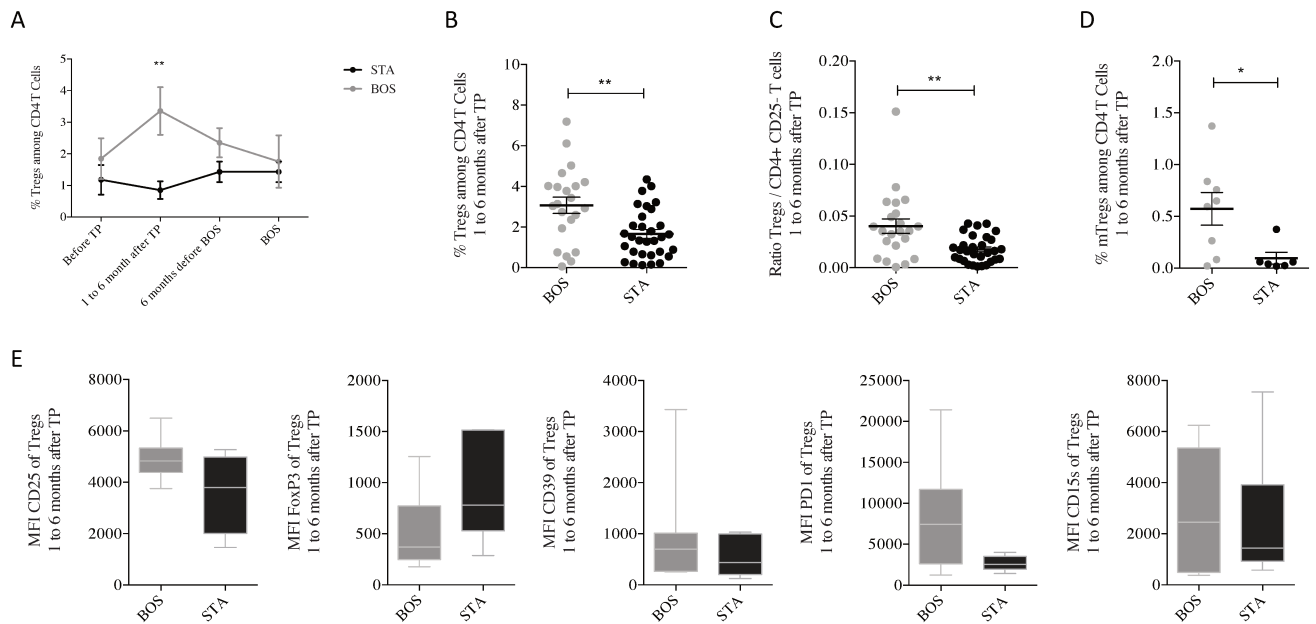
D- % naive CD45RA<sup>+</sup> among CD4<sup>+</sup> T cells

E- % memory CD45RA<sup>-</sup> among CD4<sup>+</sup> T cells

Longitudinal analysis of the proportion of the common T cells subpopulations: CD4<sup>+</sup> (A) and CD8<sup>+</sup> (B) proportions, CD4/CD8 ratio (C), naive (D) and memory (E) CD4<sup>+</sup>, do not show any significant difference between the STA and BOS patients from transplantation to CLAD occurrence (figure 2).



## Increased proportion of FoxP3+ Tregs 1 to 6 month post transplantation in BOS patients



**Figure 3 : Tregs profile analysis and characterisation**

A- longitudinal analysis between 6 STA and 8 BOS

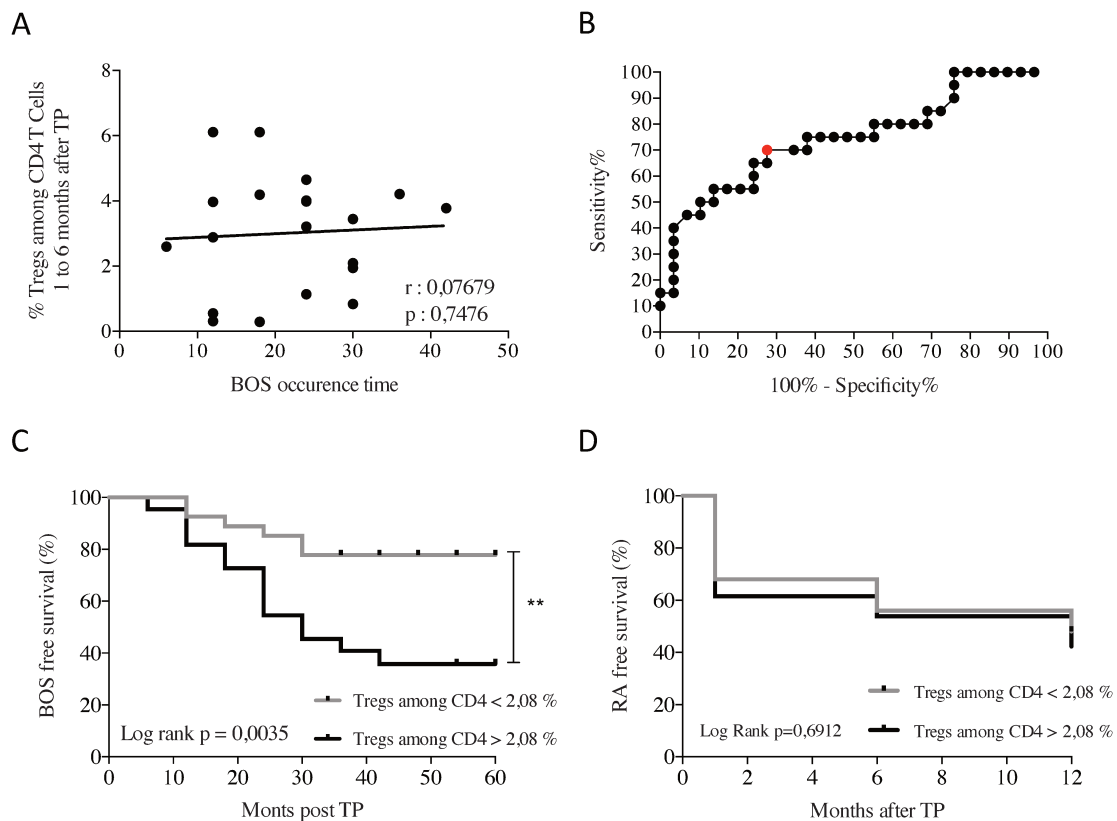
B-C- focus on 1 to 6 month post-transplantation period between 37 STA and 24 BOS : proportion of Treg among CD4+ T cells (B) and Tregs/ CD4+CD25- T cells ratio (C)

D- Percentage of mTregs among CD4+ T cells between 6 STA and 8 BOS at 1 or 6 months post-transplantation

E- Mean fluorescence intensity of CD25, FoxP3, CD39, PD1, CD15s on Tregs between 6 STA and 8 BOS at 1 or 6 months post-transplantation

The longitudinal immunomonitoring shows an increase in Treg proportion in the 6 first months after transplantation in peripheral blood of patients developing a BOS at 4 years (figure 1A). This particular Treg profile 1 to 6 months post transplantation was validated on a larger number of LTR: 37 STA and 24 BOS (figure 1B). This Treg proportion increase induces a significant difference in the ratio Tregs/CD4+ effector cells between STA and BOS in favour of the regulatory mechanisms (figure 1C). Within Tregs, memory Tregs, a subpopulation with high suppressive capabilities, are increased in proportion in BOS vs. STA (figure 1D). The mean fluorescence intensity of CD25, FoxP3, CD39, PD1 and CD15s at 1 or 6 months after TP was not different between STA (n = 6) and BOS (n = 8).

## Increased survival without BOS in patients with a low proportion of Tregs early after transplant.



**Figure 4 : relationship between Tregs and BOS**

A- %Treg / BOS occurrence time

B- ROC curve (BOS free survival/Treg proportion)

C- Kaplan-Meier survival curve of BOS free survival depending on % Treg

D- Kaplan-Meier survival curve of AR free survival depending on % Treg

No correlation was shown between Treg proportions 1 to 6 months after transplantation and the time when BOS occurred (figure 4A). Nevertheless, <sup>hi</sup>Treg proportion, up to 2,08 % among CD4<sup>+</sup> T Cells, is significantly associated with a gain of BOS-free survival compared to blood <sup>lo</sup>Tregs proportion after lung transplantation (figure 4B, 4C). There is no association between this Treg proportion and AR free survival (figure 4D).

## 4- Discussion

The irreversible chronic lung allograft dysfunction remains a therapeutic challenge for the long-term graft survival after lung transplantation. Mechanisms involved in Bronchiolitis Obliterans Syndrome (BOS), the main form of CLAD, have to be refined in order to prevent and/or treat it. Here we investigated the T cell profile and the possible role of suppressive Tregs in BOS development. Monitoring didn't show any significant difference between BOS and STA LTR in the proportions of naïve, memory CD4<sup>+</sup> T cells and CD8 T cells subsets. We highlight an increase in FoxP3<sup>+</sup> Treg proportion 1 to 6 months post-transplantation in BOS compared to STA (0,85% and 3,36% in STA and BOS respectively,  $p < 0,005$ ), validated on 37 STA and 24 BOS additional patients (1,61% and 3,18% in STA and BOS respectively,  $p < 0,001$ ). The survival without BOS is significantly increased in patients with a low proportion of Tregs 1 to 6 months post-TP. This is the first longitudinal study highlighting an increase in FoxP3<sup>+</sup> Treg proportion early after transplantation in the peripheral blood of patients who will declare a BOS compared to STA. This finding offers a potential cellular biomarker that could be useful in early prediction of BOS and provides potential insight into the mechanism of chronic lung allograft dysfunction.

As far as BOS is considered as the result of chronic rejection, our results may appear at least challenging. Tregs, involved in the resolution of inflammation by secreting immunosuppressive IL-10, induce a long-term tolerance in various models of solid organ transplantation. In a murine model of heart transplantation, CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> cells were necessary and sufficient for long-term graft survival (122). In the context of lung transplantation several studies were interested in monitoring Tregs after lung transplantation.

Bhorade et al. (123) demonstrated a lower percentage of CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells in the bronchoalveolar lavage (BAL) fluid in LTR who subsequently develop BOS compared with those who remained stable, during acute rejection episodes. No difference was observed in peripheral blood. The Bhorade et al. hypothesis is that higher percentage of Tregs among BAL CD4<sup>+</sup> cells during AR episodes may protect against development of BOS. Circulating T cells may not reflect the local immune response at the graft site, whereas T cells in the lung may have a more critical role in determining graft outcome. Accordingly Neujahr et al. (124) demonstrated increased frequency of BAL CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> cells during acute lung allograft rejection, but BOS was not examined. Recently, Greenland and al (125) found that BAL frequencies of donor-reactive T cells, including Tregs, increase during acute cellular rejection.

Satoda et al. (126) recently revealed that FoxP3 in peripheral blood cells is upregulated in the early phase of rejection in a porcine model. Taken together these results indicate that FoxP3+ Tregs may not be associated with immunologic quiescence but rather recruited to the allograft as a consequence of allograft inflammation. Acute rejection episodes are a risk factor of BOS. In the inflammatory context of acute rejection Tregs would be recruited to try to maintain a functional organ despite alloreactive immune responses. The high blood proportion of Tregs we found at early stage of BOS could therefore reflect the need of even more Tregs to prevent lung loss.

However other studies suggested a decrease in Tregs identified by expression of CD4 and CD25 in peripheral blood of patients with BOS compared with those who remain stable (55, 127). In LTR, Meloni et al. monitored the CD4+ CD25+ population in blood, and found them decreased in BOS compared to healthy recipients and normal volunteers and showed that the proportion of CD4+ CD25+ was inversely correlated with the development of BOS after transplantation (127). Nakagiri et al. found that the frequency of Tregs in peripheral blood was positively correlated with improved early lung function, 3 weeks and 3 months after lung transplantation but were not interested in BOS occurrence. However, these studies did not integrate last Tregs phenotypes such as FoxP3 and Treg subpopulations markers and conclude on regulatory T cells profiles contaminated by activated CD4+ T cells in a non-longitudinal analysis. Then differences between these studies and our results could come from these partial phenotypic analysis at a different time points after transplantation.

Our results question the Treg function in the context of LT and chronic inflammation. Suppressive function of Tregs may not be stable over time, especially under chronic inflammation. Animal models of autoimmunity show the ability of FoxP3+ Tregs to switch to nonregulatory FoxP3+ pathogenic T cells (128-130). In experimental transplantation stimulation of the TIM-1 and OX40 pathways can deprogram Tregs and favor their conversion into inflammatory T cells, promoting allograft rejection (131, 132). So, the link between circulating Tregs and chronic lung inflammation is not clear and simple due to the plasticity of Tregs. A study of immune responses in explanted human kidney grafts emphasized the importance of the inflammatory environment, with a break in B cell tolerance and the production of high levels of IL-6, IL-1 $\beta$  and TGF- $\beta$ , three combined cytokines that can reprogram Tregs into pathogenic TH17-like cells (133).

## Conclusion

There is a growing interest in studying Treg in organ transplantation: operational tolerance, long-term maintenance, acute rejection, and chronic dysfunction. But there is no consensus about the link between Tregs and BOS occurrence. We have shown that there is an increase of Treg proportions with a memory phenotype early after lung transplantation for patients who will declare a BOS. This particular profile is associated with a gain in BOS-free survival in <sup>hi</sup>Tregs proportion lung recipients. In this with way, because it occurs in the six months after lung transplantation, peripheral blood Treg profile could be a possible biomarker of BOS development.

### III-DISCUSSION

Notre travail vise à étudier le profil immunitaire des patients transplantés pulmonaires dans le contexte du CLAD. Grâce à la biocollection de la cohorte COLT, les PBMC ont été analysés par cytométrie de flux avec les marqueurs « classiques » d'analyse des lymphocytes T : CD3, CD4, CD25, CD45RA, et FoxP3. CXCR3, CCR6, CD39, CD73 CD15s et PD1 ont été ajoutés pour l'analyse des sous population T helper et T régulateurs. Cette étude ne montre aucune différence significative entre les patients qui développent un BOS dans les 4 ans post-TP et les STA dans les proportions des populations T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup> globales. Nous avons identifié une augmentation des Tregs FoxP3<sup>+</sup> 1 à 6 mois post-TP chez les BOS comparés aux STA (STA - 0,85% et BOS - 3,36%,  $p < 0,005$ ). Cette différence a été validée sur 33 patients STA et 25 patients BOS (STA - 1,61% et BOS - 3,18%,  $p < 0,001$ ). L'analyse des sous-populations de Tregs démontre que l'augmentation des Tregs chez les BOS est principalement due à une augmentation des sous-populations mémoires CD45RA<sup>-</sup> et CD39<sup>+</sup>. Enfin, tandis que ces populations ne permettent pas de prédire la survie sans rejet aigu, la survie sans BOS est augmentée significativement chez les patients présentant un faible taux de Tregs 1 à 6 mois post-TP ( $_{hi}$ Tregs - 41% et  $_{low}$ Tregs - 75%,  $p < 0,01$ ). C'est à notre connaissance, la première étude montrant une augmentation du taux de FoxP3<sup>+</sup> Treg (principalement Treg mémoire (CD45RA<sup>-</sup> and CD39<sup>+</sup>)), précocement après la TP, chez les patients qui développeront un BOS comparés aux patients stables.

#### Localisation

L'étude de Bhorade et al. trouve un taux moins élevé de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> dans les LBA des patients transplantés pulmonaires en rejet aigu qui vont développer un BOS comparés aux patients stables. L'analyse des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> FoxP3<sup>+</sup> circulants n'est pas différente entre les groupes dans cette étude. Celle-ci suggère ainsi que les lymphocytes T circulants ne sont pas le reflet de la réponse immunitaire au niveau du greffon, où les lymphocytes T peuvent avoir un rôle essentiel. L'hypothèse de cette étude est qu'un taux élevé de lymphocyte T FoxP3<sup>+</sup> dans les LBA durant les épisodes de rejets aigus peut protéger le greffon vis-à-vis du BOS en favorisant le retour à un état d'équilibre.

Une des limitations de l'utilisation des cellules circulantes comme biomarqueur est donc que ce compartiment cellulaire peut ne pas indiquer ce qui se passe au niveau cellulaire dans le greffon lui-même. Les patients greffés pulmonaires sont parfois soumis à une surveillance bronchoscopique régulière permettant le recueil de nombreux prélèvements, mais cette

surveillance invasive est de moins en moins systématique. Dans cet esprit, Neujahr et al ont réalisé une étude de transplantés pulmonaires qui ont pu bénéficier d'une série de fibroscopies de surveillance durant la première année post-transplantation (124). Les patients étant en rejet aigu lors de leur première biopsie ont d'abord été identifiés, et la fréquence de leurs cellules CD4+FoxP3+ dans le LBA a été comparée à celle des patients stables et quiescents. Pendant la première année après la transplantation, une corrélation a été retrouvée entre le score de rejet cumulé (somme de tous les épisodes de rejet par grade histologique) et la fréquence moyenne des cellules FoxP3+ dans les LBA. Des résultats parallèles ont été publiés en transplantation rénale avec une association retrouvée entre l'ARNm de FoxP3+ urinaire et le rejet aigu cellulaire, prédictif de la réponse à l'augmentation des immunosuppresseurs standards (134, 135). Les modèles murins vont aussi dans ce sens. Même s'il apparaît que les Tregs pulmonaires sont activés en réponse au rejet aigu, peu d'éléments sont connus au sujet des capacités de ces cellules à contrôler le rejet chronique, ni si elles peuvent représenter un biomarqueur prédictif de BOS. Les chimiokines CXCL9, CXCL10, et CXCL11 sont élevées chez les patients BOS et dans un modèle murin de BOS rendant plausible l'hypothèse selon laquelle les Treg migreraient dans le poumon dans un but de protection contre le BOS. Au total, ces différentes études, sur les PBMC ou sur les BAL, ces différentes hypothèses, mettent la localisation, la migration des Treg au centre des discussions et des perspectives.

Pour autant rappelons que les Treg sont issus de la moelle osseuse et que leur migration sanguine est nécessaire avant d'infiltrer leur organe cible, de sorte qu'une détection dans le sang pourrait refléter leur pertinence in situ.

## **Fonction**

Nos résultats posent la question de la fonction des Treg dans le contexte de TP et d'inflammation chronique, qui apparaît d'autant plus difficile à résoudre que leur fonction suppressive n'est pas stable au cours du temps notamment lors de situations inflammatoires chroniques. De plus des études récentes posent l'hypothèse de exFoxP3 pathogènes pouvant être induits au cours de phénomènes d'inflammation chronique.

La plasticité des Treg rend le lien entre Treg circulants et inflammation chronique du greffon pulmonaire difficile à établir simplement. C'est ainsi qu'il faut prendre en compte non seulement la transcription du facteur FoxP3, mais le contexte dans lequel il est présent. Par exemple, il est concevable que tous les Treg produits n'ont pas la même capacité ni la même signification pronostique. Les patients qui présentent un taux important de Treg produits et migrant naturellement, auraient un meilleur pronostic que les patients dont les greffons sont infiltrés par des Treg induits. Par ailleurs, on peut souligner que FoxP3 peut être exprimé par les Treg et, de façon plus récente, par les non-Treg activés (136). Il est ainsi possible que l'augmentation de

l'expression de FoxP3 n'est pas seulement un indicateur de l'activation des Treg, mais soit aussi révélatrice de l'activation transitoire de cellules non-Treg. D'ailleurs des taux faibles d'expression de FoxP3 par des cellules CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> soumises à une activation non spécifique ont été observés *in vitro* (137). De plus, il a été décrit des cellules CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>, activées et exprimant FoxP3, fonctionnellement distinctes de véritables Treg (défaut des capacités suppressives, capacité de production d'IFN $\gamma$ , et TNF $\alpha$ ) (138). Ainsi, chez l'homme, on peut considérer que FoxP3 est un biomarqueur pronostique approprié, sans pour autant éclairer les mécanismes d'action. C'est en ce sens que l'étude de la méthylation du promoteur de FoxP3 prend tout son intérêt (139). En effet des études (140, 141) montrent que l'état de méthylation/déméthylation du promoteur de FoxP3 et des gènes régulateurs associés est strictement régulé, et lié à la fonction des Treg. Par exemple en transplantation rénale, les patients « Tolérants » présentent un taux plus élevé de cellules T avec déméthylation de FoxP3 par rapport aux autres patients (87). La constitution de l'épigénome d'une part et du transcriptome/protéome d'autre part, sont 2 processus complémentaires et synchronisés ayant pour résultat la production de Treg complètement fonctionnels.

Bien que les résultats de la transplantation pulmonaire restent en deçà des autres transplantations d'organes solides, il existe une vraie disparité entre les receveurs, avec une grande proportion de patients présentant heureusement une fonction respiratoire adéquate et durable. De plus en plus de données vont dans le sens de l'importance de la régulation immunologique permettant un meilleur fonctionnement du greffon chez ces patients. Ce concept de régulation n'est probablement pas le résultat de l'action d'un sous-type de population cellulaire, mais probablement une accumulation d'effets complémentaires et synchronisés entre les Treg, les CPA, et les cellules non Treg ayant des capacités régulatrices par leurs capacités de libération d'IL-10.

C'est dans ce contexte que le concept de recherche translationnelle pourrait prendre tout son sens avec le retour au modèle animal, après ces travaux chez l'homme. En effet, un modèle de transplantation pulmonaire orthotopique chez la souris est en cours de développement dans notre équipe (142), et permet de développer un CLAD chez 50% à 70% des souris transplantées, en 14 à 28 jours. Ce modèle, représentant un challenge technique, reste reproductible et mimant la pathologie humaine. De plus il présente de nombreux avantages en terme d'outils génétiques (souris knock-out), et de possibilités d'analyses (pulmonaires, épithéliales...). Ce modèle permettrait de valider les mécanismes de compréhension d'une signature Treg, ou MMP9 (Pain & Royer et al., en révision), ou Breg (Brossaud et al., en préparation) retrouvés chez l'homme. Pour l'analyse des Treg, il contribuerait à affiner la compréhension concernant la fonction et la localisation-migration des cellules au cours du CLAD.



## PERSPECTIVES

Au total, plusieurs pistes peuvent nous permettre de continuer à étudier les Treg en transplantation pulmonaire, en accentuant la recherche sur la compréhension de nos résultats du point de vue de la fonction et de la localisation. Pour cela, l'étude de la déméthylation du promoteur Fox-P3 est déjà en cours, et un modèle de transplantation pulmonaire chez la souris est en développement dans notre équipe. Ces éléments doivent nous permettre de continuer à comprendre les mécanismes régulant les Treg dans le CLAD et de valider un nouveau biomarqueur.

Il serait séduisant d'avoir une signature biologique prédictive du CLAD à la fois dans les cellules circulantes et dans les LBA des patients transplantés pulmonaires, relative aux Treg ou aux chimiokines qui les régulent, afin d'identifier les patients à risque de développer un BOS. Mais une fois une telle signature validée, la question reste de savoir qu'en faire en pratique chez un patient. Cette signature Treg, précoce, présente dans les 6 mois post-transplantation, est-elle simple à appliquer en clinique dans un but de prédiction du BOS ? Ces patients pourraient en effet bénéficier d'un protocole de « désescalade » des immunosuppresseurs ou d'allègement de leur surveillance. En effet, la baisse du traitement immunosuppresseur, chez des patients bien identifiés pourrait améliorer leur survie en baissant l'incidence et la sévérité de complications comme les coronaropathies, syndromes métaboliques, et autres cancers.

D'autre part, que faire chez les patients porteurs d'une signature de mauvais pronostic ? La majorité des patients transplantés pulmonaires sont traités avec 3 immunosuppresseurs (typiquement un inhibiteur de calcineurine, un inhibiteur du cycle cellulaire et la prednisone). Les dosages, notamment de l'inhibiteur de calcineurine, sont souvent plus élevés que dans les transplantations rénales et hépatiques. De plus, l'addition de traitements n'est souvent pas efficace et se fait au prix de l'augmentation de risque d'infection et des conséquences systémiques de ces traitements. On peut supposer que les patients porteurs d'une signature Treg de mauvais pronostic pourront être candidats à des thérapeutiques moins conventionnelles. La photophérèse extracorporelle (PEC) en est un exemple. Cette technique consiste à traiter les PBMC avec un agent intercalant d'ADN et de soumettre les cellules, dans un circuit, aux rayons UV. Ces cellules apoptotiques sont ensuite réinjectées au patient et stimulent des Treg induits (143). Des travaux préliminaires montrent que chez les patients exposés à la PEC la progression de la BO serait ralentie (144).

## IV- BIBLIOGRAPHIE

1. Kotloff RM, Thabut G. Lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;184:159–171.
2. Christie JD, Edwards LB, Kucheryavaya AY, Benden C, Dipchand AI, Dobbels F, Kirk R, Rahmel AO, Stehlik J, Hertz MI, International Society of Heart and Lung Transplantation. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: 29th adult lung and heart-lung transplant report-2012. *J Heart Lung Transplant* 2012;31:1073–1086.
3. Germain RN. MHC-dependent antigen processing and peptide presentation: providing ligands for T lymphocyte activation. *Cell* 1994;76:287–299.
4. Eisenlohr LC, Huang L, Golovina TN. Rethinking peptide supply to MHC class I molecules. *Nat Rev Immunol* 2007;7:403–410.
5. Felix NJ, Allen PM. Specificity of T-cell alloreactivity. *Nat Rev Immunol* 2007;7:942–953.
6. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI. Pathways of major histocompatibility complex allorecognition. *Curr Opin Organ Transplant* 2008;13:438–444.
7. Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 2003;300:337–339.
8. Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, Herrath von MG, Schoenberger SP. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature* 2003;421:852–856.
9. Appay V, Zaunders JJ, Papagno L, Sutton J, Jaramillo A, Waters A, Easterbrook P, Grey P, Smith D, McMichael AJ, Cooper DA, Rowland-Jones SL, Kelleher AD. Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *The Journal of Immunology* 2002;168:5954–5958.
10. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, Barouch DH, McHeyzer-Williams MG, Bell JI, McMichael AJ, Davis MM. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996;274:94–96.
11. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol* 2012;12:191–200.
12. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123–1132.
13. Botturi K, Langelot M, Lair D, Pipet A, Pain M, Chesne J, Hassoun D, Lacoëuille Y, Cavallès A, Magnan A. Preventing asthma exacerbations: what are the targets? *Pharmacol Ther* 2011;131:114–129.
14. Jabeen R, Kaplan MH. The symphony of the ninth: the development and function of Th9 cells. *Curr Opin Immunol* 2012;24:303–307.
15. Tangye SG, Ma CS, Brink R, Deenick EK. The good, the bad and the ugly - TFH cells in human health and disease. *Nat Rev Immunol* 2013;13:412–426.
16. Appay V, Rowland-Jones SL. Lessons from the study of T-cell differentiation in persistent human virus infection. *Semin Immunol* 2004;16:205–212.
17. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GMA, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL. Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 2002;8:379–385.

18. Gamadia LE, van Leeuwen EMM, Remmerswaal EBM, Yong S-L, Surachno S, Wertheim-van Dillen PME, Berge ten IJM, van Lier RAW. The size and phenotype of virus-specific T cell populations is determined by repetitive antigenic stimulation and environmental cytokines. *The Journal of Immunology* 2004;172:6107–6114.
19. Kaech SM, Ahmed R. Memory CD8+ T cell differentiation: initial antigen encounter triggers a developmental program in naïve cells. *Nat Immunol* 2001;2:415–422.
20. van Lier RAW, Berge ten IJM, Gamadia LE. Human CD8(+) T-cell differentiation in response to viruses. *Nat Rev Immunol* 2003;3:931–939.
21. Aandahl EM, Torgersen KM, Taskén K. CD8+ regulatory T cells-A distinct T-cell lineage or a transient T-cell phenotype? *Hum Immunol* 2008;69:696–699.
22. Melenhorst JJ, Scheinberg P, Williams A, Ambrozak DR, Keyvanfar K, Smith M, McCoy JP, Hensel NF, Douek DC, Barrett AJ. Alloreactivity across HLA barriers is mediated by both naïve and antigen-experienced T cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 2011;17:800–809.
23. Macdonald WA, Chen Z, Gras S, Archbold JK, Tynan FE, Clements CS, Bharadwaj M, Kjer-Nielsen L, Saunders PM, Wilce MCJ, Crawford F, Stadinsky B, Jackson D, Brooks AG, Purcell AW, Kappler JW, Burrows SR, Rossjohn J, McCluskey J. T cell allorecognition via molecular mimicry. *Immunity* 2009;31:897–908.
24. Bharat A, Mohanakumar T. Allopeptides and the alloimmune response. *Cell Immunol* 2007;248:31–43.
25. Bharat A, Narayanan K, Street T, Fields RC, Steward N, Aloush A, Meyers B, Schuessler R, Trulock EP, Patterson GA, Mohanakumar T. Early posttransplant inflammation promotes the development of alloimmunity and chronic human lung allograft rejection. *Transplantation Journal* 2007;83:150–158.
26. Kreisel D, Krupnick AS, Gelman AE, Engels FH, Popma SH, Krasinskas AM, Balsara KR, Szeto WY, Turka LA, Rosengard BR. Non-hematopoietic allograft cells directly activate CD8+ T cells and trigger acute rejection: an alternative mechanism of allorecognition. *Nat Med* 2002;8:233–239.
27. Herrera OB, Golshayan D, Tibbott R, Salcido Ochoa F, James MJ, Marelli-Berg FM, Lechler RI. A novel pathway of alloantigen presentation by dendritic cells. *The Journal of Immunology* 2004;173:4828–4837.
28. Seung E, Cho JL, Sparwasser T, Medoff BD, Luster AD. Inhibiting CXCR3-dependent CD8+ T cell trafficking enhances tolerance induction in a mouse model of lung rejection. *J Immunol* 2011;186:6830–6838.
29. Wolfe RA, Roys EC, Merion RM. Trends in Organ Donation and Transplantation in the United States, 1999-2008. *American Journal of Transplantation* 2010;10:961–972.
30. Sato M. Chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation: the moving target. *Gen Thorac Cardiovasc Surg* 2012;61:67–78.
31. Saggar R, Ross DJ, Saggar R, Zisman DA, Gregson A, Lynch JP III, Keane MP, Weigt SS, Ardehali A, Kubak B, Lai C, Elashoff D, Fishbein MC, Wallace WD, Belperio JA. Pulmonary Hypertension Associated with Lung Transplantation Obliterative Bronchiolitis and Vascular Remodeling of the Allograft. *American Journal of Transplantation* 2008;8:1921–1930.
32. Trulock EP, Christie JD, Edwards LB, Boucek MM, Aurora P, Taylor DO, Dobbels F, Rahmel AO, Keck BM, Hertz MI. Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty-fourth official adult lung and heart-lung transplantation report-2007. *J Heart Lung Transplant* 2007;26:782–795.
33. Verleden GM, Raghu G, Meyer KC, Glanville AR, Corris P. A new classification system for chronic lung allograft dysfunction. *J Heart Lung Transplant* 2014;33:127–

- 133.
34. IMR\_1009 39..48. 2011;1–10.
35. Palmer SM, Burch LH, Trindade AJ, Davis RD, Herczyk WF, Reinsmoen NL, Schwartz DA. Innate immunity influences long-term outcomes after human lung transplant. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:780–785.
36. Kastelijn EA, van Moorsel CHM, Rijkers GT, Ruven HJT, Karthaus V, Kwakkel-van Erp JM, van de Graaf EA, Zanen P, van Kessel DA, Grutters JC, van den Bosch JMM. Polymorphisms in innate immunity genes associated with development of bronchiolitis obliterans after lung transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2010;29:665–671.
37. Witt CA, Meyers BF, Hachem RR. Pulmonary infections following lung transplantation. *Thorac Surg Clin* 2012;22:403–412.
38. Solé A, Morant P, Salavert M, Pemán J, Morales P, Valencia Lung Transplant Group. Aspergillus infections in lung transplant recipients: risk factors and outcome. *Clin Microbiol Infect* 2005;11:359–365.
39. Khalifah AP, Hachem RR, Chakinala MM, Schechtman KB, Patterson GA, Schuster DP, Mohanakumar T, Trulock EP, Walter MJ. Respiratory viral infections are a distinct risk for bronchiolitis obliterans syndrome and death. *Am J Respir Crit Care Med* 2004;170:181–187.
40. Weigt SS, Elashoff RM, Huang C, Ardehali A, Gregson AL, Kubak B, Fishbein MC, Saggar R, Keane MP, Lynch JP, Zisman DA, Ross DJ, Belperio JA. Aspergillus colonization of the lung allograft is a risk factor for bronchiolitis obliterans syndrome. *Am J Transplant* 2009;9:1903–1911.
41. Botha P, Archer L, Anderson RL, Lordan J, Dark JH, Corris PA, Gould K, Fisher AJ. Pseudomonas aeruginosa colonization of the allograft after lung transplantation and the risk of bronchiolitis obliterans syndrome. *Transplantation Journal* 2008;85:771–774.
42. Bauer RN, Diaz-Sanchez D, Jaspers I. Effects of air pollutants on innate immunity: The role of Toll-like receptors and nucleotide-binding oligomerization domain–like receptors. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2012;129:14–24.
43. Bhinder S, Chen H, Sato M, Copes R, Evans GJ, Chow C-W, Singer LG. Air pollution and the development of posttransplant chronic lung allograft dysfunction. *Am J Transplant* 2014;14:2749–2757.
44. Thabut G, Mal H, Cerrina J, Darteville P, Dromer C, Velly J-F, Stern M, Loirat P, Lesèche G, Bertocchi M, Mornex J-F, Haloun A, Despins P, Pison C, Blin D, Reynaud-Gaubert M. Graft Ischemic Time and Outcome of Lung Transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;171:786–791.
45. Ioannidis I, Ye F, McNally B, Willette M, Flano E. Toll-Like Receptor Expression and Induction of Type I and Type III Interferons in Primary Airway Epithelial Cells. *Journal of Virology* 2013;87:3261–3270.
46. Lambrecht BN, Hammad H. The airway epithelium in asthma. *Nat Med* 2012;18:684–692.
47. Whitsett JA, Alenghat T. Respiratory epithelial cells orchestrate pulmonary innate immunity. *Nat Immunol* 2015;16:27–35.
48. Jaramillo A, Smith CR, Maruyama T, Zhang L, Patterson GA, Mohanakumar T. Anti-HLA class I antibody binding to airway epithelial cells induces production of fibrogenic growth factors and apoptotic cell death: a possible mechanism for bronchiolitis obliterans syndrome. *Hum Immunol* 2003;64:521–529.
49. Elssner A, Jaumann F, Dobmann S, Behr J, Schwaiblmair M, Reichenspurner H, Fürst H, Briegel J, Vogelmeier C. Elevated levels of interleukin-8 and transforming

- growth factor-beta in bronchoalveolar lavage fluid from patients with bronchiolitis obliterans syndrome: proinflammatory role of bronchial epithelial cells. Munich Lung Transplant Group. *Transplantation* 2000;70:362–367.
50. Borthwick LA, Sunny SS, Oliphant V, Perry J, Brodlie M, Johnson GE, Ward C, Gould K, Corris PA, De Soyza A, Fisher AJ. *Pseudomonas aeruginosa* accentuates epithelial-to-mesenchymal transition in the airway. *Eur Respir J* 2011;37:1237–1247.
  51. Shino MY, Weigt SS, Li N, Palchevskiy V, Derhovanessian A, Saggar R, Sayah DM, Gregson AL, Fishbein MC, Ardehali A, Ross DJ, Lynch JP III, Elashoff RM, Belperio JA. CXCR3 Ligands Are Associated with the Continuum of Diffuse Alveolar Damage to Chronic Lung Allograft Dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;188:1117–1125.
  52. Devouassoux G, Drouet C, Pin I, Brambilla C, Brambilla E, Colle P-E, Pison C. Alveolar neutrophilia is a predictor for the bronchiolitis obliterans syndrome, and increases with degree of severity. *Transpl Immunol* 2002;10:303–310.
  53. Beeh KM, Kornmann O, Lill J, Buhl R. Induced sputum cell profiles in lung transplant recipients with or without chronic rejection: correlation with lung function. *Thorax* 2001;56:557–560.
  54. Devouassoux G, Pison C, Drouet C, Pin I, Brambilla C, Brambilla E. Early lung leukocyte infiltration, HLA and adhesion molecule expression predict chronic rejection. *Transpl Immunol* 2001;8:229–236.
  55. Mamessier E, Lorec A-M, Thomas P, Badier M, Magnan A, Reynaud-Gaubert M. T Regulatory Cells in Stable Posttransplant Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *Transplantation Journal* 2007;84:908–916.
  56. Yates B, Murphy DM, Forrest IA, Ward C, Rutherford RM, Fisher AJ, Lordan JL, Dark JH, Corris PA. Azithromycin Reverses Airflow Obstruction in Established Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 2005;172:772–775.
  57. Hodge G, Hodge S, Holmes-Liew C-L, Reynolds PN, Holmes M. Bronchiolitis obliterans syndrome is associated with increased peripheral blood natural killer and natural killer T-like granzymes, perforin, and T-helper-type 1 pro-inflammatory cytokines. *J Heart Lung Transplant* 2012;31:888–895.
  58. Colvin RB, Smith RN. Antibody-mediated organ-allograft rejection. *Nat Rev Immunol* 2005;5:807–817.
  59. Cao G, Lu Y, Gao R, Xin Y, Teng D, Wang J, Li Y. Expression of Fractalkine, CX3CR1, and Vascular Endothelial Growth Factor in Human Chronic Renal Allograft Rejection. *Transplant Proc* 2006;38:1998–2000.
  60. Borchers MT, Harris NL, Wesselkamper SC, Zhang S, Chen Y, Young L, Lau GW. The NKG2D-activating receptor mediates pulmonary clearance of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect Immun* 2006;74:2578–2586.
  61. Trapani JA, Smyth MJ. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2002;2:735–747.
  62. Fildes JE, Yonan N, Tunstall K, Walker AH, Griffiths-Davies L, Bishop P, Leonard CT. Natural Killer Cells in Peripheral Blood and Lung Tissue Are Associated With Chronic Rejection After Lung Transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2008;27:203–207.
  63. Oyaizu T, Okada Y, Shoji W, Matsumura Y, Shimada K, Sado T, Sato M, Kondo T. Reduction of recipient macrophages by gadolinium chloride prevents development of obliterative airway disease in a rat model of heterotopic tracheal transplantation. *Transplantation Journal* 2003;76:1214–1220.
  64. Verleden SE, Ruttens D, Vandermeulen E, Van Raemdonck DE, Vanaudenaerde BM, Verleden GM, Vos R. Elevated bronchoalveolar lavage eosinophilia correlates with

- poor outcome after lung transplantation. *Transplantation* 2014;97:83–89.
65. Magnan A, Mege JL, Reynaud M, Thomas P, Capo C, Garbe L, Meric B, Badier M, Bongrand P, Viard L. Monitoring of alveolar macrophage production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in lung transplant recipients. Marseille and Montreal Lung Transplantation Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:684–689.
  66. Magnan A, Mege JL, Escallier JC, Brisse J, Capo C, Reynaud M, Thomas P, Meric B, Garbe L, Badier M, Viard L, Bongrand P, Giudicelli R, Metras D, Fuentes P, Vervloet D, Noirclerc M. Balance between alveolar macrophage IL-6 and TGF-beta in lung-transplant recipients. Marseille and Montréal Lung Transplantation Group. *Am J Respir Crit Care Med* 1996;153:1431–1436.
  67. Mamessier E, Thomas P, Magnan A, Reynaud-Gaubert M. Activation des lymphocytes T de l'expectoration induite et du lavage broncho-alveolaire de patients transplantés pulmonaires. *Revue des Maladies Respiratoires* 2006;23:98.
  68. Hodge G, Hodge S, Chambers D, Reynolds PN, Holmes M. Bronchiolitis Obliterans Syndrome Is Associated With Absence of Suppression of Peripheral Blood Th1 Proinflammatory Cytokines. *Transplantation Journal* 2009;88:211–218.
  69. Brugière O, Thabut G, Krawice I, Carosella E, Rouas-Freiss N. Role of HLA-G Expression as a Predictive Marker of a Low Risk of Bronchiolitis Obliterans Syndrome in Lung Transplant Recipients: A 3-Year Prospective Study. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2013;32:S168.
  70. Chalermkulrat W, Neuringer IP, Schmitz JL, Catellier DJ, Gurka MJ, Randell SH, Aris RM. Human Leukocyte Antigen Mismatches Predispose to the Severity of Bronchiolitis Obliterans Syndrome After Lung Transplantation. *Chest* 2003;123:1825–1831.
  71. Braun RK, Meyer KC, Burlingham WJ. The Role of Autoimmunity in the Pathogenesis of Obliterative Bronchiolitis. *Bronchiolitis Obliterans Syndrome in Lung Transplantation* New York, NY: Springer New York; 2013. pp. 183–198. doi:10.1007/978-1-4614-7636-8\_10.
  72. Jaramillo A, Smith MA, Phelan D, Sundaresan S, Trulock EP, Lynch JP, Cooper JD, Patterson GA, Mohanakumar T. Development of ELISA-detected anti-HLA antibodies precedes the development of bronchiolitis obliterans syndrome and correlates with progressive decline in pulmonary function after lung transplantation. *Transplantation Journal* 1999;67:1155–1161.
  73. Roux A, Bendib Le Lan I, Holifanjaniaina S, Thomas KA, Hamid AM, Picard C, Grenet D, De Miranda S, Douvry B, Beaumont-Azuar L, Sage E, Devaquet J, Cuquemelle E, Le Guen M, Spreafico R, Suberbielle-Boissel C, Stern M, Parquin F, the Foch Lung Transplantation Group. Antibody-Mediated Rejection in Lung Transplantation: Clinical Outcomes and Donor-Specific Antibody Characteristics. *Am J Transplant* 2016;16:1216–1228.
  74. Baskaran G, Tiriveedhi V, Ramachandran S, Aloush A, Grossman B, Hachem R, Mohanakumar T. Efficacy of extracorporeal photopheresis in clearance of antibodies to donor-specific and lung-specific antigens in lung transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2014;33:950–956.
  75. Hachem RR, Tiriveedhi V, Patterson GA, Aloush A, Trulock EP, Mohanakumar T. Antibodies to K- $\alpha$  1 Tubulin and Collagen V Are Associated With Chronic Rejection After Lung Transplantation. *American Journal of Transplantation* 2012;12:2164–2171.
  76. Howie AJ. The association among C4d staining in renal transplant biopsies, the production of donor-specific HLA antibodies, and graft outcome. *Transplantation*

- Journal* 2007;83:373–374.
77. Royer P-J, Olivera-Botello G, Koutsokera A, Aubert J-D, Bernasconi E, Tissot A, Pison C, Nicod L, Boissel J-P, Magnan A. Chronic Lung Allograft Dysfunction. *Transplantation Journal* 2016;1–12.doi:10.1097/TP.0000000000001215.
  78. Cherai M, Hamel Y, Baillou C, Touil S, Guillot-Delost M, Charlotte F, Kossir L, Simonin G, Maury S, Cohen JL, Lemoine FM. Generation of Human Alloantigen-Specific Regulatory T Cells Under Good Manufacturing Practice-Compliant Conditions for Cell Therapy. *Cell Transplant* 2015;24:2527–2540.
  79. Rossetti M, Spreafico R, Saidin S, Chua C, Moshref M, Leong JY, Tan YK, Thumboo J, van Loosdregt J, Albani S. Ex vivo-expanded but not in vitro-induced human regulatory T cells are candidates for cell therapy in autoimmune diseases thanks to stable demethylation of the FOXP3 regulatory T cell-specific demethylated region. *J Immunol* 2015;194:113–124.
  80. Lee H, Lee H, Kwon Y, Lee J-H, Kim J, Shin M-K, Kim S-H, Bae H. Methyl gallate exhibits potent antitumor activities by inhibiting tumor infiltration of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2010;185:6698–6705.
  81. Chang S-Y, Kim Y-J, Ko H-J. Potential therapeutic anti-tumor effect of a Salmonella-based vaccine. *Hum Vaccin Immunother* 2013;9:1654–1660.
  82. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057–1061.
  83. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330–336.
  84. Hill JA, Feuerer M, Tash K, Haxhinasto S, Perez J, Melamed R, Mathis D, Benoist C. Foxp3 transcription-factor-dependent and -independent regulation of the regulatory T cell transcriptional signature. *Immunity* 2007;27:786–800.
  85. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature* 2007;445:771–775.
  86. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochoy G, Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity* 2009;30:899–911.
  87. Braza F, Dugast E, Panov I, Paul C, Vogt K, Pallier A, Chesneau M, Baron D, Guerif P, Lei H, Laplaud D-A, Volk H-D, Degauque N, Giral M, Soulillou J-P, Sawitzki B, Brouard S. Central Role of CD45RA- Foxp3hi Memory Regulatory T Cells in Clinical Kidney Transplantation Tolerance. *Journal of the American Society of Nephrology* 2015;26:1795–1805.
  88. Schmidl C, Hansmann L, Lassmann T, Balwierz PJ, Kawaji H, Itoh M, Kawai J, Nagao-Sato S, Suzuki H, Andreesen R, Hayashizaki Y, Forrest ARR, Carninci P, Hoffmann P, Edinger M, Rehli M, FANTOM consortium. The enhancer and promoter landscape of human regulatory and conventional T-cell subpopulations. *Blood* 2014;123:e68–78.
  89. Sanchez Rodriguez R, Pauli ML, Neuhaus IM, Yu SS, Arron ST, Harris HW, Yang SH-Y, Anthony BA, Sverdrup FM, Krow-Lucal E, Mackenzie TC, Johnson DS, Meyer EH, Löhr A, Hsu A, Koo J, Liao W, Gupta R, Debbaneh MG, Butler D, Huynh M, Levin EC, Leon A, Hoffman WY, McGrath MH, Alvarado MD, Ludwig CH, Truong H-A, Maurano MM, *et al.* Memory regulatory T cells reside in human skin. *J Clin Invest* 2014;124:1027–1036.
  90. Schaier M, Seissler N, Schmitt E, Meuer S, Hug F, Zeier M, Steinborn A.

- DRhigh+CD45RA--Tregs Potentially Affect the Suppressive Activity of the Total Treg Pool in Renal Transplant Patients. In: Gregson A, editor. *PLoS ONE* 2012;7:e34208.
91. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:490–500.
  92. Braza F, Durand M, Degauque N, Brouard S. Regulatory T Cells in Kidney Transplantation: New Directions? *American Journal of Transplantation* 2015;15:2288–2300.
  93. Brouard S, Pallier A, Renaudin K, Foucher Y, Danger R, Devys A, Cesbron A, Guillot-Guegen C, Ashton-Chess J, Le Roux S, Harb J, Roussey G, Subra J-F, Villemain F, Legendre C, Bemelman FJ, Orlando G, Garnier A, Jambon H, Le Monies De Sagazan H, Braun L, Noël C, Pillebout E, Moal M-C, Cantarell C, Hoitsma A, Ranbant M, Testa A, Souillou J-P, *et al.* The natural history of clinical operational tolerance after kidney transplantation through twenty-seven cases. *Am J Transplant* 2012;12:3296–3307.
  94. Bettini M, Vignali DAA. Regulatory T cells and inhibitory cytokines in autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 2009;21:612–618.
  95. Schubert D, Bode C, Kenefeck R, Hou TZ, Wing JB, Kennedy A, Bulashevskaya A, Petersen B-S, Schäffer AA, Grüning BA, Unger S, Frede N, Baumann U, Witte T, Schmidt RE, Dueckers G, Niehues T, Seneviratne S, Kanariou M, Speckmann C, Ehl S, Rensing-Ehl A, Warnatz K, Rakhmanov M, Thimme R, Hasselblatt P, Emmerich F, Cathomen T, Backofen R, *et al.* Autosomal dominant immune dysregulation syndrome in humans with CTLA4 mutations. *Nat Med* 2014;20:1410–1416.
  96. Fletcher JM, Lonergan R, Costelloe L, Kinsella K, Moran B, O'Farrelly C, Tubridy N, Mills KHG. CD39+Foxp3+ Regulatory T Cells Suppress Pathogenic Th17 Cells and Are Impaired in Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology* 2009;183:7602–7610.
  97. Simpson E. Special regulatory T-cell review: Regulation of immune responses--examining the role of T cells. *Immunology* 2008;123:13–16.
  98. Sojka DK, Huang Y-H, Fowell DJ. Mechanisms of regulatory T-cell suppression - a diverse arsenal for a moving target. *Immunology* 2008;124:13–22.
  99. Ernst PB, Garrison JC, Thompson LF. Much ado about adenosine: adenosine synthesis and function in regulatory T cell biology. *J Immunol* 2010;185:1993–1998.
  100. Beier UH, Angelin A, Akimova T, Wang L, Liu Y, Xiao H, Koike MA, Hancock SA, Bhatti TR, Han R, Jiao J, Veasey SC, Sims CA, Baur JA, Wallace DC, Hancock WW. Essential role of mitochondrial energy metabolism in Foxp3+ T-regulatory cell function and allograft survival. *FASEB J* 2015;29:2315–2326.
  101. Zhou W, Zhou X, Gaowa S, Meng Q, Zhan Z, Liu J, Li J, Fan H, Liu Z. The Critical Role of Induced CD4+ FoxP3+ Regulatory Cells in Suppression of Interleukin-17 Production and Attenuation of Mouse Orthotopic Lung Allograft Rejection. *Transplantation Journal* 2015;99:1356–1364.
  102. Kleinewietfeld M, Hafler DA. The plasticity of human Treg and Th17 cells and its role in autoimmunity. *Semin Immunol* 2013;25:305–312.
  103. Akimova T, Eruslanov EB, Bhojnagarwala PS, Quatromoni JG, Morgen J, Singhal S, Albelda SM, Hancock WW. Abstract 1291: Tumor-infiltrating FOXP3+ T-regulatory (Treg) cells in early-stage human lung cancer exhibit enhanced suppressive function when compared to blood or lymph node (LN) Treg cells. *Cancer Res* 2015;75:1291–1291.
  104. Lemaître PH, Vokaer B, Charbonnier L-M, Iwakura Y, Field KA, Estenne M, Goldman M, Leo O, Remmelink M, Le Moine A. Cyclosporine A drives a Th17- and



- Th2-mediated posttransplant obliterative airway disease. *Am J Transplant* 2013;13:611–620.
105. Juvet SC, Whatcott AG, Bushell AR, Wood KJ. Harnessing regulatory T cells for clinical use in transplantation: the end of the beginning. *Am J Transplant* 2014;14:750–763.
  106. Vandermeulen E, Verleden SE, Ruttens D, Bellon H, Somers J, Van Raemdonck DE, Dupont LJ, Schols D, Vos R, Verleden GM, Vanaudenaerde BM. The Role of B-Cells in Phenotypes of Chronic Lung Allograft Dysfunction. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* 2015;34:S29.
  107. Nath DS, Basha HI, Mohanakumar T. Antihuman leukocyte antigen antibody-induced autoimmunity: role in chronic rejection. *Curr Opin Organ Transplant* 2010;15:16–20.
  108. Angaswamy N, Saini D, Ramachandran S, Nath DS, Phelan D, Hachem R, Trulock E, Patterson GA, Mohanakumar T. Development of antibodies to human leukocyte antigen precedes development of antibodies to major histocompatibility class I-related chain A and are significantly associated with development of chronic rejection after human lung transplantation. *Hum Immunol* 2010;71:560–565.
  109. Angaswamy N, Tiriveedhi V, Sarma NJ, Subramanian V, Klein C, Wellen J, Shenoy S, Chapman WC, Mohanakumar T. Interplay between immune responses to HLA and non-HLA self-antigens in allograft rejection. *Hum Immunol* 2013;74:1478–1485.
  110. Martinu T, Pavlisko EN, Chen D-F, Palmer SM. Acute Allograft Rejection: Cellular and Humoral Processes. *Clin Chest Med* 2011;32:295–310.
  111. Verleden SE, Sacreas A, Vos R, Vanaudenaerde BM, Verleden GM. Advances in Understanding Bronchiolitis Obliterans after lung transplantation. *Chest* 2016;1–19.doi:10.1016/j.chest.2016.04.014.
  112. Janeway CA, Sharrow SO, Simpson E. T-cell populations with different functions. *Nature* 1975;253:544–546.
  113. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *The Journal of Immunology* 1995;155:1151–1164.
  114. Hall BM. Specific unresponsiveness in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. III. Further characterization of the CD4+ suppressor cell and its mechanisms of action. *J Exp Med* 1990;171:141–157.
  115. Khattri R, Cox T, Yasayko S-A, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat Immunol* 2003;4:337–342.
  116. Benoist C, Mathis D. Treg cells, life history, and diversity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2012;4:a007021–a007021.
  117. Duhon T, Duhon R, Lanzavecchia A, Sallusto F, Campbell DJ. Functionally distinct subsets of human FOXP3+ Treg cells that phenotypically mirror effector Th cells. *Blood* 2012;119:4430–4440.
  118. Campbell DJ, Koch MA. Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2011;11:119–130.
  119. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *The Journal of Immunology* 2001;167:1245–1253.
  120. Lund JM, Hsing L, Pham TT, Rudensky AY. Coordination of early protective immunity to viral infection by regulatory T cells. *Science* 2008;320:1220–1224.
  121. Gregson AL, Hoji A, Palchevskiy V, Hu S, Weigt SS, Liao E, Derhovanessian A, Saggat R, Song S, Elashoff R, Yang OO, Belperio JA. Protection against Bronchiolitis Obliterans Syndrome Is Associated with Allograft CCR7+CD45RA– T

- Regulatory Cells. In: Feghali-Bostwick C, editor. *PLoS ONE* 2010;5:e11354–10.
122. Köksoy S, Elpek KG, Yolcu ES, Shirwan H. Tolerance to rat heart grafts induced by intrathymic immunomodulation is mediated by indirect recognition primed CD4+CD25+ Treg cells. *Transplantation Journal* 2005;79:1492–1497.
123. Bhorade SM, Chen H, Molinero L, Liao C, Garrity ER, Vigneswaran WT, Shilling R, Sperling A, Chong A, Alegre M-L. Decreased Percentage of CD4+FoxP3+ Cells in Bronchoalveolar Lavage From Lung Transplant Recipients Correlates With Development of Bronchiolitis Obliterans Syndrome. *Transplantation Journal* 2010;90:540–546.
124. Neujahr DC, Cardona AC, Ulukpo O, Rigby M, Pelaez A, Ramirez A, Gal AA, Force SD, Lawrence EC, Kirk AD, Larsen CP. Dynamics of Human Regulatory T Cells in Lung Lavages of Lung Transplant Recipients. *Transplantation Journal* 2009;88:521–527.
125. Greenland JR, Wong CM, Ahuja R, Wang AS, Uchida C, Golden JA, Hays SR, Leard LE, Rajalingam R, Singer JP, Kukreja J, Wolters PJ, Caughey GH, Tang Q. Donor-Reactive Regulatory T Cell Frequency Increases During Acute Cellular Rejection of Lung Allografts. *Transplantation Journal* 2016;100:2090–2098.
126. Weiss ES, Nwakanma LU, Russell SB, Conte JV, Shah AS. Outcomes in bicaval versus biatrial techniques in heart transplantation: an analysis of the UNOS database. *J Heart Lung Transplant* 2008;27:178–183.
127. Meloni F, Vitulo P, Bianco AM, Paschetto E, Morosini M, Cascina A, Mazzucchelli I, Ciardelli L, Oggionni T, Fietta AM, Pozzi E, Vigan M. Regulatory CD4+CD25+ T cells in the peripheral blood of lung transplant recipients: correlation with transplant outcome. *Transplantation Journal* 2004;77:762–766.
128. Bailey-Bucktrout SL, Martinez-Llordella M, Zhou X, Anthony B, Rosenthal W, Luche H, Fehling HJ, Bluestone JA. Self-antigen-driven activation induces instability of regulatory T cells during an inflammatory autoimmune response. *Immunity* 2013;39:949–962.
129. Ray K. Experimental arthritis: Tipping the balance: conversion of Foxp3+ T cells to TH17 cells is crucial in autoimmune arthritis. *Nature Reviews Rheumatology* 2014;10:63–63.
130. Zhou X, Bailey-Bucktrout SL, Jeker LT, Penaranda C, Martinez-Llordella M, Ashby M, Nakayama M, Rosenthal W, Bluestone JA. Instability of the transcription factor Foxp3 leads to the generation of pathogenic memory T cells in vivo. *Nat Immunol* 2009;10:1000–1007.
131. Degauque N, Mariat C, Kenny J, Zhang D, Gao W, Vu MD, Alexopoulos S, Oukka M, Umetsu DT, DeKruyff RH, Kuchroo V, Zheng XX, Strom TB. Immunostimulatory Tim-1-specific antibody deprograms Tregs and prevents transplant tolerance in mice. *J Clin Invest* 2008;118:735–741.
132. Vu MD, Xiao X, Gao W, Degauque N, Chen M, Kroemer A, Killeen N, Ishii N, Chang Li X. OX40 costimulation turns off Foxp3+ Tregs. *Blood* 2007;110:2501–2510.
133. Thaunat O, Graff-Dubois S, Fabien N, Duthey A, Attuil-Audenis V, Nicoletti A, Patey N, Morelon E. A stepwise breakdown of B-cell tolerance occurs within renal allografts during chronic rejection. *Kidney Int* 2012;81:207–219.
134. Bestard O, Cruzado JM, Rama I, Torras J, Gomà M, Serón D, Moreso F, Gil-Vernet S, Grinyó JM. Presence of FoxP3+ regulatory T Cells predicts outcome of subclinical rejection of renal allografts. *Journal of the American Society of Nephrology* 2008;19:2020–2026.
135. Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, Hartono C, Li

- B, Sharma VK, Seshan SV, Kapur S, Hancock WW, Schwartz JE, Suthanthiran M. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005;353:2342–2351.
136. Kmiecik M, Gowda M, Graham L, Godder K, Bear HD, Marincola FM, Manjili MH. Human T cells express CD25 and Foxp3 upon activation and exhibit effector/memory phenotypes without any regulatory/suppressor function. *J Transl Med* 2009;7:89.
  137. Gavin MA, Torgerson TR, Houston E, DeRoos P, Ho WY, Stray-Pedersen A, Ocheltree EL, Greenberg PD, Ochs HD, Rudensky AY. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:6659–6664.
  138. Wang J, Ioan-Facsinay A, van der Voort EIH, Huizinga TWJ, Toes REM. Transient expression of FOXP3 in human activated nonregulatory CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 2007;37:129–138.
  139. Janson PCJ, Winerdal ME, Marits P, Thörn M, Ohlsson R, Winqvist O. FOXP3 promoter demethylation reveals the committed Treg population in humans. In: Joly E, editor. *PLoS ONE* 2008;3:e1612.
  140. Hippen KL, Riley JL, June CH, Blazar BR. Clinical perspectives for regulatory T cells in transplantation tolerance. *Semin Immunol* 2011;23:462–468.
  141. Wang L, Liu Y, Beier UH, Han R, Bhatti TR, Akimova T, Hancock WW. Foxp3+ T-regulatory cells require DNA methyltransferase 1 expression to prevent development of lethal autoimmunity. *Blood* 2013;121:3631–3639.
  142. Jungraithmayr W, Codarri L, Bouchaud G, Krieg C, Boyman O, Gyölvézi G, Becher B, Weder W, Münz C. Cytokine complex-expanded natural killer cells improve allogeneic lung transplant function via depletion of donor dendritic cells. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:1349–1359.
  143. Maeda A, Schwarz A, Kernebeck K, Gross N, Aragane Y, Peritt D, Schwarz T. Intravenous infusion of syngeneic apoptotic cells by photopheresis induces antigen-specific regulatory T cells. *The Journal of Immunology* 2005;174:5968–5976.
  144. Morrell MR, Despotis GJ, Lublin DM, Patterson GA, Trulock EP, Hachem RR. The efficacy of photopheresis for bronchiolitis obliterans syndrome after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2010;29:424–431.
  145. Nagendran M, Maruthappu M, Sugand K. Should double lung transplant be performed with or without cardiopulmonary bypass? *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery* 2011;12:799–804.
  146. McRae K. Con: lung transplantation should not be routinely performed with cardiopulmonary bypass. *YJCAN* 2000;14:746–750.
  147. Diamond JM, Lee JC, Kawut SM, Shah RJ, Localio AR, Bellamy SL, Lederer DJ, Cantu E, Kohl BA, Lama VN, Bhorade SM, Crespo M, Demissie E, Sonett J, Wille K, Orens J, Shah AS, Weinacker A, Arcasoy S, Shah PD, Wilkes DS, Ware LB, Palmer SM, Christie JD, Lung Transplant Outcomes Group. Clinical risk factors for primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;187:527–534.
  148. Hayes D, Galantowicz M, Yates AR, Preston TJ, Mansour HM, McConnell PI. Venovenous ECMO as a bridge to lung transplant and a protective strategy for subsequent primary graft dysfunction. *J Artif Organs* 2013;16:382–385.
  149. Anile M, Diso D, Russo E, Patella M, Carillo C, Pecoraro Y, Onorati I, Pugliese F, Ruberto F, De Giacomo T, Angioletti D, Mantovani S, Mazzesi G, Frati G, Rendina EA, Venuta F. Extracorporeal Membrane Oxygenation as Bridge to Lung Transplantation. *TPS* 2013;45:2621–2623.

150. Lafarge M, Mordant P, Thabut G, Brouchet L, Falcoz P-E, Haloun A, Le Pimpec-Barthes F, Maury J-M, Reynaud-Gaubert M, Saint-Raymond C, Sage E, Stern M, Thomas P, Castier Y, Dorent R, Mal H. Experience of extracorporeal membrane oxygenation as a bridge to lung transplantation in France. *Journal of Heart and Lung Transplantation* 2013;32:905–913.
151. MD JJMDBMAIMMJMMLMKBMSAMJSMMB, MD DB, MS AIM, MD JJ, MSE ML, MD KB, MD SA, MD JS, MD MB. Extracorporeal membrane oxygenation as a bridge to lung transplantation and recovery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;144:716–721.
152. Szeto WY, Kreisel D, Karakousis GC, Pochettino A, Sterman DH, Kotloff RM, Arcasoy SM, Zisman DA, Blumenthal NP, Gallop RJ, Kaiser LR, Bavaria JE, Rosengard BR. Cardiopulmonary bypass for bilateral sequential lung transplantation in patients with chronic obstructive pulmonary disease without adverse effect on lung function or clinical outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2002;124:241–249.
153. Pochettino A, Augoustides JGT, Kowalchuk DA, Watcha SM, Cowie D, Jobes DR. Cardiopulmonary bypass for lung transplantation in cystic fibrosis: pilot evaluation of perioperative outcome. *YJCAN* 2007;21:208–211.
154. Dalibon N, Geffroy A, Moutafis M, Vinatier I, Bonnette P, Stern M, Loirat P, Bisson A, Fischler M. Use of cardiopulmonary bypass for lung transplantation: a 10-year experience. *YJCAN* 2006;20:668–672.
155. Shigemura N, Scلابassi RJ, Bhama JK, Gries CJ, Crespo MM, Johnson B, Pilewski JM, Bermudez CA. Early major neurologic complications after lung transplantation: incidence, risk factors, and outcome. *Transplantation* 2013;95:866–871.
156. Bittner HB, Binner C, Lehmann S, Kuntze T, Rastan A, Mohr FW. Replacing cardiopulmonary bypass with extracorporeal membrane oxygenation in lung transplantation operations. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007;31:462–7– discussion 467.
157. Toyoda Y, Bhama JK, Shigemura N, Zaldonis D, Pilewski J, Crespo M, Bermudez C. Efficacy of extracorporeal membrane oxygenation as a bridge to lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2013;145:1065–70– discussion 1070–1.
158. Bermudez CA, Rocha RV, Zaldonis D, Bhama JK, Crespo MM, Shigemura N, Pilewski JM, Sappington PL, Boujoukos AJ, Toyoda Y. Extracorporeal membrane oxygenation as a bridge to lung transplant: midterm outcomes. *The Annals of Thoracic Surgery* 2011;92:1226–31– discussion 1231–2.
159. Rozé H, Sigonne R, Barandon L, Jougon J, Ouattara A. [Place of traditional CBP in bipulmonary transplantation]. *Ann Fr Anesth Reanim* 2012;31 Suppl 1:S8–11.
160. Aigner C, Wisser W, Taghavi S, Lang G, Jaksch P, Czyzewski D, Klepetko W. Institutional experience with extracorporeal membrane oxygenation in lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg* 2007;31:468–73– discussion 473–4.
161. MD FI, MD CK, MD IT, MD WS, MD MA, MD DB, MD TF, MD JG, MD MH, MD AH, MD GW. Lung transplantation on cardiopulmonary support: venoarterial extracorporeal membrane oxygenation outperformed cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2012;144:1510–1516.

## **V- ANNEXE: ETUDE DES DONNEES CLINIQUES DE COLT, Résultats des assistances circulatoires per-opératoire en transplantation pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose**

### **Outcomes of Extra-Corporeal support in Bilateral lung transplantation for cystic fibrosis in frame of the COLT cohort**

Ph.Lacoste<sup>1</sup>, A.Roux<sup>2</sup>, P.A.Thomas<sup>3</sup>, M.Reynaud-Gaubert<sup>3</sup>, A.Olland<sup>4</sup>, C.Dromer<sup>5</sup>, F.Philit<sup>6</sup>, V.Boussaud<sup>7</sup>, J.Claustre<sup>8</sup>, A.Magnan<sup>1</sup>, E.Sage<sup>2</sup> and the COLT consortium

<sup>1</sup> CHU Nantes - Institut du thorax- France / [philippe.lacoste@chu-nantes.fr](mailto:philippe.lacoste@chu-nantes.fr)

<sup>2</sup> Hospital Foch – Suresnes - France / [e.sage@hopital-foch.org](mailto:e.sage@hopital-foch.org), [a.roux@hopital-foch.org](mailto:a.roux@hopital-foch.org)

<sup>3</sup> Hopital Nord – CHU Marseille – France / [PascalAlexandre.THOMAS@ap-hm.fr](mailto:PascalAlexandre.THOMAS@ap-hm.fr)

<sup>4</sup> Nouvel Hopital civil – CHU Strasbourg – France / [Anne.Olland@chru-strasbourg.fr](mailto:Anne.Olland@chru-strasbourg.fr)

<sup>5</sup> Hopital Haut Lévêque – CHU Bordeaux – France / [claire.dromer@chu-bordeaux.fr](mailto:claire.dromer@chu-bordeaux.fr)

<sup>6</sup> Hôpital Louis Pradel – CHU Lyon – France / [francois.philit@chu-lyon.fr](mailto:francois.philit@chu-lyon.fr)

<sup>7</sup> Hôpital Européen Georges Pompidou – Paris – France / [veronique.boussaud@egp.aphp.fr](mailto:veronique.boussaud@egp.aphp.fr)

<sup>8</sup> CHU Grenoble – France / [JClaustre@chu-grenoble.fr](mailto:JClaustre@chu-grenoble.fr)

#### **Introduction**

Bilateral lung transplantation is considered as a therapeutic option for patients with end-stage cystic fibrosis. The use of extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) for intraoperative cardiopulmonary support has gained interest in recent years. The objective is to study the results of per-operative Extra Corporeal support (CardioPulmonary Bypass (CBP), ECMO) needed in bilateral lung transplantation for cystic fibrosis (CF) patients in frame of the Cohort in Lung Transplantation (COLT) study.

#### **Patients and methods**

Patients were included from 12 lung transplantation centers in the frame of COLT, a prospective cohort of lung transplant recipients.

#### **Results**

From October 2009 to June 2012, 129 patients underwent bilateral lung transplantation for CF, in regular waiting list. 66 patients were transplanted Off Pump, 44 patients needed CBP, and 19 ECMO. The mean follow up is of 4,5 years. Peroperative ECMO is associated with the risk of PGD, duration of invasive ventilation and ECMO post transplantation. There is no significative difference in term of survival at 1 year and 4 years with 94% and 88% of Kaplan-Meier actuarial survival for Off pump group, 84% and 79% for ECMO and 93% and 77% for CPB.

#### **Conclusion**

There is no significant difference in term of survival at 1 year and 4 years between Off pump, CPB or ECMO group.

Key words : lung transplantation – extra corporeal support - cystic fibrosis

## 1- Introduction

Lung transplantation (LT) is considered a valid therapeutic option in the treatment of advanced end-stage lung disease. Important advances have been made in the perioperative management of the patients undergoing LT with improved outcomes and acceptable rates of primary graft dysfunction (PGD) and postoperative complications. Although LT is frequently performed off-pump, circulatory support is necessary in 30% to 40% of patients who undergo LT<sup>1</sup>. Pulmonary support is most frequently necessary in recipients with significant pulmonary hypertension, right ventricular dysfunction, or who are unable to tolerate single-lung ventilation during LT, all frequent signs of advanced, end-stage lung disease.

Cardiopulmonary bypass (CPB) is the standard and most familiar modality used for intraoperative cardiorespiratory support during lung transplantation (LTx). The theoretical benefit of providing controlled low-pressure reperfusion is obviously counterbalanced by the inflammatory response leading to coagulopathy, neutrophil activation, and complement activation due to the number of blood-activating surfaces, including plastic tubing, a reservoir, and suction lines. That's why the use of cardiopulmonary bypass (CPB), even if it has been shown to be a safe method of intraoperative management, remains controversial<sup>2,3</sup>.

The use of extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) for intraoperative cardiopulmonary support has gained interest in recent years. To avoid the potential complications of CPB, many groups have begun replacing CPB with intraoperative ECMO when mechanical circulatory support is required. Using ECMO for intraoperative circulatory support has the potential to decrease bleeding (due to lower heparin doses), PGD, and other complications associated with the activation of blood components and inflammation. In addition, the use of ECMO in patients with severe PGD and acute rejection after transplant has been documented with good results<sup>4-7</sup> ECMO is a valuable tool in lung transplantation providing the potential to bridge patients to transplantation, to replace CPB with at least equal results and to overcome severe postoperative complications with favourable survival.

Most of the study about lung transplantation assistance are monocentric and with only one year follow up, and not focus on one etiology. The objective is to study the mid-term (4 years of follow up) results of per-operative extra corporeal support (CBP, ECMO) needed in

bilateral lung transplantation for cystic fibrosis (CF) patients in frame of the Cohort in Lung Transplantation (COLT) study.

## 2- Patients and methods

### 2-1 COLT database

COhort in Lung Transplantation consists in sharing clinical and biological data of included patients in each center, collected in a database dedicated to COLT. This prospective cohort is built to discover early risk factors and therapeutic targets for chronic lung allograft dysfunction but it offers the opportunity to study the long term impact of perioperative procedures. COLT started in september 2009 and gathers the 11 French lung transplantation centers and since 2012 the center of Brussels.

### 2-2 Population

All transplanted patients are prospectively included in COLT at inclusion (V0). Data are collected the day of transplant (V1), at one (V2) and six (V3) months and every six months during 5 years. Data considered for the present paper are the following : recipient and donor characteristics, pre and post-transplantation data, survival.

To reduce the risk of bias due to confounding factors only cystic fibrosis patients with first bilateral lung transplanted (lung retransplanted patients were excluded). We excluded patients who (1) were transplanted in high emergency or (2) underwent concomitant liver or heart transplantation (3) were colonized with *Burkholderia cenocepacia*.

### 2-3 Extra-corporeal Support

#### Cardio-Pulmonary Bypass technique

Before cannulation, patients were fully heparinized and CPB was instituted with an activated clotting time (ACT) greater than 480 seconds.

The traditional CPB system consists in drainage cannula in right atrium, venous reservoir, pump, oxygenator, arterial filter, and injection cannula in ascendant thoracic aorta. Before arterial cannulation, circuit is filled with priming composed of colloide or cristalloide solution and Heparin. CPB activate inflammation, coagulation, elevate pulmonary resistance, fibrinolysis, inflammation.

### ECMO

Before cannulation, patients received 5000 IU of intravenous unfractionated heparin. Most of canula are in vinyle polychlorure or silicone, and préhéparinised.

ECMO permits to improve oxygenation using veino-veinous canulation (V-V ECMO) or veino-arterial canulation (V-A ECMO), with elements in series : drainage cannula, centrifugal pump, oxygenator (to oxygenate and eliminate CO<sub>2</sub>), reinjection cannula.

Cannulation sites and type of cannulae were selected on the basis of surgeon preference and type of procedure.

## 2-4 Stastistical analysis

Categoric variables were compared using the Fisher exact test. For continuous variables, comparisons were performed using the Student t test or Mann–Whitney test, whenever appropriate. A One –way ANOVA is used to compare median between the 3 groups. Survival curves were plotted using the Kaplan–Meier product limit method and compared with the log-rank test. We used GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc, San Diego, Calif) to conduct all statistical analyses.



### 3- Results

COLT represents 75% of the real activity of lung transplantation in France (because of inclusion criteria and patients consents) during the same period. From October 2009 to june 2012, 129 patients underwent bilateral lung transplantation for CF : 66 patients were transplanted Off Pump, 44 patients needed Cardio Pulmonary Bypass, and 19 ECMO. Included patients were transplanted in 8 french centers : Bordeaux (n=9), Grenoble (n=5), Lyon (n=12), Marseille (n=24), Nantes (n=10), Hôpital Européen Georges Pompidou (n=9), Strasbourg (n=12), Suresnes (n=48). 3 centers did not performed lung transplantation of cystic fibrosis patients.

The mean follow up is 4,5 +/- 1,8 years.

#### 3-1 Patients characteristics

The recipients characteristics are summarized in **table 1**. 129 bilateral lung transplantations were performed and the intra-operative support were Off pump in 66 cases, 44 CPB and 19 ECMO. Pre-transplantation data were similar between groups concerning baseline characteristics, ventilation support and parameters, arterial gaz parameters, bacterial and aspergillus colonization and pre transplantation renal function.

|                                   | Off Pump<br>(n=66) | CPB (n=44)    | ECMO (n=19)   | p  |
|-----------------------------------|--------------------|---------------|---------------|----|
| <b>Recipients characteristics</b> |                    |               |               |    |
| age                               | 30 +/- 9,5         | 28,5 +/- 9,5  | 29,6 +/- 9,4  | ns |
| sex ratio (H/F)                   | 0,53               | 0,48          | 0,37          | ns |
| BMI (kg/m2)                       | 18,2 +/- 2         | 18 +/- 1,7    | 18,8 +/- 3,2  | ns |
| NIV (n,(%))                       | 45 (68%)           | 29 (66%)      | 13 (68%)      | ns |
| long term O2 therapy              | 63 (95%)           | 42 (95,5%)    | 18 (95%)      | ns |
| FEV-1 (% pred)                    | 24 +/- 7           | 23 +/- 5,8    | 21 +/- 5      | ns |
| TLC (% pred)                      | 108 +/- 28         | 93 +/- 26     | 86,6 +/- 21   | ns |
| SaO2 (%)                          | 90 +/- 15          | 93 +/- 5,2    | 92 +/- 3,4    | ns |
| pH                                | 7,42 +/- 0,04      | 7,42 +/- 0,03 | 7,41 +/- 0,04 | ns |
| PaO2 (mmHg)                       | 66,5 +/- 14,8      | 65,5 +/- 17,2 | 67,6 +/- 14   | ns |
| PaCO2 (mmHg)                      | 46,8 +/- 9,5       | 49,7 +/- 11,7 | 56,1 +/- 15,2 | ns |
| Days on waiting liste (median)    | 85                 | 136,5         | 30            | ns |
| Staphylococcus (n, (%))           | 24 (36%)           | 14 (32%)      | 6 (32%)       | ns |
| P. aeruginosa (n,(%))             | 48 (73%)           | 29 (66%)      | 16 (84%)      | ns |
| Aspergillus (n,(%))               | 19 (29%)           | 21 (48%)      | 8 (42%)       | ns |
| rénal failure (n, (%))            | 0 (0%)             | 0 (0%)        | 0 (0%)        | ns |
| <b>Donors characteristics</b>     |                    |               |               |    |
| age                               | 38 +/- 15          | 43 +/- 14     | 48 +/- 12     | ns |
| sex ratio (H/F)                   | 0,54               | 0,5           | 0,42          | ns |
| tabacco (n, (%))                  | 24 (36,4%)         | 16 (36,4%)    | 9 (47,4%)     | ns |
| intensive care (days)             | 3 +/- 2,8          | 2,7 +/- 2,5   | 3 +/- 2,9     | ns |
| PaO2/FiO2                         | 416 +/- 75         | 429 +/- 91    | 379 +/- 91    | ns |

**Table 1 : Recipients and donors pre transplantation data :** Parametric continuous variables are expressed as mean standard deviation and were compared with the Student t test. Categorical variables were compared with the Fisher exact test. *BMI* : Body Mass index, *NIV* : Non Invasive Ventilation, *FEV-1* : Forced Expiratory Volume in 1 second, *TLC* : Total Lung Capacity.

### 3-3 Per and post transplantation data

Concerning per-transplantation data (**table 2**), the cold ischemic times did not differ between groups. The intra operative requirement of blood products (packed red blood cells and fresh frozen plasma) did not significantly differ between group.

There are more patients transplanted with post transplantation Primary Graft Dysfunction (PGD) and ventilation time in ECMO group compared to off pump group and to CPB group.

**Table 2 : Intraoperative data and early post-transplant outcomes**

| per and post transplantation data | Off Pump (n=66) | CPB (n=44)  | ECMO (n=19) | p                                            |
|-----------------------------------|-----------------|-------------|-------------|----------------------------------------------|
| Ischémic time 1 (min)             | 277 +/- 85      | 264 +/- 88  | 224 +/- 75  | ns                                           |
| Ischémic time 2 (min)             | 337 +/- 75      | 319 +/- 93  | 347 +/- 75  | ns                                           |
| Blood transfusion (units)         | 4,3 +/- 2       | 6,8 +/- 4,7 | 8,2 +/- 4   | ns                                           |
| Plasma transfusion (units)        | 3,9 +/- 1,4     | 5,4 +/- 4,5 | 7,6 +/- 4,4 | ns                                           |
| pleural adhesions (n,%)           | 18 (27%)        | 17 (39%)    | 9 (47%)     | ns                                           |
| Primary Graft Dysfunction (n,%)   | 18 (27%)        | 16 (36%)    | 15 (79%)    | <b>p&lt;0,0001*** OP/ECMO</b>                |
| Reoperation for bleeding (n,%)    | 1 (1,5%)        | 8 (18%)     | 3 (16%)     | <b>p=0,035* OP/ECMO<br/>p=0,027** OP/CPB</b> |
| ventilation (days, median)        | 1               | 1           | 6,5         | <b>p=0,039*</b>                              |
| dialysis (n,%)                    | 2 (3%)          | 6 (13,6%)   | 1 (3%)      | ns                                           |

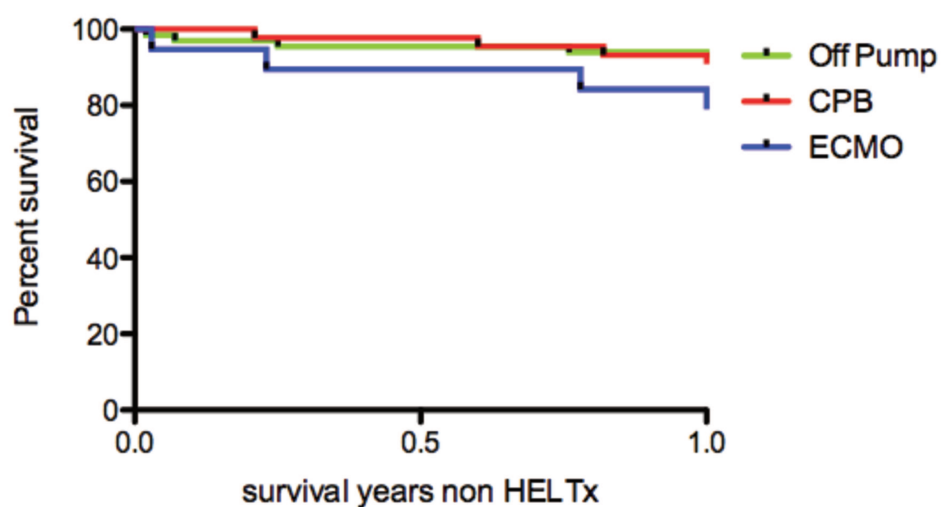
### 3-4 post transplantation ECMO

14 patients who need ECMO in post transplantation period in each groups (intra operative support : Off pump or CardioPulmonary Bypass or ECMO). There are 6 V-V ECMO (3 *Avalon*) and 8 V-A ECMO. According to the number of PGD, there are more patients in ECMO group who need a post transplantation support (n=10) during 6,2 +/- 4,4 days (median=4), compared to CPB group (n=2), and OP group (n=2).

### 3-5 Survival

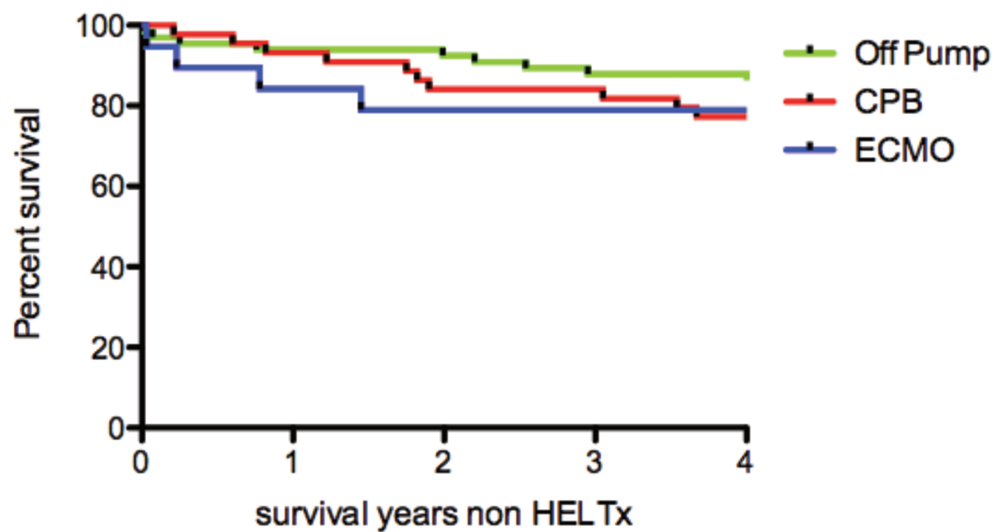
The 1 year end 4 years Kaplan-Meier survival curves were not different between the groups **figure 1 and 2**.

**Figure 1 Kaplan-meier survival curves for 1 year**  
**For cystic fibrosis patients transplanted in regular waiting list**



| month                | 0   | 6    | 12 |
|----------------------|-----|------|----|
| Off Pump %           | 100 | 95,5 | 94 |
| n (patients at risk) | 66  | 64   | 63 |
| CPB %                | 100 | 97,7 | 93 |
| n                    | 44  | 44   | 42 |
| ECMO %               | 100 | 89,5 | 84 |
| n                    | 19  | 18   | 17 |

**Figure 2 Kaplan-meier survival curves for 4 years**  
For cystic fibrosis patients transplanted in regular waiting list



| Year                 | 0   | 1  | 2  | 3  | 4  |
|----------------------|-----|----|----|----|----|
| Off Pump %           | 100 | 94 | 92 | 88 | 88 |
| n (patients at risk) | 66  | 63 | 62 | 59 | 59 |
| CPB %                | 100 | 93 | 84 | 84 | 77 |
| n                    | 44  | 42 | 38 | 38 | 35 |
| ECMO %               | 100 | 84 | 79 | 79 | 79 |
| n                    | 19  | 17 | 16 | 16 | 16 |

## 4- Discussion

LT is frequently performed off-pump, circulatory support is necessary in 30% to 40% of patients who undergo LT <sup>1</sup>. Pulmonary support is most frequently necessary in recipients with significant pulmonary hypertension, right ventricular dysfunction, or who are unable to tolerate single-lung ventilation during LT, all frequent signs of advanced, end-stage lung disease.

In this study we review results of per-operative extra corporeal support (CBP, ECMO) needed in bilateral lung transplantation for cystic fibrosis (CF) patients in frame of the Cohort in Lung Transplantation (COLT) study with a long follow up of 4 years. This cohort is homogeneous (bilateral lung transplantation, cystic fibrosis) and multicentric and represent 75% of the real activity of lung transplantation of cystic fibrosis patients in France (because of inclusion criteria and patients consents). Furthermore, this cohort include 129 patients with cystic fibrosis in a recent and short period (2009-2012), with a 4 years follow up, which are 2 originals elements because in litterature, most of the study about lung transplantation assistance are monocentric and with a one year follow up.

Historically, CPB was the mechanical support system of choice because it had proved successful in cardiac surgery for decades and more recently in lung transplantation as well <sup>8,9</sup>. However, the use of an extracorporeal mechanical support system, is not without risk. There is important evidence associating CPB use with increased PGD, prolonged mechanical ventilation, a higher rate of bleeding complications and transfusions, and an increased rate of neurologic complications <sup>1,3,10,11</sup>. The large blood-activating surfaces present in the CPB tubing, venous reservoir, oxygenator, and cardiectomy suction have been associated clinically and experimentally with profound activation of the coagulation cascade and inflammatory system <sup>12</sup>. In addition, CPB use requires high doses of intravenous heparin to prevent thromboembolism. Further data, including those from the International Society for Heart and Lung Transplantation working group on lung PGD, have suggested that CPB can be directly linked to worse postoperative outcomes and higher rates of PGD <sup>13,14</sup>.

In litterature, results of CPB per transplantation are disappointing because there is a selection bias of severe patients<sup>15</sup>. Nagendran have analyze the results of lung transplantation off pump versus with CPB, by studying selection of 14 study. This work demonstrate the contradictories data, with 6 studies indicating superiority of Off pump transplantation, and 6 studies with no significative difference. This review show the impact of confusing factors like transplantation etiology. In our work, all patients were cystic fibrosis

patients. To summarize, Nagendran indicates that CPB is must be used for patients with pulmonary arterial Hypertension, but there is no argument for using systematically CPB and confirm the efficacy of ECMO as a safe intraoperative support.

To avoid the potential complications of CPB, many groups have begun replacing CPB with intraoperative ECMO when mechanical circulatory support is required. The ECMO circuit is simpler than the CPB circuit, has less blood-tubing interface surface area, has less blood-air interface, and lacks a cardiotomy reservoir, all of which lead to a theoretic decrease in activation of a systemic inflammatory response. Aigner and colleagues<sup>16</sup> suggested that ECMO can be utilized with results that are at least comparable with CPB, and ECMO's versatility allowed them to simplify the management of complex patients by maintaining the same system utilized intraoperatively in the postoperative period. Preliminary data regarding the utility of ECMO relative to CPB is varied. A study by Bittner and colleagues<sup>12</sup> in 2006 suggested that ECMO use led to higher rates of blood product transfusions, as well as worse 1-year survivals. A more recent report from Ius and coworkers<sup>17</sup> in 2012 demonstrated lower blood product transfusion rates and improved survivals at 3, 9, and 12 months in the ECMO group relative to the CPB group.

More recently, Toronto's team show significant advantages of ECMO over CPB for both intraoperative and early post-transplant outcomes. Patients undergoing LTx who were supported intraoperatively with ECMO demonstrated a shorter duration of mechanical ventilation, had shorter ICU and hospital length of stay, and required less blood products during the perioperative period when compared with matched recipients who were supported with conventional CPB. But their results compare CPB versus ECMO for patients transplanted at different period of time. In this study, the Kaplan–Meier survival curves did not differ at one year of follow up.

The current report show, first of all the same recipients and donor characteristics. Concerning per transplantation data, there is no significative difference of transfusion and dialysis (Off pump, CPB, ECMO). We recognize that there is a potential for selection bias for ECMO group due to the fact that ECMO is probably use in more hemorrhagic patients. The advantage of ECMO, is that it is easy to use per and post transplantation if necessary, with the same system. Also, transplantation centers using CPB, use this support more systematically, while ECMO is used electively, for example for PGD, and permit to maintain assist support post operatively.

Limitations :

Patients selected were included in a research cohort (COLT), and the data depend on filling online database by each center. In addition, this is a multi centric study with all the variabilities between centers.

Generally, concerning per-transplantation assistance, C.Aigner (Vienna) indicate in comments of Nagendran analysis, that keys to successful outcome are : the familiarity of the entire team with one approach and attention to details in coagulation management, substitution of blood products, hemodynamic management and technical issues. This consensual conclusion correspond with our results, which are results of 8 different french lung transplantation teams, with, for each team, their habits and own experience. Indeed, there is no significative difference in term of survival, at 4 years between the different Extra corporeal support (Off pump, CPB, ECMO) in lung transplantation.



## Bibliographie

1. Nagendran M, Maruthappu M, Sugand K. Should double lung transplant be performed with or without cardiopulmonary bypass? *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery*. 2011;12(5):799-804. doi:10.1510/icvts.2010.263624.
2. McRae K. Con: lung transplantation should not be routinely performed with cardiopulmonary bypass. *YJCAN*. 2000;14(6):746-750. doi:10.1053/jcan.2000.18601.
3. Diamond JM, Lee JC, Kawut SM, et al. Clinical risk factors for primary graft dysfunction after lung transplantation. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(5):527-534. doi:10.1164/rccm.201210-1865OC.
4. Hayes D, Galantowicz M, Yates AR, Preston TJ, Mansour HM, McConnell PI. Venovenous ECMO as a bridge to lung transplant and a protective strategy for subsequent primary graft dysfunction. *J Artif Organs*. 2013;16(3):382-385. doi:10.1007/s10047-013-0699-z.
5. Anile M, Diso D, Russo E, et al. Extracorporeal Membrane Oxygenation as Bridge to Lung Transplantation. *TPS*. 2013;45(7):2621-2623. doi:10.1016/j.transproceed.2013.07.005.
6. Lafarge M, Mordant P, Thabut G, et al. Experience of extracorporeal membrane oxygenation as a bridge to lung transplantation in France. *Journal of Heart and Lung Transplantation*. 2013;32(9):905-913. doi:10.1016/j.healun.2013.06.009.
7. MD JJMDBMAIMMJMMLMKBMSAMJSMMB, MD DB, MS AIM, et al. Extracorporeal membrane oxygenation as a bridge to lung transplantation and recovery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2012;144(3):716-721. doi:10.1016/j.jtcvs.2012.05.040.
8. Szeto WY, Kreisel D, Karakousis GC, et al. Cardiopulmonary bypass for bilateral sequential lung transplantation in patients with chronic obstructive pulmonary disease without adverse effect on lung function or clinical outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;124(2):241-249.
9. Pochettino A, Augoustides JGT, Kowalchuk DA, Watcha SM, Cowie D, Jobes DR. Cardiopulmonary bypass for lung transplantation in cystic fibrosis: pilot evaluation of perioperative outcome. *YJCAN*. 2007;21(2):208-211. doi:10.1053/j.jvca.2006.09.001.
10. Dalibon N, Geffroy A, Moutafis M, et al. Use of cardiopulmonary bypass for lung transplantation: a 10-year experience. *YJCAN*. 2006;20(5):668-672. doi:10.1053/j.jvca.2006.01.004.
11. Shigemura N, Sclabassi RJ, Bhama JK, et al. Early major neurologic complications

- after lung transplantation: incidence, risk factors, and outcome. *Transplantation*. 2013;95(6):866-871. doi:10.1097/TP.0b013e318280b359.
12. Bittner HB, Binner C, Lehmann S, Kuntze T, Rastan A, Mohr FW. Replacing cardiopulmonary bypass with extracorporeal membrane oxygenation in lung transplantation operations. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2007;31(3):462–7–discussion467. doi:10.1016/j.ejcts.2006.11.050.
  13. Toyoda Y, Bhama JK, Shigemura N, et al. Efficacy of extracorporeal membrane oxygenation as a bridge to lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2013;145(4):1065–70–discussion1070–1. doi:10.1016/j.jtcvs.2012.12.067.
  14. Bermudez CA, Rocha RV, Zaldonis D, et al. Extracorporeal membrane oxygenation as a bridge to lung transplant: midterm outcomes. *The Annals of Thoracic Surgery*. 2011;92(4):1226–31–discussion1231–2. doi:10.1016/j.athoracsur.2011.04.122.
  15. Rozé H, Sigonney R, Barandon L, Jougon J, Ouattara A. [Place of traditional CBP in bipulmonary transplantation]. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2012;31 Suppl 1:S8-S11. doi:10.1016/S0750-7658(12)70046-1.
  16. Aigner C, Wisser W, Taghavi S, et al. Institutional experience with extracorporeal membrane oxygenation in lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2007;31(3):468–73–discussion473–4. doi:10.1016/j.ejcts.2006.11.049.
  17. MD FI, MD CK, MD IT, et al. Lung transplantation on cardiopulmonary support: venoarterial extracorporeal membrane oxygenation outperformed cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2012;144(6):1510-1516. doi:10.1016/j.jtcvs.2012.07.095.

## PUBLICATIONS ET PRESENTATIONS DURANT LA THESE

### LISTE DES PUBLICATIONS SCIENTIFIQUES

Durand M\*, Lacoste P\*, Brosseau C, Durand E, Loy J, Royer PJ, Magnan A, Brouard S & COLT Consortium. **Regulatory T lymphocytes profile as a possible predictive biomarker of the Bronchiolitis Obliterans Syndrome after lung transplantation in Humans**  
(soumis le 1 décembre à *Nature Immunology*)

Lacoste P, Roux A, Thomas P.A, Reynaud-Gaubert M, Olland A, Dromer C, Philit F, Boussaud V, Claustre J, Magnan A, Sage E and the COLTconsortium. **Outcomes of Extra-Corporeal support in Bilateral lung transplantation for cystic fibrosis in frame of the COLT cohort**  
(en cours de soumission)

Brosseau C, Durand M, Durand E, Loy J, Foureau A, Lacoste P, Royer PJ, Brouard S, Magnan A, COLT consortium. **Characterization of a B lymphocyte signature predictive of chronic lung allograft dysfunction: COLT study**  
(en cours d'écriture)

### Publications originales dans des revues avec comité de lecture

Pain M\*, Royer PJ, Loy, Girardeau JA, Tissot A, Lacoste P, Roux A, Reynaud-Gaubert M, Kessler R, Mussot S, Dromer C, Brugière O, Mornex JF, Guillemain R, Dahan M, Knoop C, Botturi K, Pison C, Danger R, Brouard S, Magnan A and the COLT consortium. **T cells promote bronchial epithelial cells secretion of Matrix-Metalloproteinase-9 via a C-C chemokine receptor type 2 pathway, implications for chronic lung allograft dysfunction.** American Journal of Transplantation 2016, en révision.

Sénage T, Lacoste P, Toquet C, Lepoivre T, Bizouarn P, Michel M, Pattier S, Al Habash O, Périgaud C, Mugniot A, Petit T, Treilhaud M, Gueffet JP, Rozec B, Roussel JC, Trochu JN. **Challenging heart transplantation after total artificial heart support : is it worth it?**  
(soumis)

Lacoste P, Sage E, Puyo P, Bonnette P, Mitilian D, Bellier J, Parquin F, Chapelier A and the Foch lung transplant group. **Bi-caval dual lumen cannula for veno-venous extracorporeal membrane oxygenation as a bridge to lung transplantation for cystic fibrosis.** (soumis)

Lacoste P, Tissot A, Gomez C, Roux A, Kessler R, Dromer C, Philit F, Boussaud V, Pison C, Mussot S, Brugière O, Dahan M, Knoop C, Magnan A et le consortium COLT. **Assistance circulatoire en transplantation bipulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose : Résultats de la cohorte multicentrique COLT.** Journal de la Société Française de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire 2016, 20 : 11- 13

Pain M, Bermudez O, Lacoste P, Royer PJ, Botturi K, Tissot A, Brouard S, Eickelberg O, Magnan A. **Tissue Remodelling in Chronic Bronchial Diseases: From the Epithelial to Mesenchymal Phenotype**. European Respiratory Review 2014, 23: 118–30.

Publications en tant que membre d'un collectif d'investigateurs (indexé)

Chesné J, Danger R, Botturi K, Reynaud-Gaubert M, Mussot S, Stern M, Danner-Boucher I, Mornex JF, Pison C, Dromer C, Kessler R, Dahan M, Brugière O, Le Pavé J, Perros F, Humbert M, Gomez C, Brouard S, Magnan A; COLT Consortium. **Systematic analysis of blood cell transcriptome in end-stage chronic respiratory diseases**. PLoS One. 2014 Oct 20;9(10):e109291.

Pison C, Magnan A, Botturi K, Sève M, Brouard S, Marsland BJ, Ernst F, Paprotka T, Deplanche K, Fritz A, Siroux V, Boissel JP, Corris PA, Auffray C, Nicod LP; SysCLAD consortium. **Prediction of chronic lung allograft dysfunction: a systems medicine challenge**. Eur Respir J. 2014 Mar;43(3):689-93.

### Présentations orales à des congrès nationaux et internationaux

#### **Journées de Recherche Respiratoire – Nice - Octobre 2016**

“Regulatory T lymphocytes profile as a possible predictive biomarker of the Bronchiolitis Obliterans Syndrome after lung transplantation in Humans”

#### **International Society of Heart and Lung Transplantation – Nice – 2015**

“Outcomes of high emergency for more than 1000 lung transplant recipients: results of the cohort of Lung Transplantation (COLT) study”

#### **Société Française de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire – Marseille - 2015**

20. “Assistance circulatoire dans la mucoviscidose: ExtraCorporeal Membrane Oxygenation veino-veineuse (*AVALON*) en “bridge to transplant” ”

#### **International Congress on Lung Transplantation – Paris – 2014**

“Immunophenotyping of lung transplant recipients in the COLT study”

#### **International Congress on Lung Transplantation – Paris – 2014**

“Bilateral lung transplantation for cystic fibrosis : results of High Emergency in the COLT study”

#### **International Society of Heart and Lung Transplantation - San Diego – 2014**

“Clinical outcome of bilateral lung transplantation for cystic fibrosis in the frame of the European multicentric COLT study”

#### **Société Française de Chirurgie Thoracique et Cardio-Vasculaire – Paris - 2013**

“Facteurs prédictifs du rejet chronique en transplantation pulmonaire: Cohorte COLT (Cohort in Lung Transplantation), réseau multicentrique Européen”

**International Congress on Lung Transplantation – Paris - 2012**

“Triple co-culture model mimicking the Epithelial Mesenchymal Transition of Bronchiolitis Obliterans during lung transplantation”

# Thèse de Doctorat

Philippe LACOSTE

## Analyse du profil lymphocytaire T au cours du rejet chronique en transplantation pulmonaire dans le cadre de la cohorte COLT

T lymphocytes profile in Bronchiolitis Obliterans Syndrome after lung transplantation in frame of COLT cohort

### Résumé

Bien que les traitements immunosuppresseurs aient permis une forte diminution de la survenue de rejets aigus, la dysfonction chronique d'allogreffe pulmonaire (CLAD) reste un challenge thérapeutique de taille pour la survie à long terme du greffon. La cohorte COLT créée dans le but d'étudier les mécanismes physiopathologiques des Syndromes Restrictif d'Allogreffe (RAS) et de Bronchiolite Oblitérante (BOS), la forme de CLAD la plus courante, nous permet l'analyse des cellules immunitaires circulantes des patients transplantés de la transplantation (TP) à la survenue du CLAD.

Le profil lymphocytaire de 6 patients stables (STA) et 8 BOS a été analysé avant TP, 1 à 6 mois après TP, 6 mois avant le BOS et lors du diagnostic du BOS. Les PBMC ont été étudiés par cytométrie en flux après marquage « classique » des populations lymphocytaires T : CD3, CD4, CD25, CD45RA et FoxP3. CXCR3, CCR6, CD39, CD73, CD15s et PD1 ont été ajoutés afin d'étudier les sous-populations T helper (Th) et T régulatrices (Tregs).

Cette étude ne montre aucune différence significative entre les patients qui développent un BOS dans les 3 ans post-TP et les STA dans les proportions des populations T CD4 et CD8 communes. Nous avons identifié une augmentation des Tregs FoxP3<sup>+</sup> 1 à 6 mois post-TP chez les BOS comparés aux STA (STA - 0,85% et BOS - 3,36%,  $p < 0,005$ ). Cette différence a été validée sur 37 patients STA et 24 patients BOS (STA - 1,61% et BOS - 3,18%,  $p < 0,001$ ). L'analyse des sous-populations Tregs démontre que l'augmentation des Tregs chez les BOS est principalement due à une augmentation de sous-populations mémoires CD45RA<sup>+</sup> et CD39<sup>+</sup>. Enfin, contrairement au rejet aigu, la survie au BOS est augmentée significativement chez les patients présentant un faible taux de Tregs 1 à 6 mois post-TP ( $n_{\text{H}}\text{Tregs}$  - 41% et  $n_{\text{L}}\text{Tregs}$  - 75%,  $p < 0,01$ ). En conclusion, nous avons identifié les Tregs comme potentiel biomarqueur prédictif de la survenue de BOS après transplantation pulmonaire chez l'Homme.

### Mots clés

Transplantation pulmonaire – bronchiolite oblitérante – lymphocyte – lymphocytes T régulateur

### Abstract

The irreversible chronic allograft dysfunction (CLAD) remains a therapeutic challenge for the long-term graft survival in lung transplantation (TP). For Bronchiolitis Obliterans Syndrome (BOS), the main form of CLAD, both immune mechanisms involved and predictive biomarkers have to be better defined. The COLT (Cohort in Lung TP), initiated in order to understand the pathophysiology of CLAD, gave us the opportunity to follow the immune profile of the patients from the TP to the BOS occurrence.

The lymphocyte profile of 6 stable (STA) and 8 BOS patients was investigated before TP, 1 to 6 months after TP, 6 months before BOS and at the BOS diagnosis. PBMCs were analysed by flow-cytometry with the "classical" T-cells markers: CD3, CD4, CD25, CD45RA, and FoxP3. CXCR3, CCR6, CD39, CD73, CD15s and PD1 were also added to go deeper in the helper (Th) and regulatory T cells (Tregs) subsets.

Monitoring doesn't show any significant difference between patients who will report a BOS in the 4 years and STA in the proportions of common CD4 and CD8 T cells subsets. We highlight an increase in FoxP3<sup>+</sup> Tregs proportion 1 to 6 months post-TP in BOS compared to STA (0,85% and 3,36% in STA and BOS respectively,  $p < 0,005$ ). We validated this profile on 37 STA and 24 BOS patients (1,61% and 3,18% in STA and BOS respectively,  $p < 0,001$ ). Then, the analysis of the Tregs subsets denotes mainly memory Tregs (CD45RA<sup>+</sup> and CD39<sup>+</sup>) are responsible for the Tregs increase found in BOS patients. Finally, we show that unlike Acute Rejection, the BOS survival is significantly increased in patients with a low proportion of Tregs 1 to 6 months post-TP (41% and 75% in  $n_{\text{H}}\text{Tregs}$  and  $n_{\text{L}}\text{Tregs}$  respectively,  $p < 0,01$ ).

In conclusion, we lead to identify Regulatory T cells as new potential predictive biomarkers of the BOS including both phenotypical and functional modalities in humans.

### Key Words

Lung transplantation – obliterative bronchiolitis – lymphocyte – regulatory T cells