

UNIVERSITE DE ROUEN
UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2017

N°

MÉMOIRE DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 8 avril 2013 tient lieu de

THÈSE

pour le DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 17 octobre 2017

par

Florian RENOSI

Né le 25.08.1989 à Décines-Charpieu

**Apport du tri myéloïde et lymphoïde T dans le suivi de
chimérisme post-allogreffe de cellules souches
hématopoïétiques chez l'adulte**

Directeur : Docteur Pascaline ETANCELIN

Co-directeur : Professeur Martine PESTEL-CARON

Président du jury : Professeur Martine PESTEL-CARON

Membres du jury : Professeur Fabrice JARDIN

Docteur Anne-Lise MENARD

Docteur Pascaline ETANCELIN

Remerciements

A Madame le Professeur Martine Pestel-Caron,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Soyez assurée de ma sincère gratitude. Je vous remercie également pour votre disponibilité et votre écoute pendant mon stage dans votre service.

A Monsieur le Professeur Fabrice Jardin,

Vous me faites l'honneur de participer à ce jury de thèse. Je vous remercie de m'avoir accueilli dans votre unité de recherche, j'ai pris plaisir à m'impliquer dans les projets de l'équipe et j'y ai découvert l'étude passionnante des lymphomes.

A Madame le Docteur Anne-Lise Ménard,

Tu me fais l'honneur de juger ce travail, je te remercie vraiment pour tes conseils sur les aspects cliniques du sujet, reçois ici l'expression de ma sincère gratitude pour avoir répondu à mes questions.

A Pascaline,

Tu m'as fait l'honneur d'accepter de diriger ce travail, je te remercie pour tes précieux conseils, ta disponibilité et pour tes retours constructifs et très rapides, dans la dernière ligne droite. Je te remercie aussi de m'avoir tant appris en biologie moléculaire des hémopathies, avec toute la rigueur et l'excellence nécessaire.

A toute l'équipe du laboratoire de génétique oncologique,

A M. Bastard, pour m'avoir ouvert les portes du laboratoire. Je vous remercie pour vos explications, toujours très pointues en cytogénétique.

A Dominique, pour ta formation en cytogénétique et pour toutes ces discussions que nous avons eues suite à mes si nombreuses questions.

A l'équipe de cytoG : Anne-Laure, Mélissa, Céline, Nathalie, Séverine, merci pour votre bonne humeur et pour ces derniers temps passés ensemble à gérer les FISH myélomes. C'était un plaisir !

A l'équipe de bio mol, Laëtitia, Soizic, Shirley, Sandrine, Mathieu, Colas, pour tous ces bons moments passés au labo, ou à midi, et pour votre travail, toujours au top !

A l'équipe de recherche, Philippe et Catherine qui m'ont tant aidé pour Master 2, et même après ; Phiphi, Vinciane, Elodie, le trio de choc du 3^{ème} ; PJ, qui m'a laissé m'installer dans « son » bureau pendant un an et demi ; Sydney et Ahmad qui ont partagé avec moi tant d'heures dans cette pièce.

Au laboratoire d'hématologie de Rouen, Sylvie et Gérard, un grand merci pour la qualité de vos enseignements théoriques et pratiques, pour l'enthousiasme communicatif de Sylvie, qui m'a donné envie de faire de l'hématologie. Bernard, je vous remercie pour votre sollicitude, Catherine, pour ta bienveillance. Merci à toute l'équipe, aux techniciens et secrétaires que j'ai côtoyé au gré de mes passages en stage, ou lors de mes allers-retours d'un labo à l'autre.

Au laboratoire d'hématologie de Lille, pour ce dernier semestre très enrichissant, je remercie M. Preudhomme pour son accueil. Merci Lucie, Belkacem, Laurène, Gauthier avec qui j'ai beaucoup partagé, merci à Alice, Nathalie, Thomas et Nicolas avec qui c'est un plaisir de travailler et de discuter.

Au laboratoire d'immunologie, pour m'avoir donné le goût à la recherche, merci à M. Boyer pour son soutien.

A tous ces internes géniaux qui me font regretter Rouen :

Ceux qui sont là depuis le début, Cédric et son art de la formule, Marine qui partagé tous mes stages de niveau 1, Elise, Elsa, Céline, Anaïs.

Mention spéciale aux Berby, pour le Maneki Neko, pour AA Sandberg, pour votre super canap.

Ceux qui sont arrivés un peu après, Imène, Ismaël, Céline, Charline, Maud, Julien, Aurélien, François. Camille, on sera jamais internes en même temps, mais peu importe, merci pour les racks et tout ce qui va avec !

Lucile, Yann et Marion, pour les longues discussions rue Edouard Adam.

Aurélie, pour ta gentillesse bien sûr, et en particuliers, je te remercie pour ton aide sur ce travail.

Louis, mon agent de liaison à Becquerel ce semestre.

Fanny, la plus hémato des anapath que j'ai croisé, je pense que je ne t'oublierai plus pour aller manger... Hélène et Gwendoline, les autres anapaths qui ont rendu mes stages tellement plus mémorables. Les « immunos » aussi, Maëlle, Jérémie, Gwladys.

Ceux qui sont partis, Giovanni, Rayan, Dorian, Stéphanie, Jawad, Thomas.

Ceux qui sont arrivés et qui me donnent la pêche, Guillaume, Marion, Marion, Wassim, Albane, Benoît, et tous ces internes de bio avec qui j'ai passé beaucoup de temps et qui rendent mes années à Rouen inoubliables.

A mes parents, je vous remercie pour tout votre amour et pour votre soutien.

A Jennifer, pour hier, pour aujourd'hui, pour demain. Pour toujours.

L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs.

ANNEE UNIVERSITAIRE 2016 - 2017
U.F.R. DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**
ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
Professeur Benoit VEBER
Professeur Pascal JOLY
Professeur Stéphane MARRET

I - MEDECINE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Ygal BENHAMOU	HCN	Médecine interne
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Bio statistiques et informatique médicale
Mme Bouchra LAMIA	Havre	Pneumologie
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE (<i>détachement</i>)	HCN	Médecine interne (gériatrie) Détachement
Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Jean-Nicolas CORNU	HCN	Urologie
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Pierre CZERNICHOW (<i>surnombre</i>)	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mr Stéphane DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Frédéric DI FIORE	CB	Cancérologie
Mr Fabien DOGUET	HCN	Chirurgie Cardio Vasculaire
Mr Jean DOUCET	SJ	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie

Mr Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
Mr Philippe DUCROTTE	HCN	Hépto-gastro-entérologie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel GODIN (<i>surnombre</i>)	HB	Néphrologie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Dominique GUERROT	HCN	Néphrologie
Mr Olivier GUILLIN	HCN	Psychiatrie Adultes
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato - Vénérologie
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile
Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie

Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépto-gastro-entérologie
M. Benoit MISSET	HCN	Réanimation Médicale
Mr Jean-François MUIR (<i>urnombre</i>)	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophtalmologie
Mr Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Gaëtan PREVOST	HCN	Endocrinologie
Mr Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>détachement</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Horace ROMAN	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépto-gastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Christian THUILLEZ (<i>urnombre</i>)	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
M. Gilles TOURNEL	HCN	Médecine Légale
Mr Olivier TROST	HCN	Chirurgie Maxillo-Faciale
Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER (<i>urnombre</i>)	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	HB	Service Santé Réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
Mr Jacques WEBER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mme Valérie BRIDOUX HUYBRECHTS	HCN	Chirurgie Vasculaire
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Neurophysiologie
Mme Sophie CLAEYSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas MOUREZ	HCN	Virologie
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mme Laëtitia ROLLIN	HCN	Médecine du Travail
Mr Mathieu SALAUN	HCN	Pneumologie
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
Mr David WALLON	HCN	Neurologie

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique LANIEZ	UFR	Anglais – retraite 01/10/2016
Mr Thierry WABLE	UFR	Communication

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
Mr Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE (Professeur émérite)	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mme Isabelle LEROUX - NICOLLET	Physiologie
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEUIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mr Jérémy BELLIEN (MCU-PH)	Pharmacologie
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mme Camille CHARBONNIER (LE CLEZIO)	Statistiques
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mr Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mme Dominique DUTERTE- BOUCHER	Pharmacologie

Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique
Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Nejla EL GHARBI-HAMZA	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique
Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia LE GOFF	Parasitologie – Immunologie
Mme Hong LU	Biologie
Mme Marine MALLETER	Toxicologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Tiphaine ROGEZ-FLORENT	Chimie analytique
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mr Jean-François HOUIVET	Pharmacie officinale

PROFESSEUR CERTIFIE

Mme Mathilde GUERIN	Anglais
----------------------------	---------

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mme Sandrine DAHOT	Bactériologie
---------------------------	---------------

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mr Souleymane ABDOUL-AZIZE	Biochimie
Mme Hanane GASMI	Galénique

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Roland CAPRON	Biophysique
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacodynamie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr François ESTOUR	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Serguei FETISSOV (med)	Physiologie (ADEN)
Mr Paul MULDER (phar)	Sciences du Médicament
Mme Su RUAN (med)	Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil ADRIOUCH (med)	Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)
Mme Gaëlle BOUGEARD-DENOYELLE (med)	Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)
Mme Carine CLEREN (med)	Neurosciences (Néovasc)
M. Sylvain FRAINEAU (phar)	Physiologie (Inserm U 1096)
Mme Pascaline GAILDRAT (med)	Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)
Mr Nicolas GUEROUT (med)	Chirurgie Expérimentale
Mme Rachel LETELLIER (med)	Physiologie
Mme Christine RONDANINO (med)	Physiologie de la reproduction
Mr Antoine OUVRARD-PASCAUD (med)	Physiologie (Unité Inserm 1076)
Mr Frédéric PASQUET	Sciences du langage, orthophonie
Mme Isabelle TOURNIER (med)	Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

SJ – Saint Julien Rouen

Table des matières

Remerciements	2
Liste des tableaux et des figures	16
Liste des abréviations	18
Introduction.....	19
1. L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	20
1.1. Hématopoïèse normale et hémopathies malignes	20
1.2. Définition et principes de l'allogreffe.....	21
1.3. Type de greffon	23
1.4. Conditionnements pré-greffe.....	25
1.5. Complications et suivi post-greffe.....	27
2. Le chimérisme donneur-receveur	30
2.1. Définition du chimérisme	30
2.2. Techniques d'analyse du chimérisme	31
2.2.1. Techniques historiques.....	31
2.2.2. Etude des séquences <i>Variable Number Tandem Repeats</i>	32
2.2.3. Etudes des séquences <i>Short Tandem Repeats</i>	32
2.2.4. Etudes des polymorphismes par PCR quantitative	33
2.2.5. Nouvelles techniques innovantes	34
2.3. Objectifs et évolution du chimérisme post-greffe	36
2.3.1. Suivi de chimérisme.....	36
2.3.2. Greffes à conditionnements standards	37
2.3.3. Greffes à conditionnements atténués.....	38
2.3.4. Greffes pour pathologies non malignes	38
2.3.5. Etude des sous-populations triées	39
2.4. Recommandations actuelles	41

3.	Objectifs de l'étude	43
4.	Matériel et méthodes.....	44
4.1.	Technique d'étude employées	44
4.1.1.	Réception des échantillons.....	44
4.1.2.	Tri cellulaire	45
4.1.3.	Extraction d'ADN	45
4.1.4.	Détermination du chimérisme	46
4.1.5.	Processus du suivi de chimérisme au laboratoire	56
4.2.	Constitution rétrospective de la cohorte	57
4.3.	Analyses statistiques	57
5.	Résultats de l'étude.....	58
5.1.	Caractéristiques de la cohorte étudiée	58
5.2.	Choix de la technique pour le suivi de chimérisme.....	60
5.3.	Pathologies non malignes : les aplasies médullaires.....	65
5.4.	Pathologies malignes.....	67
5.4.1.	Conditionnements standards	72
5.4.2.	Conditionnements atténués.....	73
5.4.3.	Evolution post-greffe : les manifestations de GVH chronique	79
5.5.	Patients ayant reçu des injections de lymphocytes du donneur	80
6.	Discussion	82
	Conclusion	89
	Références bibliographiques.....	90
	Serment de Galien.....	101

Liste des tableaux et des figures

Tableaux

Tableau 1 : Classification simplifiée des hémopathies malignes	20
Tableau 2 : Pathologies non malignes avec indication potentielle d'allogreffe de CSH	21
Tableau 3 : Echelle de Glucksberg évaluant la GVHa	27
Tableau 4 : Récapitulatif des méthodes d'étude du chimérisme : avantages et inconvénients.....	35
Tableau 5 : Préparation du mix réactionnel pour étude des VNTR.....	46
Tableau 6 : Préparation du mix réactionnel pour étude des STR.....	48
Tableau 7 : Préparation du mix réactionnel pour typage pré-allogreffe par chimie TaqMan®	53
Tableau 8 : Préparation du mix réactionnel pour suivi post-allogreffe par chimie TaqMan®	54
Tableau 9 : Caractéristiques de la cohorte.....	59
Tableau 10 : Corrélation entre pourcentage de chimérisme obtenus par PCR quantitative en temps réel par chimie TaqMan® et étude des VNTR ou des STR.....	60
Tableau 11 : Effectifs des patients allogreffés pour aplasie médullaire	65
Tableau 12 : Profil de chimérisme des patients allogreffés pour aplasie médullaire	65
Tableau 13 : Suivi de chimérisme à J30 et à J100 en fonction de la survenue d'une GVH ou non	66
Tableau 14 : Répartition des patients allogreffés pour hémopathie maligne, en fonction du type de greffe et de greffon	67
Tableau 15 : Richesse cellulaire en fonction du type de greffon	67
Tableau 16 : Suivi de chimérisme à J30 et à J100 en fonction du type de conditionnement	68
Tableau 17 : Caractéristiques des patients allogreffés pour hémopathie maligne en fonction du type de conditionnement.....	70
Tableau 18 : Pourcentages de chimérisme à J30 sur sang total en fonction de la survenue d'une GVHa ou non	72
Tableau 19 : Pourcentages de chimérisme à J30 sur sang total et sur population lymphoïde T en fonction du caractère génoidentique ou phénoïdentique du donneur par rapport au receveur	73
Tableau 20 : Richesse du greffon en cellules CD3+ et CD34+ en fonction du chimérisme.....	74
Tableau 21 : Pourcentages de chimérisme à J30 et à J100 sur sang total et sur population lymphoïde T en fonction de la survenue d'une GVHa ou non	75
Tableau 22 : Pourcentages de chimérisme à J100 en fonction de la survenue ou non d'une rechute	76
Tableau 23 : Pourcentages de chimérisme à J30 en fonction du type d'hémopathie, myéloïde ou non	77
Tableau 24 : Pourcentages de chimérisme à J100 en cas de rechute, en fonction du type d'hémopathie, myéloïde ou non.....	77
Tableau 25 : Pourcentages de chimérisme à J30 et à J100 en fonction des évènements post-allogreffe	78
Tableau 26 : Caractéristiques des patients ayant bénéficié de DLI.....	81

Figures

Figure 1 : Répartition des indications d'allogreffe en 2015.	23
Figure 2 : Algorithme de choix du greffon.....	24
Figure 3 : Déroulement schématique du processus d'allogreffe de CSH.....	26
Figure 4 : Physiopathologie de la GVH	28
Figure 5 : Schéma d'équilibre à obtenir en termes d'immunosuppression dans l'allogreffe	29
Figure 6 : Principe général du tri cellulaire sur automate Robosep™	45
Figure 7 : Exemple de typages non informatifs et informatifs pour l'étude des VNTR.....	47
Figure 8 : Exemple d'un marqueur VNTR étudié en suivi de chimérisme	47
Figure 9 : Exemple du profil électrophorétique obtenu pour l'allelic ladder, pour les loci marqués à la fluorescéine	49
Figure 10 : Profils électrophorétiques possibles d'un couple donneur/receveur.....	50
Figure 11 : Principe de la PCR quantitative par chimie TaqMan®	51
Figure 12 : Exemple de courbe d'amplification en PCR quantitative en temps réel TaqMan® allèle-spécifique pour le gène <i>MLH1</i>	52
Figure 13 : Exemple de résultat d'une plaque TaqMan® pour typage pré-allogreffe.....	53
Figure 14 : Exemple de résultat d'une plaque TaqMan® en suivi post-allogreffe	54
Figure 15 : Arbre décisionnel de choix de technique pour le suivi de chimérisme post-allogreffe au laboratoire.....	56
Figure 16 : Pourcentages de chimérisme obtenus par étude des STR ou des VNTR par rapport aux résultats compris entre 10 et 90% donneur par chimie TaqMan®	61
Figure 17 : Pourcentages de chimérisme obtenus par étude des STR ou des VNTR en fonction des résultats supérieurs à 90% donneur par chimie TaqMan®	62
Figure 18 : Différences des pourcentages de chimérisme obtenus par étude des VNTR ou STR – pourcentages obtenus par R quantitative, en fonction de la quantité d'ADN post-allogreffe.....	63
Figure 19 : Proportion des patients avec chimérisme mixte ou complet sur sang total.	69
Figure 20 : Survie sans rechute et survie globale en fonction du type de conditionnement	71
Figure 21 : Survie sans rechute et survie globale chez les patients ayant présenté ou non une GVHc	79
Figure 22 : Arbre décisionnel révisé de choix de technique pour le suivi de chimérisme post-allogreffe au laboratoire.....	84

Liste des abréviations

AHPA : Ateliers d'Harmonisation des Pratiques en Allogreffe
CC : Chimérisme Complet
CIR : Conditionnement d'Intensité Réduite
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CM : Chimérisme Mixte
CMV : Cytomégalovirus
CPA : Cellules Présentatrices d'Antigènes
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques
CSP : Cellules Souches Périphériques
Ct : *Cycle threshold*
DLI : *Donor Lymphocyte Infusion*
FISH : *Fluorescent In Situ Hybridization*
GVH : *Graft Versus Host*
GVHa : GVH aiguë
GVHc : GVH chronique
GVL : *Graft Versus Leukemia*
HLA : *Human Lencocyte Antigen*
ICT : Irradiation Corporelle Totale
ITK : Inhibiteur de Tyrosine Kinase
LA : Leucémie Aiguë
LAL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique
LAM : Leucémie Aiguë Myéloblastique
LLC : Leucémie Lymphoïde Chronique
LMC : Leucémie Myéloïde Chronique
LNH : Lymphome Non Hodgkinien
LHc : Lymphome de Hodgkin classique
LT : Lymphocytes T
LB : Lymphocytes B
L NK : Lymphocytes *Natural Killer*
MO : Moelle Osseuse
Pb : paire de base
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism*
RIHN : Référentiel des actes Innovants Hors Nomenclature de biologie et d'anatomocytopathologie
SAL : Sérum Anti-Lymphocytaire
SFGM-TC : Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire
SNP : *Single Nucleotide Polymorphism*
STR : *Short Tandem Repeats*
VNTR : *Variable Number Tandem Repeats*

Introduction

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) consiste à remplacer le système hématopoïétique du patient par celui d'un donneur sain. Dans les hémopathies malignes, il s'agit d'un traitement curatif, capable de détruire les cellules clonales tumorales. Cette thérapie nécessite un conditionnement pré-allogreffe du receveur et un contrôle immunologique post-allogreffe. La mortalité est alors élevée et peut être due à une rechute de la maladie, à une infection ou à une réaction immunitaire excessive du greffon contre les tissus normaux de l'hôte, appelée GVH pour *Graft Versus Host*.

Le chimérisme est défini chez le patient par le pourcentage de cellules d'origine donneur, dans le sang ou dans la moelle. L'objectif de ce travail est d'étudier l'apport du chimérisme après tri cellulaire, sur populations myéloïde et lymphoïde T. Il s'agit de préciser dans quel contexte son étude est la plus pertinente, en particulier en termes de prédiction de la GVH et de la rechute. Dix ans après une précédente étude menée au Centre Henri Becquerel, l'évolution des techniques de biologie moléculaire et des recommandations nous amène à reconsidérer les modalités du suivi de chimérisme, sur le plan technique et le calendrier de surveillance post-allogreffe.

1. L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

1.1. Hématopoïèse normale et hémopathies malignes

L'hématopoïèse correspond au processus de différenciation progressive de CSH en cellules sanguines matures. Logées dans la moelle osseuse, ces CSH sont capables d'autorenouveaulement et permettent une production continue de toutes les cellules circulantes sanguines. Ces CSH expriment le CD34, un marqueur membranaire impliqué dans l'adhérence des CSH au stroma médullaire. L'expression du CD34 est ensuite perdue au cours de la différenciation hématopoïétique normale. Ce marqueur est donc relativement spécifique des CSH, ce qui permet leur purification et leur étude par sélection des cellules CD34+ parmi l'ensemble des cellules hématopoïétiques nucléées, CD45+.

En hématologie, à chaque type cellulaire physiologique correspond un équivalent tumoral, une hémopathie. Ces hémopathies sont plus ou moins agressives et classées selon la classification OMS 2008 et sa révision 2016 (Tableau 1).

Hémopathies myéloïdes	Hémopathies lymphoïdes
Syndromes myéloprolifératifs (SMP) : <ul style="list-style-type: none">- Leucémie myéloïde chronique (LMC)- Polyglobulie de Vaquez- Thrombocytémie essentielle- Myélofibrose primitive Syndromes myélodysplasiques (SMD) SMP/SMD dont la Leucémie MyéloMonocytaire Chronique (LMMC)	Lymphomes non hodgkiniens B (LNH-B) dont la Leucémie lymphoïde chronique (LLC) Myélome multiple (MM) Lymphome de Hodgkin classique (LHc) Lymphomes non hodgkiniens T (LNH-T)
Leucémies aiguës myéloblastiques (LAM)	Leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B) Leucémies aiguës lymphoblastiques T (LAL-T)

**Tableau 1 : Classification simplifiée des hémopathies malignes
d'après la classification OMS 2008 (Swerdlow et al., 2008)**

1.2. Définition et principes de l'allogreffe

L'allogreffe de CSH est le seul traitement potentiellement curatif dans certaines hémopathies malignes de mauvais pronostic. L'objectif de l'allogreffe est de remplacer le système hématopoïétique du patient par celui d'un donneur sain, intrafamilial ou anonyme. Dans le cas des hémopathies malignes, l'objectif principal est de détruire toutes les cellules clonales tumorales. L'indication à l'allogreffe concerne alors principalement les hémopathies malignes à haut risque de rechute (leucémies aiguës (LA), lymphomes agressifs, MM en rechute et LMC échappant aux traitements), pour lesquelles l'allogreffe de CSH est le seul traitement permettant une potentielle guérison.

L'allogreffe de CSH constitue également une thérapeutique envisagée dans des pathologies non malignes (Tableau 2), pour lesquelles le seul objectif est alors de suppléer une hématopoïèse inefficace (hémoglobinopathies, aplasies médullaires), un système immunitaire déficitaire (déficits immunitaires congénitaux) ou un déficit enzymatique (maladies héréditaires métaboliques), sans pour autant détruire l'ensemble des cellules hématopoïétiques du patient.

Hémopathies non malignes	Pathologies non hématologiques
Aplasies médullaires <ul style="list-style-type: none">- Constitutionnelles (anémie de Fanconi, dyskératose congénitale, anémie de Blackfan Diamond, ...)- Acquises idiopathiques- Acquises avec clone d'hémoglobinurie paroxystique nocturne (HPN)	Déficits immunitaires congénitaux
Hémoglobinopathies <ul style="list-style-type: none">- Drépanocytoses sévères avec crises vasoocclusives récurrentes, syndrome thoracique aigu, complications cérébrales, rénales, oculaires, ou alloimmunisation post-transfusionnelle- β-thalassémies majeures	Maladies héréditaires métaboliques

Tableau 2 : Pathologies non malignes avec indication potentielle d'allogreffe de CSH

L'usage de l'allogreffe en thérapeutique humaine a été rendu possible dès la fin des années 1970. D'une part, les conditionnements pré-greffe ont été optimisés, avec des chimiothérapies à haute dose associées ou non à de la radiothérapie. L'objectif est alors d'éradiquer la tumeur et/ou de détruire le système immunitaire du receveur (Thomas *et al.*, 1975a, 1975b, 1979). Dans le cas des pathologies non malignes, un conditionnement atténué est suffisant, seule l'immunosuppression étant recherchée. D'autre part, Dausset *et al.* ont découvert qu'un complexe unique était responsable de la majorité des réactions d'immunisation post-greffe cutanée, le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH), également appelé système HLA (*Human Leucocyte Antigen*) (Dausset *et al.*, 1970).

L'un des principaux facteurs de succès d'une greffe est la compatibilité de ce système HLA entre le donneur de CSH et le receveur. Ce système est responsable de la présentation antigénique dans le système immunitaire et se caractérise par des polymorphismes propres à chacun, responsables d'une très grande diversité. Sa découverte a permis la mise en place d'allogreffes entre individus histocompatibles, dits HLA compatibles. La greffe est dite génoidentique, si le donneur est issu de la même fratrie que le receveur et partage les mêmes allèles que lui. Si le donneur et le receveur n'ont en commun que 50% de leurs allèles, la greffe est dite haploidentique, il peut s'agir d'un frère, d'une sœur, d'un parent ou d'un enfant. Enfin, on parle de greffe phénoïdentique s'il s'agit d'un donneur volontaire non apparenté, présentant des caractéristiques phénotypiques similaires au receveur, sans qu'il ait une correspondance parfaite de la totalité des gènes du CMH. En pratique, chaque allèle des loci *HLA-A*, *HLA-B*, *HLA-C*, *HLA-DR* et *HLA-DQ* doit être compatible, ce qui correspond à 10 marqueurs. En absence de donneur génoidentique ou phénoïdentique compatible pour l'ensemble des marqueurs HLA recherchés, il est possible de réaliser une greffe phénoïdentique avec *mismatch* pour un ou deux marqueurs, c'est-à-dire compatible pour 8 ou 9 marqueurs/10.

Les greffes génoidentiques et phénoïdentiques sont considérées comme équivalentes, et correspondent à des greffons dits conventionnels. Les greffes haploïdentiques sont davantage immunogènes et actuellement en plein développement. Elles sont considérées comme des greffes alternatives, en absence de donneur intrafamilial génoidentique (Ruggeri *et al.*, 2015). A noter qu'un donneur apparenté est privilégié pour certaines indications de greffe (Figure 1). En plus de cette compatibilité HLA, le choix du donneur dépendra également de l'âge, du poids, du groupe sanguin ABO, du sexe et du statut Cytomégalovirus positif ou négatif (CMV) du donneur et du receveur.

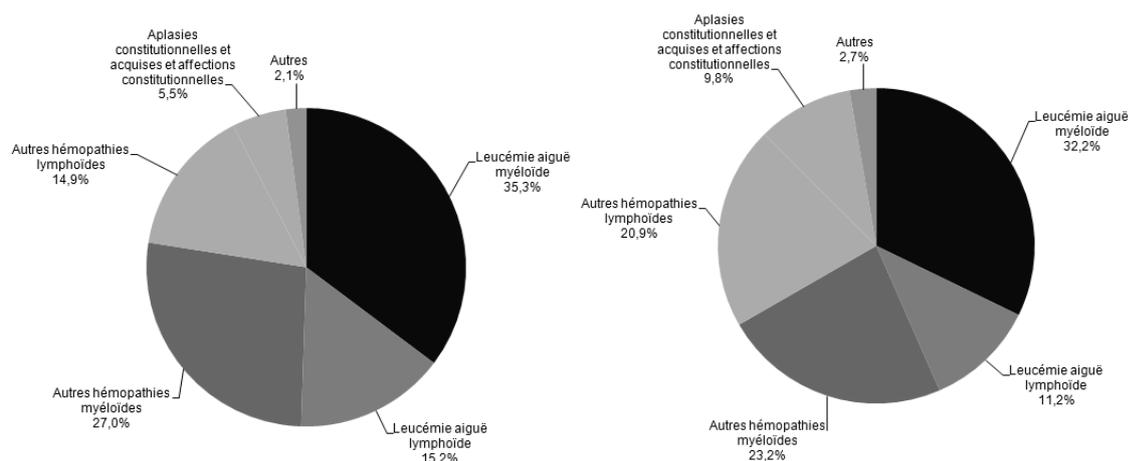


Figure 1 : Répartition des indications d'allogreffe en 2015.
Avec donneur non apparenté à gauche (n=964 patients) et apparenté à droite (n=910 patients) d'après le rapport d'activité 2015 de l'Agence de Biomédecine, parmi les patients dont les données sont saisies dans la base de données PromiSe (Projet manager Internet Server).

1.3. Type de greffon

Le greffon correspond à un prélèvement riche en CSH obtenu chez un donneur intrafamilial, ou issu de fichiers nationaux ou internationaux anonymes. Ces CSH peuvent être issues directement d'un prélèvement de moelle osseuse (MO) au niveau des crêtes iliaques, obtenu chez un adulte ou chez un enfant sous anesthésie générale. Des CSH peuvent également être obtenues à partir d'un prélèvement sanguin. Après stimulation médullaire du donneur par le facteur de croissance hématopoïétique spécifique de la lignée granulocytaire ou *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (G-CSF) pendant 4 à 5 jours, des CSH sont mobilisées et libérées dans la circulation sanguine ; on parle alors de greffon issu de cellules souches périphériques (CSP). Ces CSP sont prélevées par cytophérèse des cellules CD34+ puis cryopréservées. Depuis 2004, la source principale de greffons allogéniques est le sang périphérique en France (67% en 2015, contre 56,8% en 2012, d'après les rapports d'activité de l'Agence de Biomédecine).

A côté des greffes haploidentiques, un autre type de greffe utilise des greffons alternatifs, les unités de sang placentaire (USP) (Barker *et al.*, 2005). Ces USP sont des poches de sang issu du placenta, prélevé à la naissance à partir d'une veine du cordon ombilical, dans certaines maternités participantes agréées. Ces USP sont alors cryopréservées afin d'alimenter le fichier national, et une allogreffe de CSH est alors possible à partir de 2 de ces USP chez l'adulte. Alors que 10 marqueurs doivent être compatibles pour un greffon issu de MO ou de CSP, seuls 6 marqueurs (chaque allèle des loci *HLA-A*, *HLA-B* et *HLA-DR*) sont indispensables avec ce type de greffon. En absence de compatibilité sur les 6 marqueurs, il est possible de réaliser une greffe avec *mismatch* sur un ou deux marqueurs, c'est-à-dire compatible pour 4 ou 5 marqueurs/6. A noter qu'à l'inverse des autres types d'allogreffes, les greffes d'USP ne permettent pas de proposer l'injection de lymphocytes du donneur, en post-allogreffe. Ce procédé de *Donor Lymphocyte Infusion* (DLI) sera détaillé plus tard. Ce type de greffon est de moins en moins utilisé : 6,4% des allogreffes totales en 2015, contre 11,5% en 2012 en France, selon l'Agence de Biomédecine.

Globalement, les greffes intrafamiliales sont privilégiées. En absence de donneur génoidentique, un donneur phénoidentique sera recherché, et si la compatibilité n'est pas suffisante, des greffes alternatives haploidentiques ou avec greffon issu d'USP sont envisagées (Figure 2).

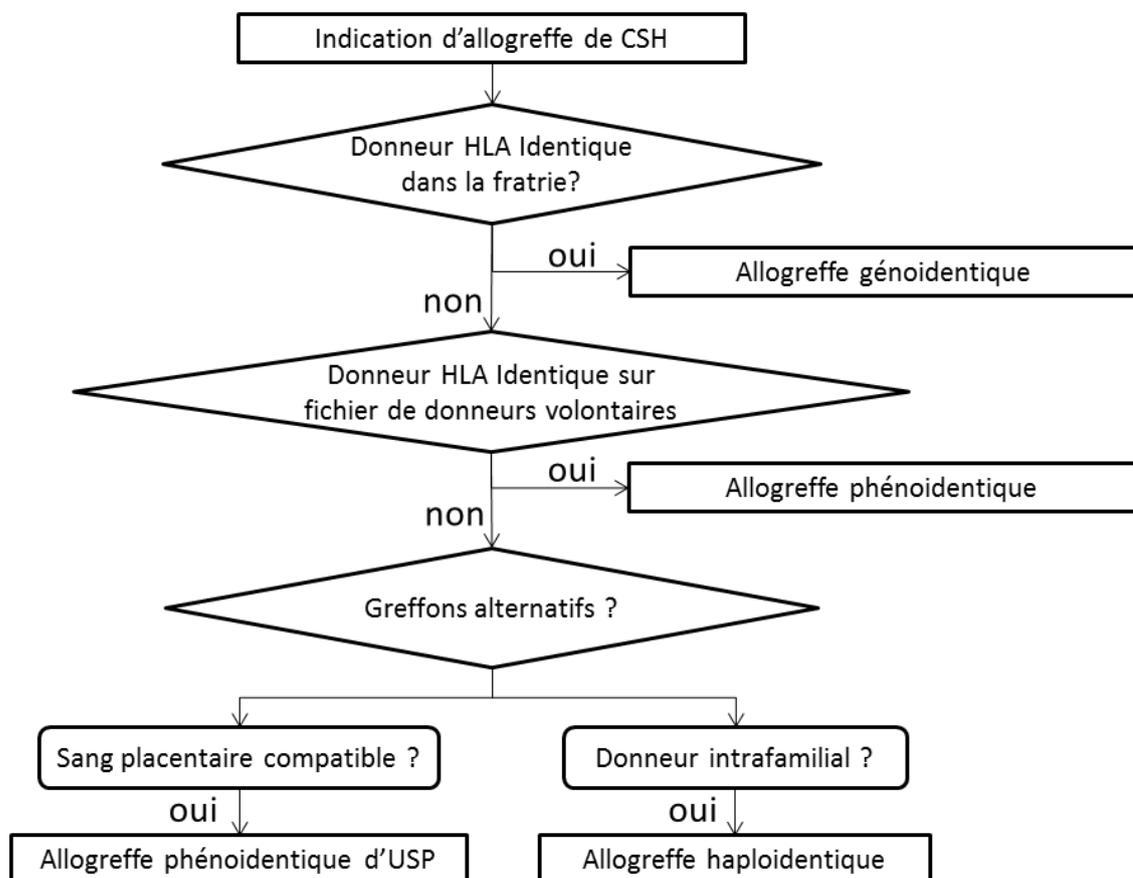


Figure 2 : Algorithme de choix du greffon
Adapté de Michallet, 2011.

1.4. Conditionnements pré-greffe

Comme évoqué précédemment, l'objectif du conditionnement pré-greffe est de détruire tout ou une partie des cellules médullaires du patient pour assurer l'espace médullaire suffisant au greffon. La destruction des cellules hématopoïétiques du patient permet également de détruire les cellules immunocompétentes, qui détruiraient sinon le greffon. Le greffon va par la suite reconstituer l'hématopoïèse normale ainsi qu'un système immunitaire efficace, à partir des CSH du donneur. Dans le cas contraire, la greffe est un échec.

Les premiers conditionnements à avoir été mis en place sont les conditionnements myéloablatifs, également appelés conditionnements conventionnels, ou standards. Il s'agit généralement d'une conjonction d'une irradiation corporelle totale (ICT) à du cyclophosphamide haute dose (Clift *et al.*, 1994; Thomas *et al.*, 1979). Les associations busulfan et cyclophosphamide ou fludarabine (Socié *et al.*, 2001) sans ICT, sont également utilisées. D'autres protocoles de conditionnement standard proposent une irradiation médullaire totale ciblant le compartiment médullaire afin d'augmenter la dose médullaire délivrée.

Des alternatives à ces conditionnements standards consistent à mettre en place un conditionnement atténué à toxicité moindre. Les indications sont par conséquent élargies aux personnes plus âgées, à des personnes présentant des comorbidités ou ayant déjà bénéficié d'une radiothérapie et aux pathologies non malignes. Le principe est alors d'utiliser une chimiothérapie moins intensive, suffisante pour une prise du greffon, mais ne permettant pas de détruire entièrement les cellules tumorales. Les cellules tumorales résiduelles sont alors détruites par le nouveau système immunitaire, issu du donneur (Aoudjhane *et al.*, 2005; Hegenbart *et al.*, 2006). On utilise le fait qu'aucune compatibilité entre donneur et receveur n'est complète pas à 100%, et qu'il existe toujours une part d'incompatibilité, qui est alors mise à profit. En effet, le système immunitaire qui émerge post-greffe présente un potentiel immunologique contre les cellules du patient, et notamment contre les cellules tumorales résiduelles. Ce phénomène est appelé effet du greffon contre l'hôte, ou *Graft versus Host* (GVH), s'il se solde par des effets indésirables, principalement T-médiés (Korngold and Sprent, 1978). S'il cible les cellules tumorales résiduelles, on l'appelle alors effet du greffon contre la leucémie (ou toute autre hémopathie) ou *Graft versus Leukemia* (GVL) (Bleakley and Riddell, 2004; Horowitz *et al.*, 1990). Cet effet GVL est indispensable à la guérison d'une hémopathie, l'allogreffe de CSH est donc une immunothérapie. C'est également la raison pour laquelle l'allogreffe de CSH entre jumeaux monozygotes, appelée greffe syngénique, n'est jamais réalisée du fait d'une compatibilité immunologique parfaite. Aucun effet GVH/GVL n'est alors possible. De surcroît, ces greffes ne sont pas proposées car le jumeau monozygote donneur

présente un risque augmenté de développer le même type d'hémopathie que le receveur. Compte tenu du risque de rejet et des effets indésirables liés à la GVH, des traitements immunosuppresseurs sont instaurés post-greffe. L'objectif est de maintenir un équilibre entre un effet GVL suffisant et des manifestations de GVH acceptables, tout en maintenant le greffon fonctionnel (Horowitz *et al.*, 1990).

Parmi les conditionnements atténués, on distingue les conditionnements d'intensité réduite (CIR) qui consistent à réduire les doses administrées dans les conditionnements standards et les conditionnements non myéloablatifs (CNMA) uniquement immunosuppresseurs. Les CIR ont également été déclinés sous des schémas séquentiels (Schmid *et al.*, 2005). Les CNMA, uniquement immunosuppresseurs, utilisent des ICT à dose réduite associées à de la fludarabine ou du cyclophosphamide (Blum *et al.*, 2002; Hegenbart *et al.*, 2006). D'autres CNMA n'incluent pas d'ICT mais de la fludarabine, du busulfan et du sérum anti-lymphocytaire (SAL) (Slavin *et al.*, 1998), ou des variantes remplaçant le busulfan par un autre agent alkylant (Kröger *et al.*, 2006). Dans le cas particulier des greffes à partir d'USP, des protocoles dédiés de CIR associent le plus souvent ICT, fludarabine et cyclophosphamide (Barker *et al.*, 2005; Cutler *et al.*, 2011).

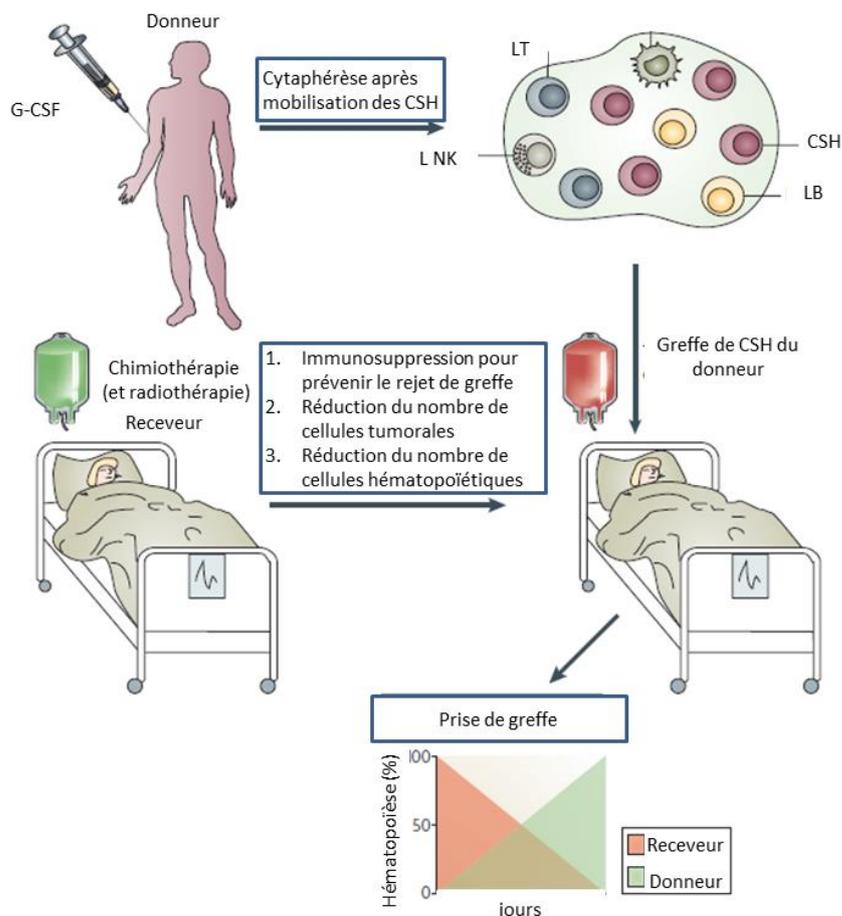


Figure 3 : Déroulement schématique du processus d'allogreffe de CSH

LT : Lymphocyte T, L NK : Lymphocyte NK, LB : Lymphocyte B, CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques, G-CSF : Granulocyte-Colony Stimulating Factor. Adapté de Shlomchik, 2007.

1.5. Complications et suivi post-greffe

Malgré une amélioration constante de la prise en charge, les allogreffes de CSH restent un traitement extrêmement lourd, avec une mortalité liée principalement aux rechutes, aux infections et à la GVH. Le risque infectieux est important immédiatement après la greffe, lorsque le patient est encore en aplasie, mais également durant toute la première année post-allogreffe, le temps de reconstitution d'une immunité efficace, du fait des traitements immunosuppresseurs au long cours. Le patient est également sujet aux réactivations de virus quiescents, tels que le CMV et le virus d'Epstein-Barr. A noter, que l'échec de prise de greffe est maintenant rarissime dans les hémopathies malignes, notamment grâce à la déleucocytation du greffon.

En post-transplantation immédiate, l'immunité du patient est liée aux lymphocytes T (LT) et aux lymphocytes *Natural Killer* (L NK) issus du greffon et aux cellules présentatrices d'antigènes (CPA) du receveur, qui persistent dans les tissus. La réaction immune est alors puissante et correspond à l'effet GVH (Ferrara and Reddy, 2006; Shlomchik, 2007). La reconstitution immunologique qui suit cette période de post-transplantation immédiate implique la production de LT et de CPA issues du donneur. Elle est lente et progressive, la fonction thymique étant réduite ou absente chez l'adulte (Tsutsumi *et al.*, 2004). La reconstitution immunitaire et la GVH sont également associées à la richesse du greffon en cellules CD34+, source sur le long terme de cellules hématopoïétiques dont les CPA et les L NK (Panse *et al.*, 2005). La GVH est également liée à la richesse du répertoire T transféré, les lymphocytes T régulateurs limitant la GVH (Rezvani *et al.*, 2006).

On distingue généralement les réactions de GVH aiguë (GVHa) survenant les 100 premiers jours post-greffe, des réactions de GVH chronique (GVHc). La GVHa serait provoquée par des CPA du receveur et se traduit par des réactions principalement tissulaires cutanées et gastro-intestinales. La gravité de cette GVHa peut être évaluée par l'échelle de Glucksberg, d'un stade 0 correspondant à une absence de GVHa, à un score IV, de GVHa sévère, comme présenté dans le tableau 3 (Thomas *et al.*, 1975b). La GVHa de score I correspond à des manifestations modérées, difficiles à évaluer et n'affectant que l'organe cutané, tandis que les GVHa de score supérieur présentent des signes majeurs, plus facilement objectivables.

Score global de Glucksberg	I	II	III	IV
Peau	1-2	1-3	2-3	2-4
Tube digestif	0	1	2-3	2-4
Foie	0	1	2-4	2-4

Tableau 3 : Echelle de Glucksberg évaluant la GVHa

La GVHc est plus polymorphe, avec une évolution progressive pouvant évoquer un maladie auto-immune cutanée, notamment de type sclérodermiforme, digestive, hépatique ou pulmonaire (Shlomchik, 2007). Les lymphocytes B (LB) résiduels du receveur peuvent être impliqués dans ces réactions de GVHc.

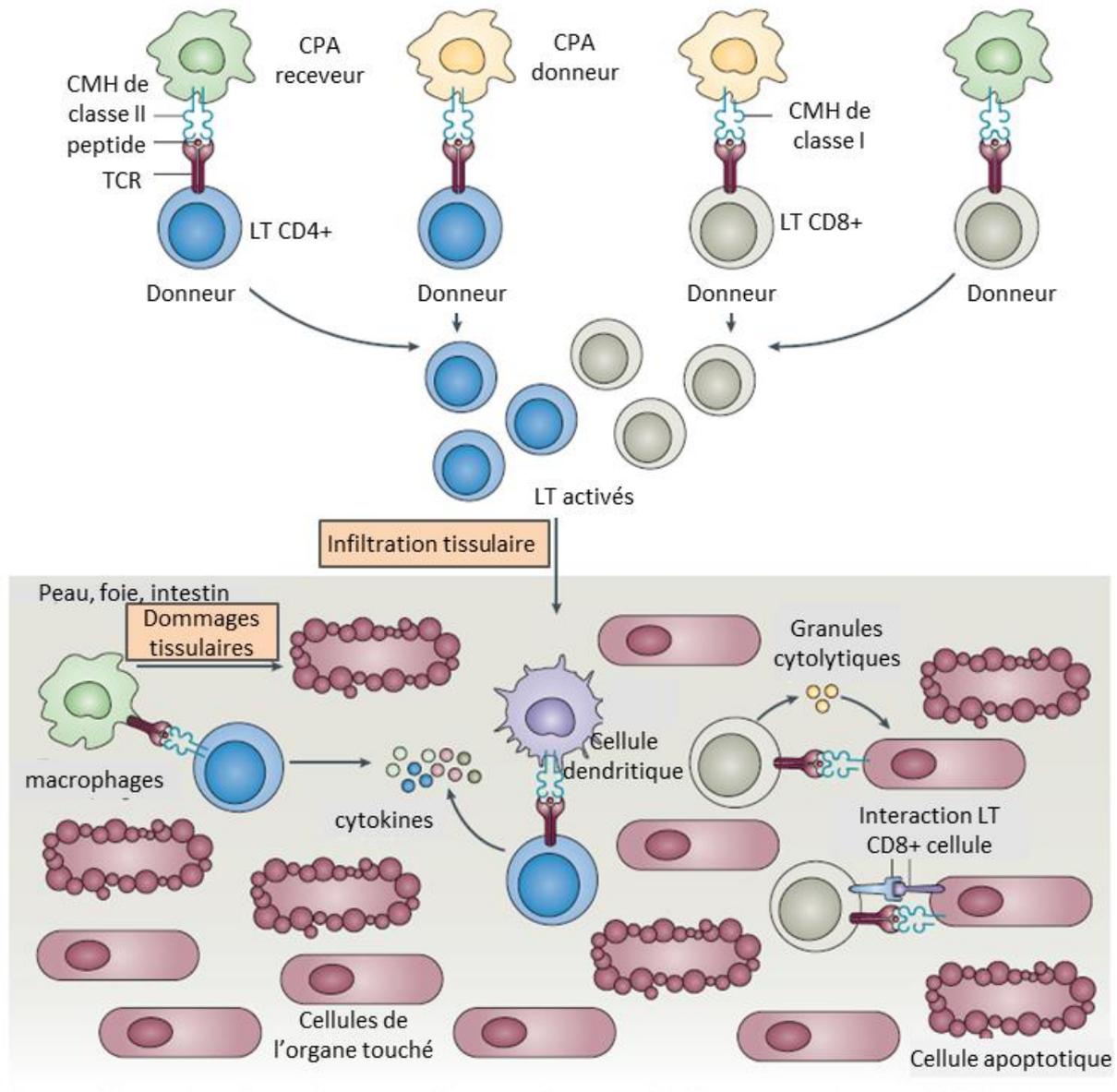


Figure 4 : Physiopathologie de la GVH

Les LT cytotoxiques CD8+ du donneur interagissent avec les CPA via le CMH de classe I, les LT auxiliaires CD4+ via le CMH de classe II, ce qui entraîne leur activation. Après infiltration tissulaire, les LT CD4+ activés interagissent toujours grâce au CMH de classe II avec les macrophages et les cellules dendritiques du receveur. Ils vont recruter ces macrophages et libérer des cytokines proinflammatoires. Les LT CD8+ activés interagissent directement avec les cellules de l'organe touché et libèrent in situ des enzymes cytolitiques. L'ensemble de ces mécanismes conduit aux dommages tissulaires rencontrés dans la GVH. Adapté de Shlomchik, 2007.

La difficulté principale est de maintenir une balance GVH-GVL assurant l'immunothérapie de la GVL sans compromettre la qualité de vie du patient. La prise en charge post-greffe est basée sur une modulation de l'alloréactivité, via des traitements immunosuppresseurs au long cours (ciclosporine, tacrolimus, mycophénolate mofétil) dont les doses sont progressivement réduites. En cas d'évolution potentielle de l'hémopathie, avec risque de rechute, il est alors possible de diminuer l'immunosuppression ou de proposer des injections d'IL-2 ou de lymphocytes du donneur, les DLI (Slavin *et al.*, 1996). Cette approche est possible plus tardivement, alors qu'une diminution du traitement immunosuppresseur n'est possible que précocement après la greffe, les immunosuppresseurs étant progressivement interrompus. L'objectif est de déclencher un effet GVL par activité immunologique antitumorale des lymphocytes T du donneur (Kolb, 1998). L'apport des DLI a d'abord été démontré chez les patients allogreffés pour LMC, avec un effet GVL pour des doses inférieures à l'effet GVH (Kolb *et al.*, 1995; Mackinnon *et al.*, 1995). Ils sont maintenant utilisés dans tout type d'hémopathie, bien que leur efficacité paraisse réduite, notamment dans les LAM (Schmid *et al.*, 2007, 2008). L'efficacité des DLI peut se maintenir du fait de la durée de vie prolongée des lymphocytes T. Il apparaît que les DLI contiennent un répertoire T varié, avec des sous-populations T au rôle différent, voire antagoniste. L'usage de DLI déplétés en lymphocytes T régulateurs a ainsi montré une meilleure efficacité pour obtenir une rémission prolongée (Maury *et al.*, 2010). L'intérêt de l'ensemble de ces traitements immunomodulateurs est d'intégrer une certaine flexibilité dans la prise en charge post-allogreffe et de s'adapter au rythme de récupération immune du donneur.

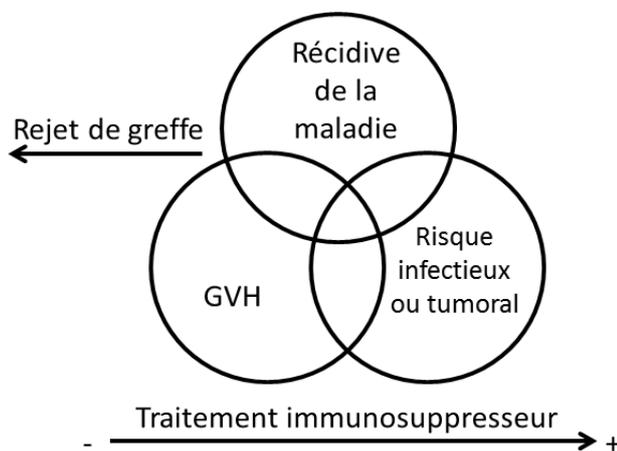


Figure 5 : Schéma d'équilibre à obtenir en termes d'immunosuppression dans l'allogreffe

En post-allogreffe, un traitement antitumoral est aussi de plus en plus ajouté, dans le cas des hémopathies disposant de thérapies relativement ciblées, les inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) dans la LMC et les LAL Phi+ (Chen *et al.*, 2012), et les agents déméthylants dans les SMD et les LAM (de Lima *et al.*, 2010). Cette approche permet de contrôler la prolifération de cellules tumorales résiduelles.

2. Le chimérisme donneur-receveur

2.1. Définition du chimérisme

Une chimère est dans la mythologie grecque une créature hybride fabuleuse, avec une tête de lion, un corps de chèvre et une queue de serpent. Par analogie, l'usage médical de ce terme désigne la coexistence dans un même organisme de cellules issues de deux organismes différents, de la même espèce ou non, obtenue spontanément ou artificiellement, notamment dans des contextes foeto-maternels ou post-transplantatoires (Khan *et al.*, 2004).

Dans l'allogreffe de CSH, le chimérisme est défini chez le patient receveur par le pourcentage de cellules d'origine donneur, soit dans le sang, soit dans la moelle (Bader *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2004). Un chimérisme complet (CC) est alors caractérisé par un remplacement total de l'hématopoïèse du patient par celle du donneur, et un chimérisme mixte (CM) par la persistance des deux types de cellules. Pour la suite de cette étude, une augmentation du pourcentage de chimérisme désigne une augmentation du pourcentage de cellules issues du donneur, avec un CM s'approchant d'un CC. Un CM peut avoir 2 significations différentes : soit il s'agit de cellules matures normales du patient, ayant survécu au conditionnement ou ayant mûri à partir de cellules souches hématopoïétiques résiduelles du receveur ; soit il s'agit de cellules malignes résiduelles ayant survécu au conditionnement et pouvant provoquer une rechute. Un CM peut donc correspondre à une situation de réaction immunitaire plus ou moins stable, à une perte du greffon ou à une rechute de l'hémopathie (Bretagne *et al.*, 1987; Petz *et al.*, 1987). Un CM très précoce serait généralement expliqué par la persistance de cellules normales de l'hôte, et non par la présence de cellules malignes. En effet, l'équilibre entre des cellules hématopoïétiques du receveur et du donneur n'est généralement que provisoire, et l'hématopoïèse du donneur remplace progressivement l'hématopoïèse du receveur grâce à l'immunosuppression induite par le conditionnement pré-allogreffe puis par les traitements immunosuppresseurs post-allogreffe.

Le seuil à partir duquel on considère un chimérisme comme complet dépend de la sensibilité de la technique. Les méthodes peu sensibles ne permettent pas de différencier un chimérisme à 90% donneur d'un chimérisme à 95% donneur. La difficulté est de définir un seuil qui soit pertinent du point de vue médical, mais aussi évaluable par la technique utilisée. En général, on considère un CC si le pourcentage de cellules issues du donneur est supérieur à 95% donneur. Cependant, ce seuil dépend aussi de la maladie et de la sous-population étudiée ; on peut considérer un CM pour toute détection fiable d'un marqueur du receveur, même très faible, suivant la technique utilisée (Antin *et al.*, 2001). Pour évaluer ce chimérisme, l'analyse se fonde sur un ou plusieurs marqueurs informatifs

qui doivent être différents entre le donneur et le receveur (Bader *et al.*, 2005; Khan *et al.*, 2004; Thiede, 2004). Plusieurs types de marqueurs ont successivement été utilisés, tels que les groupes sanguins du système ABO, le sexe du patient en cas de greffe avec un donneur de sexe opposé et certains polymorphismes génétiques ou protéiques. L'informativité d'un marqueur est définie par la possibilité d'utiliser ce marqueur chez le plus grand nombre de patients. A titre d'exemple, le sexe du patient est un marqueur peu informatif, car limité aux greffes entre individus de sexe opposé.

2.2. Techniques d'analyse du chimérisme

2.2.1. Techniques historiques

L'analyse des polymorphismes protéiques a d'abord été envisagée sur la base des antigènes érythrocytaires, des isoenzymes érythrocytaires ou leucocytaires, des isotypes d'immunoglobulines, ou des antigènes HLA. Ces techniques étaient chronophages, faiblement informatives ou étudiant une seule lignée. Elles étaient généralement non informatives en cas de transfusion sanguine (Baron and Sandmaier, 2006; Khan *et al.*, 2004).

La cytogénétique conventionnelle a permis de développer une approche génétique, par détection soit du sexe du patient et du donneur, soit d'anomalies spécifiques de la maladie (Chromosome Philadelphie dans la LMC). Cette technique est peu informative, peu sensible (5-10%) et non quantitative du fait de la culture (Baron and Sandmaier, 2006). La FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) a amélioré cette approche par hybridation de sondes fluorescentes spécifiques de séquences portées par les chromosomes X et Y (Durnam *et al.*, 1989). Le grand nombre de cellules analysées par rapport à la cytogénétique conventionnelle permet une quantification plus précise (sensibilité inférieure à 1%), ce qui a justifié le maintien de cette approche jusqu'au début des années 2000. Elle est cependant chronophage, coûteuse et peu informative, puisque ne concernant que les greffes entre individus de sexe opposé. De plus, la perte de l'Y, physiologique liée à l'âge ou pathologique au sein du clone tumoral, limite son emploi.

Des techniques de biologie moléculaire ont ensuite été proposées dont l'étude des RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), basée sur l'étude des polymorphismes de longueur des fragments de restriction au niveau de l'ADN (Blazar *et al.*, 1985; Ginsburg *et al.*, 1985). Une perte ou un gain d'un site de digestion d'une enzyme de restriction via la variation d'un nucléotide sur un locus donné, conduit à un ou deux fragments d'ADN de taille différente. Ces derniers sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose en fonction de leurs poids moléculaires. Cette technique a été utilisée avant l'avènement des techniques de *Polymerase Chain Reaction* (PCR); elle est semi-quantitative, peu sensible (5-10%) et très consommatrice en matériel.

2.2.2. Etude des séquences *Variable Number Tandem Repeats*

L'étude des VNTR (*Variable Number Tandem Repeats*) utilisant la PCR a ensuite supplanté cette approche et a permis l'essor du suivi de chimérisme (Knowlton *et al.*, 1986; van Leeuwen *et al.*, 1991; Min *et al.*, 1988; Thein *et al.*, 1986). Il s'agit de l'étude de variations du nombre de répétitions en tandem de séquences d'ADN, différentes d'un individu à l'autre (Mackinnon *et al.*, 1992; Thiede, 2004). Ces séquences dites « minisatellites » comportent 10 à 50 paires de bases (pb). Ces marqueurs, communément appelés « empreintes génétiques » ont été découverts en 1985 (Jeffreys *et al.*, 1985). Cette technique est chronophage et semi-quantitative, mais peu coûteuse.

2.2.3. Etudes des séquences *Short Tandem Repeats*

L'avènement de méthodes d'étude des STR (*Short Tandem Repeats*) par PCR a ensuite permis de perfectionner le suivi de chimérisme (Khan *et al.*, 2004). Comme pour l'étude des VNTR, il s'agit de l'étude de variations du nombre de répétitions en tandem de séquences d'ADN conservées, qui sont, cette fois, plus petites, comportant 3 à 7 pb répétées (Thiede *et al.*, 1999). On parle de séquences « microsattellites », réparties tout au long du génome humain. Le nombre de répétitions est hautement variable d'un individu à l'autre, avec un polymorphisme supérieur à 10^6 chez l'homme. Ils sont donc hautement informatifs. Ces marqueurs, sont également utilisés comme empreintes génétiques en médecine légale et pour les tests de paternité, car interprétables sur de faibles quantités d'ADN, même dégradé. Des kits commerciaux multiplexes ont été validés pour un tel usage, selon des critères judiciaires stricts, permettant une comparaison des résultats. Dans un contexte d'allogreffe, les faibles quantités d'ADN nécessaires permettent d'obtenir un résultat dès la période post-allogreffe immédiate, lorsque le patient est encore en aplasie, avec une moelle hypocellulaire.

Les sensibilités obtenues avec l'ensemble de ces techniques, même les plus sensibles (FISH et étude des STR), permettent uniquement un suivi de chimérisme mais pas un suivi optimal de maladie résiduelle, qui nécessite des sensibilités de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-5} (Baron and Sandmaier, 2006).

2.2.4. Etudes des polymorphismes par PCR quantitative

L'étude de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) par PCR quantitative en temps réel TaqMan® (ThermoFisher, Etats-Unis) est également très répandue. Les SNP sont des polymorphismes bialléliques par variation de 1 ou 2 pb. Ces SNP, ainsi que les insertions et délétions de petite taille, peuvent être détectés par PCR quantitative allèle-spécifique (Alizadeh *et al.*, 2002a; Jiménez-Velasco *et al.*, 2005). Il s'agit de la méthode la plus sensible actuellement utilisable en routine (0,001%-0,1%, soit 10^{-5} à 10^{-3}) (Baron and Sandmaier, 2006; Chen *et al.*, 2011). De nombreuses équipes ont développé des panels, l'informativité dépendant des marqueurs choisis, de leur nombre et de la population d'étude (Alizadeh *et al.*, 2002b; Chen *et al.*, 2011; Gineikiene *et al.*, 2009; Maas *et al.*, 2003). La quantification par cette méthode est donc très précise dans les faibles pourcentages, avec un usage potentiel en suivi de maladie résiduelle dans un contexte de conditionnement standard ou de conditionnement atténué, une fois le CC atteint. Cette possibilité est particulièrement intéressante chez les patients pour lesquels aucun marqueur de maladie résiduelle n'est possible. Cette technique est davantage consommatrice en échantillon que l'étude des STR et est limitée par une perte de sensibilité en cas de faible quantité d'ADN (Alizadeh *et al.*, 2002a; Maas *et al.*, 2003). L'usage de PCR nichée a été proposé afin d'augmenter la sensibilité et la précision de la PCR quantitative en temps réel. La quantité d'ADN nécessaire est alors divisée par 10, avec une sensibilité augmentée, grâce à une PCR en point final avant une PCR quantitative (Aloisio *et al.*, 2017).

2.2.5. Nouvelles techniques innovantes

L'essor de techniques innovantes, telles que le séquençage haut débit et la PCR digitale, ouvre à présent de nouvelles possibilités dans le suivi de chimérisme.

2.2.5.1. *Séquençage haut débit*

Deux technologies de séquençage haut débit sont utilisées à l'heure actuelle, qui reposent sur les principes de PCR et de séquençage historiquement utilisés, mais à une échelle miniaturisée, permettant d'analyser beaucoup plus de séquences à partir de très peu de matériel. La technologie Illumina® (Illumina, Etats-Unis) permet de réaliser une amplification clonale de séquences par PCR en clusters. Ces clusters sont créés sur un support solide de type lames de verre appelées *Flowcells*. Le séquençage est possible par détection de fluorescence lors de la synthèse du brin d'ADN. La technologie Ion Torrent® (ThermoFisher, Etats-Unis) est basée sur le principe de la PCR en émulsion. Chaque microgouttelette formée contient le milieu réactionnel nécessaire à une PCR et permet d'amplifier une séquence d'ADN fixée sur une bille. Le séquençage est possible par modification du pH lors de l'incorporation d'une nouvelle base. Certaines équipes ont mis au point des techniques de suivi de chimérisme par séquençage à haut débit, l'une d'entre elle avec un panel maison de 44 amplicons (séquences d'ADN amplifiées) pour la technologie Ion Torrent®, correspondant à 44 SNP. Ce panel a permis d'obtenir une moyenne de 16 allèles informatifs par patient, sur une cohorte de 10 individus, avec une limite de détection fixée à 1% (Aloisio *et al.*, 2016).

2.2.5.2. *PCR digitale*

Une autre technique innovante, la PCR digitale, serait particulièrement intéressante dans le suivi de chimérisme. Le principe de cette technologie est de partitionner l'échantillon suffisamment pour que statistiquement chaque copie d'ADN soit isolée, dans le milieu réactionnel nécessaire à la PCR. Ce partitionnement est en particulier possible en microgouttelettes, où chaque gouttelette se comporte comme un échantillon indépendant (George *et al.*, 2013). On parle alors de ddPCR pour *droplet digital PCR*. Statistiquement, la répartition des copies d'ADN suit une loi de Poisson, avec soit zéro copie d'ADN, soit une seule, soit plus, par microgouttelette (Sykes *et al.*, 1992). Cela permet de déduire une quantification absolue du nombre de copies du gène d'intérêt dans un échantillon. Une réaction de PCR en point final permet d'amplifier l'ADN et d'incorporer une sonde fluorescente allèle-spécifique. La lecture des microgouttelettes permet de différencier l'allèle muté de l'allèle sauvage, il s'agit ainsi d'une technique de PCR allèle-spécifique comme la PCR par chimie TaqMan® (George *et al.*, 2013). Toutefois, la PCR digitale est une technique de quantification absolue du nombre de copies de l'allèle muté, alors que la PCR quantitative par chimie TaqMan® ne permet

qu'une quantification relative à un gène de référence (George *et al.*, 2013). Avec cette technique, les quantités d'ADN nécessaires sont plus faibles, la limite de quantification est abaissée (< 0,01%) et il n'est pas nécessaire de réaliser de réplicats et de gamme de calibration (Sanders *et al.*, 2011; Stahl *et al.*, 2015). Dans le cadre d'un suivi de chimérisme, plusieurs équipes ont déjà mis à profit cette technique qui permet de détecter des SNP (Taira *et al.*, 2015), des insertions, des délétions (George *et al.*, 2013; Santurtún *et al.*, 2017; Stahl *et al.*, 2015) mais également la majorité des variations du génome humain, les CNV (*Copy Number Variation*) (Whitlam *et al.*, 2017).

Au final, de nombreuses techniques sont utilisables pour effectuer un suivi de chimérisme, avec des limites et des avantages variables (Tableau 4). Les plus répandues actuellement sont l'étude des STR et la PCR quantitative par chimie TaqMan®.

Méthode	Sensibilité (%)	Avantages	Inconvénients	Références
Antigènes érythrocytaires	1-5	Simple, précis	Limité à la lignée érythrocytaire	(Schaap <i>et al.</i> , 2000)
Antigènes HLA	Variable		Difficulté de détecter spécifiquement tous les allèles	
Cytogénétique	5-20		Faible sensibilité, chronophage Cellules entrées en mitose	(Offit <i>et al.</i> , 1990)
FISH X/Y	0,1-2	Grand nombre de cellules, peu de faux positifs	Seulement pour donneur-receveur de sexes opposés	(Kögler <i>et al.</i> , 1995)
RFLP	5-20	Grande informativité	Sensibilité modérée, chronophage	(Casarino <i>et al.</i> , 1992)
VNTR	5-20		Sensibilité modérée	
STR	1-5	Grande diversité des marqueurs, nombreux allèles Faible quantité d'ADN	Sensibilité suffisante, sauf pour suivi de maladie résiduelle Risque de contamination Coûteux	(Lion <i>et al.</i> , 2001)
PCR quantitative en temps réel	0,001-1	Temps de réalisation court Nombre de marqueurs élevé Sensibilité élevée (0.05%) Analyse aisée	Quantité d'ADN importante Nombreuses étapes techniques	(Alizadeh <i>et al.</i> , 2002a; Maas <i>et al.</i> , 2003)
NGS	1	Analyses en série	Nombreuses étapes techniques Risque de contamination Délai de rendu des résultats	(Aloisio <i>et al.</i> , 2016)
PCR digitale	0,01-0,5	Faible quantité ADN Possibilité de multiplexage des cibles	Nombreuses étapes techniques	(George <i>et al.</i> , 2013)

Tableau 4 : Récapitulatif des méthodes d'étude du chimérisme : avantages et inconvénients

2.3. Objectifs et évolution du chimérisme post-greffe

2.3.1. Suivi de chimérisme

Comme dit précédemment, le chimérisme est un paramètre qui dépend à la fois des phénomènes de prise de greffe, des réactions immunologiques de type GVH et GVL, et d'une éventuelle rechute. L'incidence et la valeur prédictive sur le devenir post-greffe, d'un CM ou d'un CC sont encore discutées, du fait de ces multiples facteurs. Il a été montré qu'un CC précoce permettrait une prise de greffe durable sans rejet. De plus, un effet GVL précoce serait plus efficace, grâce à l'alloréactivité des lymphocytes T donneur vis-à-vis des antigènes du receveur. A contrario, un CM traduirait une alloréactivité moindre, avec un risque de persistance ou de réémergence de cellules malignes du patient. Historiquement, le CM était considéré comme prédictif d'un rejet ou d'une rechute, mais ce concept a été pondéré (Choi *et al.*, 2000a; Huss *et al.*, 1996). Il a ainsi été montré que le pourcentage de chimérisme a tendance à augmenter avec le temps pour atteindre un CC (Choi *et al.*, 2000b). Des conversions tardives de CM en CC, des CM ponctuels, voire des CM prolongés et stables, n'auraient pas d'incidence sur le devenir post-allogreffe. Toutefois, si le pourcentage de chimérisme diminue, le taux de rechute est significativement plus important, un chimérisme décroissant précédant la rechute avec une médiane comprise entre 66 et 74 jours, s'étalant de 5 à 434 jours (Bader *et al.*, 2004; Barrios *et al.*, 2003; Jiménez-Velasco *et al.*, 2005). De même, un CM apparaissant après J100 serait un facteur de risque de rechute (Huss *et al.*, 1996)

La cinétique d'évolution apparaît comme un paramètre fondamental, puisque l'évolution du chimérisme post-greffe est un processus dynamique associant prise/rejet de greffe, GVH/GVL et rechute éventuelle (Bader *et al.*, 1996). Elle permettrait d'évaluer l'effet de nouveaux traitements (conditionnement, greffon, traitement immunosuppresseur) et d'orienter la stratégie thérapeutique (prédiction du rejet, de la non-réponse ou de la rechute). L'interprétation du chimérisme est différente selon le type de conditionnement, la fréquence de l'analyse, le type de pathologie, l'âge à la greffe et la sous-population cellulaire étudiée.

2.3.2. Greffes à conditionnements standards

Dans un contexte de greffe à conditionnement standard, un CC est attendu, possiblement précédé d'un CM transitoire dans 20 à 40% des cas, avec conversion en moins de 6 mois. Un CM persistant avec un fort pourcentage de cellules receveur ou un chimérisme décroissant sont prédictifs de rejet ou de rechute, chez l'enfant comme chez l'adulte (Bader *et al.*, 1998; Lawler *et al.*, 1991). Cependant, un CM serait compatible avec une survie sans maladie, si le pourcentage de cellules issues du receveur est relativement faible et stable (Lawler *et al.*, 1991; van Leeuwen *et al.*, 1994; Mangioni *et al.*, 1997) .

Différentes situations sont associées à un CM sur sang total, telles qu'une absence de GVHa ou une reconstitution retardée de la lignée granuleuse. Les patients présentant un CC présenteraient quant à eux plus de GVHc dans une cohorte de LA (Barrios *et al.*, 2003).

Le suivi de chimérisme serait surtout adapté aux hémopathies à croissance tumorale progressive, à coupler au suivi de maladie résiduelle (transcrits de fusion, réarrangements clonaux des gènes des loci *IGH* et *TCR*). Notamment, de nombreuses études ont été menées sur des patients allogreffés pour une LMC : l'étude de la lignée myéloïde est alors particulièrement intéressante, car reflétant la population tumorale, avec une association entre baisse du pourcentage de chimérisme dans la lignée myéloïde et risque de rechute ou de progression, notamment lorsque cette étude est couplée à l'analyse du transcrit BCR-ABL en PCR quantitative pour suivi de maladie résiduelle (Román *et al.*, 2000; Serrano *et al.*, 2000). C'est également dans la LMC qu'a été montré qu'un CM est plus fréquent si les doses d'ICT sont plus faibles (Huss *et al.*, 1996). Dans cette même étude, la survie sans rechute et la survie globale sont significativement augmentées en cas de CM. Ces études ont été menées avant l'émergence des traitements par ITK. L'allogreffe était alors la principale option thérapeutique après obtention d'une rémission, ce qui n'est plus le cas à l'heure actuelle, le recours à l'allogreffe étant à présent très minoritaire et réservé aux LMC évolutives ne répondant à aucun ITK.

Concernant les LA, la croissance tumorale étant rapide, une surveillance rapprochée du chimérisme et l'utilisation de techniques d'analyse sensibles sont souhaitables (Bader *et al.*, 2004) . Une diminution du chimérisme serait associée à une survie sans évènement et à une survie globale plus faibles par diminution de l'effet GVL (Bader *et al.*, 2004; Barrios *et al.*, 2003). Une diminution de l'immunosuppression ou l'usage de DLI permettraient alors de prévenir la rechute de LA (Bader *et al.*, 2004) ou de LMC (Gardiner *et al.*, 1997; Kolb, 1998; Serrano *et al.*, 2000), mais les études menées concernent peu de patients.

2.3.3. Greffes à conditionnements atténués

Dans les conditionnements d'intensité réduite, le chimérisme est initialement mixte et lié à une tolérance immunitaire (Baron and Sandmaier, 2006). Le risque de rejet de greffe est alors accru, et l'analyse des sous-populations CD3 et NK particulièrement intéressante (Baron and Sandmaier, 2006; Panse *et al.*, 2005). Deux cinétiques sont à distinguer, en fonction du type de conditionnement (Baron and Storb, 2006). Dans les conditionnements atténués immunosuppresseurs, de type ICT 2Gy et fludarabine, la prise de greffe est lente, et le CM se prolonge 3 à 6 mois, avec une conversion de la lignée M avant la lignée lymphoïde T (Baron *et al.*, 2004). A l'inverse, dans les CIR myéloablatifs, avec fludarabine associée au cyclophosphamide, au melphalan ou au busulfan, la prise de greffe est précoce (Carvallo *et al.*, 2004; Valcárcel *et al.*, 2003). Un CM est plus souvent retrouvé pour les faibles doses d'ICT ou en cas d'utilisation de ciclosporine en prophylaxie de la GVH (van Leeuwen *et al.*, 1994). A noter que certaines études ont objectivé une corrélation entre rechute et CM (Bader *et al.*, 1998, 2004; Girgis *et al.*, 2005) tandis que d'autres études ne l'ont pas confirmé, peut-être du fait d'une fréquence de suivi trop espacé. D'autre part, l'existence d'un CM prolongé peut favoriser le rejet et limiter l'effet GVL. Une adaptation du traitement immunomodulateur (arrêt de la ciclosporine, DLI) peut alors permettre d'atteindre un CC. Les résultats sont contradictoires en analyse de survie sans progression ou de survie globale.

2.3.4. Greffes pour pathologies non malignes

Les allogreffes pour pathologies non malignes ne nécessitent pas de conditionnement intensif, l'objectif n'étant pas de détruire l'hématopoïèse et le système immunitaire du receveur, mais d'obtenir une correction du/des déficit(s). Il est alors nécessaire de limiter au maximum les effets indésirables liés à la greffe, en particulier la toxicité et la GVHc à long terme, et il est préférable que le traitement soit inefficace par rejet et perte du greffon (Antin *et al.*, 2001; Bader *et al.*, 2005). Obtenir un CM stable est suffisant, et serait d'ailleurs le témoin d'une meilleure tolérance donneur-receveur : ainsi 50% des patients allogreffés pour aplasie présenteraient un CM, associé à un risque plus faible de présenter des signes majeurs de GVHa (Hill *et al.*, 1986; Huss *et al.*, 1996). De plus, un CM serait plus fréquent si le conditionnement est uniquement immunosuppresseur, par rapport aux conditionnements associant une ICT. Dans cette étude, nous ne nous intéresserons qu'aux aplasies médullaires acquises, puisqu'il s'agit d'une population d'adultes. Les indications de greffe pour déficit immunitaire, maladie héréditaire métabolique, thalassémie, drépanocytose et aplasie congénitale, sont très majoritairement pédiatriques.

2.3.5. Etude des sous-populations triées

Le tri cellulaire augmente la sensibilité de la technique, en permettant de détecter un faible nombre de cellules, qui seraient sinon diluées par d'autres populations prédominantes dans le sang total (van Leeuwen *et al.*, 1991). En effet, les lymphocytes ne représentant qu'une minorité des cellules circulantes, leur chimérisme ne peut être évalué que sur population triée. Le tri permettrait une meilleure prédiction du devenir post-allogreffe, la cinétique étant différente selon le sous-type cellulaire. Les tris sur populations T, NK, monocytaires et myéloïdes ont été décrits.

On parle de chimérisme dissocié si les différentes sous-populations ne présentent pas le même profil de chimérisme. Ainsi, il a été montré dans une cohorte de 15 patients ayant bénéficié d'un CNMA, qu'un CC est plus rapidement atteint dans les sous-populations T et NK que dans la lignée granuleuse, et que le CC dans la lignée B est toujours retardé (Childs *et al.*, 1999).

2.3.5.1. Chimérisme sur populations lymphoïdes T et NK

Le tri CD3+ est spécifique de la lignée lymphocytaire T et le tri CD56+ est utilisé pour la lignée lymphocytaire NK. Du point de vue du greffon, il a été montré qu'une greffe de CSP avec un greffon riche en monocytes, lymphocytes T et NK conférerait un plus haut niveau de chimérisme dans la lignée T (Baron *et al.*, 2004). De plus, l'âge du patient est un facteur à prendre en compte, un CM stable est plus fréquent avant 13 ans dans les lignées T et NK (Guimond *et al.*, 2000; van Leeuwen *et al.*, 1994). Le thymus serait impliqué dans le phénomène de tolérance donneur-receveur et son involution avec l'âge conduirait à un chimérisme plus élevé après 13 ans.

Cependant, un CM est également plus fréquent en cas de rejet précoce ou de rechute, en particulier en conditionnement atténué. Sur population lymphoïde T, un CM prolongé dans les pathologies myéloïdes est associé à plus de rechute (Mohty *et al.*, 2007) et un chimérisme bas à J14 dans la population lymphoïde T est associé à plus de rejets de greffe (Baron *et al.*, 2004), de même à J28 (Keil *et al.*, 2003; Matthes-Martin *et al.*, 2003). Sur la population NK, un CM à J28 est également associé à plus de rejet avec une plus grande significativité que sur population T (Matthes-Martin *et al.*, 2003) et un CM à J14 et J28 a un impact négatif sur la survie globale à 1 an (Miura *et al.*, 2006), tandis qu'un CC précoce est associé à une augmentation de la survie globale et de la survie sans progression (Baron *et al.*, 2004)

Un CM élevé T ou NK à J14 ou à J28 est également associé à un risque plus élevé de GVHa de score II à IV, quel que soit le type de donneur, en conditionnement standard ou atténué (Baron *et al.*, 2004; Childs *et al.*, 1999; McSweeney *et al.*, 2001; Mohty *et al.*, 2007). Ainsi, un CM T supérieur à 50% donneur à J14 après conditionnement atténué, serait associé à un risque accru de GVHa (Miura *et al.*,

2006). De manière cohérente, on décrit moins de GVHa de score II à IV en cas d'un CM T par rapport à un CC (5% vs 52%) (Mattsson *et al.*, 2001a; Mollet *et al.*, 2012). Il apparaît ainsi un rôle important des lymphocytes T dans la GVHa (Ferrara and Reddy, 2006). De plus, les conditionnements hautement immunosuppresseurs, avec de la fludarabine et du cyclophosphamide, sont associés à l'obtention rapide d'un CC T, favorisant la GVH et la GVL (Panse *et al.*, 2005). A noter qu'un traitement par SAL doit systématiquement être pris en compte pour l'interprétation, puisqu'il va détruire les lymphocytes T et que les DLI ne seraient efficaces que si le CM T n'est pas trop diminué avant injection. Une réponse aux DLI se solderait par un chimérisme T supérieur à 90% donneur (Bethge *et al.*, 2004).

2.3.5.2. Chimérisme sur population myéloïde ou spécifique de l'hémopathie

Plusieurs équipes se sont intéressées au chimérisme dans la population spécifique de l'hémopathie, afin d'être davantage prédictif de la rechute, en s'affranchissant des chimérismes liés à une tolérance immunitaire (Mattsson *et al.*, 2001b). Dans les LA, l'analyse sur sous-populations leucémiques permet d'approcher le seuil de détection des marqueurs moléculaires spécifiques utilisés en suivi de maladie résiduelle (transcrits de fusion, réarrangement *IGH* ou *TCR*) (Zetterquist *et al.*, 2000).

Le chimérisme trié sur cellules CD34+ a été étudié dans les LAM, et permet de prédire une rechute près de 60 jours avant la rechute cytologique, avec une meilleure sensibilité que l'échantillon total non trié (Bornhauser *et al.*, 2009; Zeiser *et al.*, 2005). A noter qu'un greffon riche en progéniteurs CD34+ ou une chimiothérapie intensive avant allogreffe conférerait un niveau de chimérisme plus haut plus rapidement dans la lignée myéloïde (Carvallo *et al.*, 2004). Dans les LMC, Serrano *et al.* ont montré dans une cohorte de 55 patients, qu'un CM précède la rechute de 2 à 12 mois dans la sous-population myéloïde CD15+. A noter la présence d'un CM persistant sur population lymphoïde T, à distinguer du CM myéloïde (Serrano *et al.*, 2000).

Dans les LAL-B, Zetterquist *et al.* ont étudié la sous-population maligne CD19+ chez 12 patients de 2 à 28 ans. La corrélation entre suivi de maladie résiduelle positif et CM était parfaite (Zetterquist *et al.*, 2000). De plus, le suivi de chimérisme sur population lymphoïde CD19+ peut potentiellement être utilisé dans tous les syndromes lymphoprolifératifs exprimant ce marqueur, et notamment la LLC, où une étude a montré des résultats très bien corrélés avec le suivi de maladie résiduelle chez 25 patients sur 26 (Mattsson *et al.*, 2000).

2.4. Recommandations actuelles

Des recommandations ont été émises concernant le suivi de chimérisme dès 2001, via le Tandem BMT Meetings, recommandations conjointes de l'*International Bone Marrow Transplant Registry* et de l'*American Society of Blood and Marrow transplantation* (Antin *et al.*, 2001). Les techniques alors recommandées étaient l'étude des VNTR et des STR, pour leur large disponibilité et leur reproductibilité. Il était alors indiqué de réaliser une étude de chimérisme à 1, 3, 6 et 12 mois en cas de CIR ou de nouveau traitement prophylactique de la GVH, l'objectif étant d'adapter les DLI ou l'immunosuppression en fonction du chimérisme. En cas de conditionnement atténué, une étude de chimérisme était recommandée toutes les 2 à 4 semaines jusqu'à l'obtention d'une prise de greffe stable, afin de prédire une perte du greffon ou une GVH. Pour les pathologies non malignes, le chimérisme était à réaliser à 1, 2 et 3 mois (Antin *et al.*, 2001).

Concernant la matrice d'analyse, un prélèvement sanguin est préconisé afin de faciliter la fréquence des prélèvements et de mieux étudier les populations lymphocytaires, peu présentes dans la moelle. La moelle présenterait tout de même l'avantage d'être plus sensible aux rechutes en cas de pathologie myéloïde, mais le chimérisme ne permettant pas de distinguer les cellules normales des cellules tumorales, il reste donc moins sensible que certaines méthodes d'évaluation spécifiques de la MRD, notamment l'étude du transcrite *BCR-ABL* dans la LMC (Antin *et al.*, 2001). Le consortium européen *Eurochimerism* a montré que la technique d'isolement de l'ADN la plus efficace, pour un échantillon pauvre en cellules, est la lyse directe par détergents et protéinase K (van der Burg *et al.*, 2011). En 2006, ce même consortium a développé une nomenclature pour les marqueurs STR, le RSD-code (Recepient-Shared-Donor-Code) afin d'identifier les marqueurs éligibles au suivi de chimérisme (Watzinger *et al.*, 2006). Ce RSD-code permet de connaître la position relative des allèles les uns par rapport aux autres (Watzinger *et al.*, 2006). Ces recommandations reviennent également sur les causes d'exclusion d'un STR non exploitable pour un couple donneur-receveur.

La Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire (SFGM-TC) a mis en place un atelier de réflexion sur l'étude du chimérisme dans le cadre de ses Ateliers d'Harmonisation des Pratiques en Allogreffe 2016 (AHPA 2016, en cours de publication), afin de fixer des recommandations de réalisation et de rythme optimal de surveillance. Le rythme optimal de surveillance est tous les 30 jours, jusqu'à 100 jours. Après 100 jours, la fréquence de suivi du chimérisme est laissée à l'appréciation du greffeur, avec un point recommandé à J180 et un autre à J360. Dans le cadre d'une pathologie non maligne, le suivi doit être prolongé pendant la 1ère année après allogreffe par rapport aux recommandations précédentes. Un chimérisme doit être considéré comme mixte s'il est inférieur ou égal à 95%. En phase précoce de prise de greffe, un chimérisme

supérieur à 95% donneur sur sang total ne nécessite pas d'intervention thérapeutique. Un chimérisme entre 90 et 95% donneur, quel que soit le moment de l'analyse nécessite une réévaluation précoce. En cas de décroissance il est nécessaire de vérifier s'il s'agit d'une rechute ou d'une perte du greffon. En effet, le chimérisme peut permettre la détection précoce d'une rechute, mais uniquement celles à localisation médullaire, ce qui exclut la majorité des lymphomes. En l'absence de marqueurs spécifiques du suivi de la maladie résiduelle, l'évaluation du chimérisme par PCR quantitative peut prédire le risque de rechute, mais une rechute doit être confirmée par d'autres examens. Quelle qu'en soit l'origine, une baisse du pourcentage de chimérisme nécessite une intervention thérapeutique par diminution du traitement immunosuppresseur ou utilisation de DLI et réévaluation du chimérisme à 30 jours (AHPA 2016).

L'intérêt du tri cellulaire sur cellules triées CD3+ est controversé et les données sont insuffisantes pour conclure. En 2012, Mollet *et al.* recommandent une poursuite d'analyse du chimérisme T jusqu'à conversion complète de cette population vers un profil donneur (Mollet *et al.*, 2012).

A noter qu'un chimérisme 100% donneur n'exclut pas une évolutivité de la maladie. En effet, le suivi de chimérisme s'effectue sur un prélèvement sanguin. Une rechute peut d'abord être limitée au compartiment médullaire ou concerner une localisation extramédullaire, notamment sous forme d'un sarcome granulocyttaire dans les LAM. Dans le cas des lymphomes (hors LLC), le suivi de chimérisme ne peut pas constituer un marqueur de suivi de maladie résiduelle car les rechutes sont généralement ganglionnaires sans dissémination sanguine des cellules tumorales. Dans le MM, l'infiltration médullaire est très fréquemment nodulaire et il n'y a pas non plus de diffusion sanguine des cellules tumorales.

3. Objectifs de l'étude

Un précédent travail de thèse d'exercice mené au Centre Henri Becquerel en 2007 visait à optimiser le protocole de suivi du chimérisme dans le service d'hématologie du Centre Henri Becquerel en termes de choix de technique et de stratégie de surveillance post-allogreffe (Thannberger, 2007).

Dix ans après la précédente étude, l'évolution des techniques de biologie moléculaire et des modalités de suivi clinico-biologique des greffes nous amènent à reconsidérer ce suivi de chimérisme, le suivi de chimérisme à J30 et à J100 étant systématique depuis cette étude. Il s'agit également de valider le remplacement de l'étude des VNTR par une étude des STR et d'évaluer la place des différentes techniques au laboratoire de génétique oncologique du Centre Henri Becquerel.

Enfin, cette précédente étude ne s'intéressait pas de manière approfondie à l'apport du tri lymphoïde T et myéloïde dans le suivi de chimérisme. L'un des objectifs principaux du travail actuel est par conséquent d'étudier le chimérisme de ces populations cellulaires et de préciser dans quel contexte leur étude est la plus pertinente, en particulier en termes de prédiction de la GVH et de la rechute.

4. Matériel et méthodes

4.1. Technique d'étude employées

Le suivi de chimérisme est réalisé au laboratoire de génétique oncologique du Centre Henri Becquerel par des techniques ayant fait l'objet de validations de méthodes, afin de remplir les exigences d'accréditation selon la norme NF EN ISO 15189, en particulier en termes de sensibilité et spécificité. Le suivi de chimérisme est actuellement un acte hors nomenclature, toutefois côté dans le Référentiel des actes Innovants Hors Nomenclature de biologie et d'anatomocytopathologie (RIHN), dans la section 07 03 Histocompatibilité selon les codes G179, G180 et G225. Cette inscription RIHN permet une valorisation financière des examens, indexés sur le coefficient B hors nomenclature BHN (0,27€ en 2017).

4.1.1. Réception des échantillons

Les exigences du laboratoire sont de réaliser un bilan pré-allogreffe receveur et donneur, avec réception de 20 mL de sang minimum sur tube EDTA par individu. L'objectif est d'obtenir un minimum, fixé par le laboratoire, de 150 µg d'ADN pré-allogreffe, afin d'assurer le suivi de chimérisme post-allogreffe préférentiellement par PCR quantitative en temps réel, au minimum pendant la première année post-allogreffe.

Le suivi post-allogreffe s'effectue à partir d'un échantillon de 5 mL de sang pour étude sur sang total ou sur population myéloïde, et à partir de 10 mL pour étude sur population lymphoïde T. En pratique, 20 mL de sang minimum sont donc nécessaires, avec des volumes dépendant de la richesse cellulaire du prélèvement. 30 mL sont par conséquent demandés pour un suivi de chimérisme complet avec tri cellulaire. Les cellules doivent être triées dans les 24h suivant le prélèvement, afin de travailler sur des cellules intègres, le tri étant conditionné par la qualité des récepteurs membranaires.

4.1.2. Tri cellulaire

Le tri cellulaire s'effectue sur automate trieur Robosep™ (Stemcell, Canada). Cette technologie permet une sélection de populations cellulaires par utilisation d'anticorps couplés à des billes magnétiques à partir de sang total, sans utilisation de filtration sur colonne. Le tri magnétique permet une rétention des cellules d'intérêt le long des parois du tube, avec un maintien de l'intégrité de la cellule. Ce type de tri permet ensuite la réalisation de tout type d'expérimentation : extraction d'ADN, extraction d'ARN, cytométrie en flux et culture. En pratique, le tri myéloïde est effectué sur 5 mL et le tri lymphoïde T sur 10 mL de sang. Le kit EasySep™ Human Myeloid WB Positive Selection Kit (REF 18653) permet une sélection des populations myéloïdes par sélection positive avec des anticorps reconnaissant le CD33 et le CD66b couplés à des billes magnétiques. Le kit EasySep™ Human CD3 WB Positive Selection Kit (REF 18051) permet une sélection positive de la population lymphoïde T avec des anticorps reconnaissant le CD3 couplés à des billes magnétiques.

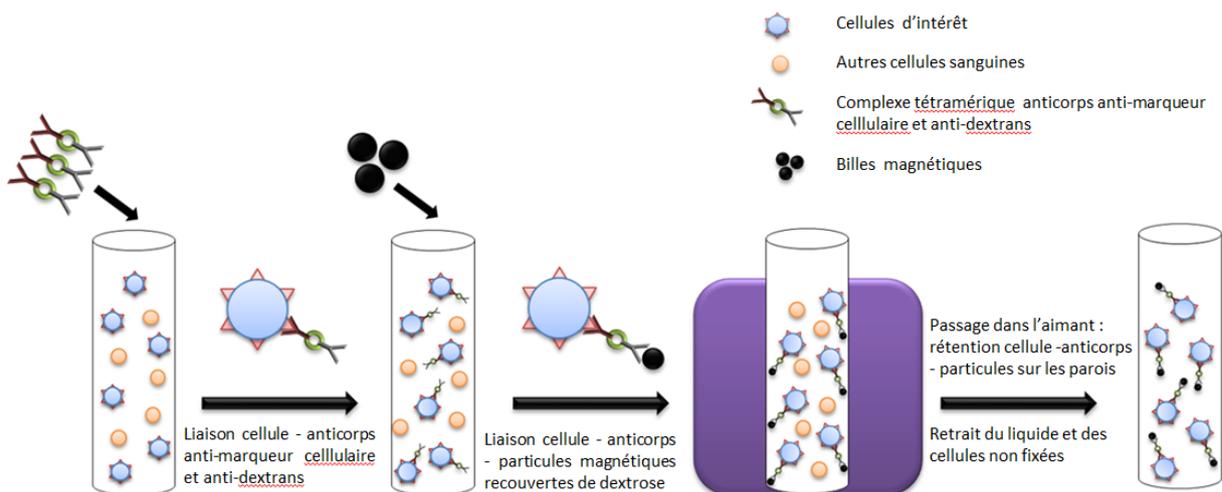


Figure 6 : Principe général du tri cellulaire sur automate Robosep™

4.1.3. Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN est effectuée au laboratoire pour la majorité des échantillons par méthode manuelle. Une première étape consiste en une lyse des globules rouges, suivie d'une digestion des membranes cellulaires par la protéinase K. L'ADN est ensuite purifié par ajout de chlorure de sodium et éventuellement de phénol-chloroforme. L'ADN solubilisé est précipité par ajout d'éthanol absolu. Les ADN pré- et post-allogreffe extraits donneur et receveur sont ajustés à 100 ng/μL, avec un objectif d'au moins 400 μL de volume final.

4.1.4. Détermination du chimérisme

4.1.4.1. *Etude des séquences VNTR*

La technique d'étude des VNTR n'est actuellement plus utilisée au laboratoire et a été remplacée par l'étude des STR, depuis 2015. Un typage était réalisé sur les échantillons pré-allogreffe, pour identifier des marqueurs spécifiques du receveur et de son donneur. Sept marqueurs étaient testés en VNTR au laboratoire : en première intention YNZ-22, D1S80 (D28507), 33.4, 33.6.3 (M30548) et HRAS, puis en seconde intention 33.1 et HVR, si le screening initial n'était pas contributif. Cette technique utilise le principe d'amplification par PCR en point final visant à amplifier le matériel génétique, par dénaturation de l'ADN, hybridation des amorces et élongation de brins complémentaires. Ces étapes étant répétées n cycles. Pour chaque marqueur, le mix suivant contient des amorces sens et anti-sens :

	Volume par échantillon
mix polymerase 2x	25 µL
amorce sens et antisens (1µM pour chaque amorce)	1,5 µL
H2O qsp 49 µL	22,5 µL

Tableau 5 : Préparation du mix réactionnel pour étude des VNTR

1 µL d'ADN dilué est ajouté, pour chaque individu aux 49 µL de mix. La PCR d'amplification est réalisée sur thermocycleur suivant le programme suivant :

94°C	10 min	
94°C	1 min	
64°C	1 min	x 30 cycles
72°C	12 min	
4°C	∞	

Les produits d'amplification sont ensuite déposés (15-20µL) sur gel à 1,5% d'agarose et mis à migrer sous 200V. Une photo UV après ajout d'intercalant GelRed™ permet de révéler les produits de PCR. Les produits migrés sont ensuite transférés sur membrane de nylon et révélés par hybridation d'une sonde biotinylée spécifique du marqueur.

Les produits de PCR sont séparés en fonction de leur taille, celle-ci variant en fonction du nombre de répétitions des séquences répétées minisatellites. L'informativité est liée aux variations du nombre de répétitions d'un individu à l'autre, mais aussi au caractère homozygote ou hétérozygote du locus chez chaque individu. Ainsi, si deux sujets sont homozygotes et portent le même allèle, le marqueur n'est pas informatif. En revanche, si les deux sujets sont hétérozygotes, et portent des allèles différents, il y a alors 4 marqueurs de taille différente. L'objectif est l'obtention d'un couple d'amorce informatif avec obligatoirement un fragment amplifié spécifique du receveur,

et si possible un fragment spécifique du donneur. En absence de marqueur spécifique du donneur, deux marqueurs receveur sont testés.

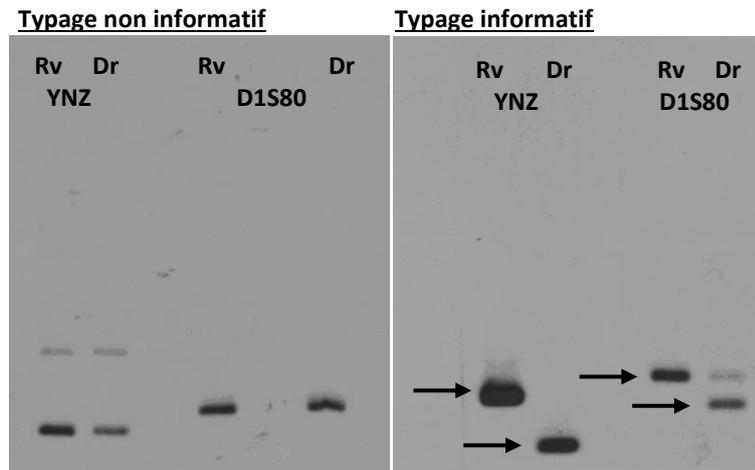


Figure 7 : Exemple de typages non informatifs et informatifs pour l'étude des VNTR
Les produits de PCR sont migrés sur gel d'agarose, transférés sur membrane de nylon puis hybridés avec une sonde spécifique. Rv : ADN pré-allogreffe du receveur, Dr : ADN du donneur

En suivi post-allogreffe, un résultat semi-quantitatif est obtenu grâce à une gamme de dilution de l'ADN de l'échantillon pré-allogreffe donneur dans l'échantillon pré-allogreffe receveur ajustés à 100ng/ μ L. La quantification est visuelle, par comparaison à une gamme de dilution établie à partir des échantillons pré-allogreffe, selon le schéma ci-dessous :

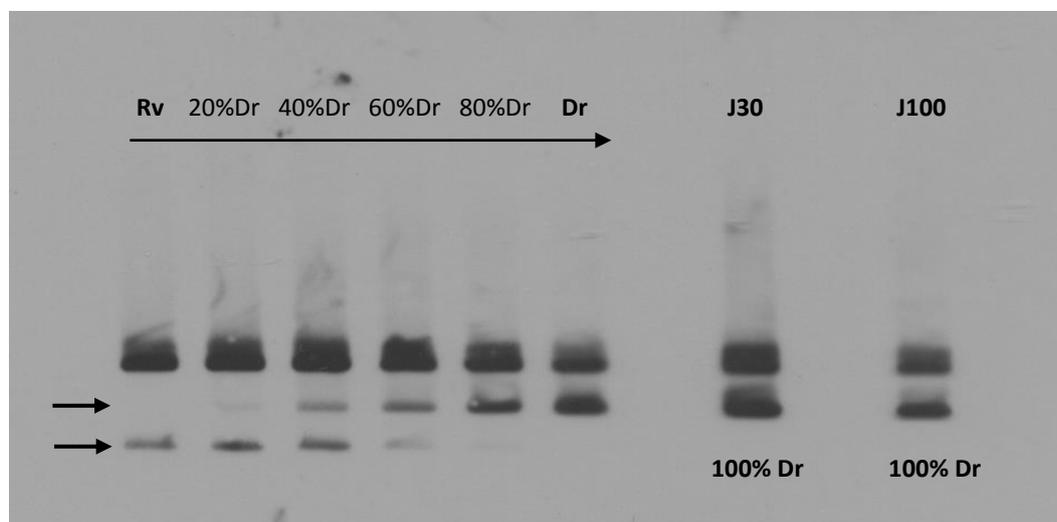


Figure 8 : Exemple d'un marqueur VNTR étudié en suivi de chimérisme
Les produits de PCR sont migrés sur gel d'agarose. Rv : dépôt de 100 μ L d'ADN receveur pré-allogreffe, Dr : dépôt de 100 μ L d'ADN donneur, 20%Dr : dilution de 20 μ L d'ADN Dr dans 80 μ L d'ADN Rv, 40%Dr : dilution de 40 μ L d'ADN Dr dans 60 μ L d'ADN Rv, 60%Dr : dilution de 60 μ L d'ADN Dr dans 40 μ L d'ADN Rv, 80%Dr : dilution de 80 μ L d'ADN Dr dans 20 μ L d'ADN Rv.

Au final, cette technique présente deux inconvénients majeurs, le temps de réalisation est long et le résultat est seulement semi-quantitatif.

4.1.4.2. Etude des séquences STR

La technique d'étude des STR a supplanté l'étude des VNTR car elle présente l'avantage d'être reproductible, assez rapide, très peu consommatrice en matériel génétique, avec une sensibilité de 1 à 5% (Lawler *et al.*, 1991; Lion, 2003; Thiede *et al.*, 1999). Elle est également utilisable en cas de non informativité du typage par chimie TaqMan®. Un kit commercial Promega PowerPlex® 16 HS System, ou PP16 (Promega, Etats-Unis) a été choisi. Il s'agit d'une technique de PCR multiplexe pour 15 loci STR et l'amélogénine, un marqueur lié au sexe, l'allèle porté par le chromosome X étant délété de 6pb par rapport au chromosome Y. Les 16 loci sont amplifiés simultanément puis injectés simultanément et séparés par analyse de fragments. Ils sont marqués par 3 fluorochromes différents, la fluorescéine (FL) pour les loci *Penta E*, *D18S51*, *D21S11*, *TH01* et *D3S1358*, la carboxy-tétraméthylrhodamine (TMR) pour les loci *FGA*, *TPOX*, *D8S1179*, *vWA* et l'amélogénine, et la 6-carboxyl-4',5'-dichloro-2',7'-diméthyl-fluorescéine (JOE) pour les loci *Penta D*, *CSF1PO*, *D16S539*, *D7S820*, *D13S317*, *D5S818*. La première étape est également une PCR en point final. Un mix global multiplexe est réalisé, contenant l'ensemble des réactifs nécessaires, dont la polymérase et l'ensemble des amorces :

	Volume par échantillon
PowerPlex HS 5X Master Mix	5 µL
PowerPlex 16HS 10X Primer Pair Mix	2,5 µL
H2O qsp 24 µL	16,5 µL

Tableau 6 : Préparation du mix réactionnel pour étude des STR

Les ADN sont dilués à 0,5 ou 1 ng/µL et 1µL de l'ADN dilué est ajouté aux 24 µL de milieu réactionnel afin d'introduire un maximum de 1ng d'ADN. Plus la quantité d'ADN est importante, plus il y a un risque de saturation de fluorescence et de signaux artéfactuels. Un contrôle positif, l'ADN 2800M permet de contrôler la bonne amplification des marqueurs pour chaque locus.

La PCR d'amplification en point final est réalisée selon le programme suivant :

96°C	2 min	
94°C	30 s	
60°C	90 s	x 32 cycles
72°C	90 s	
60°C	45 min	
4°C	∞	

Ces microsatellites étant des répétitions de petite taille, ils sont ensuite séparés par une technique plus résolutive que la séparation sur gel d'agarose des VNTR, l'électrophorèse capillaire, permettant une analyse de fragments à la base près. La détection est rendue possible par détection de la fluorescence des amorces spécifiques. A 1µl d'échantillon est ajouté 10µL de cocktail de charge contenant 9,5 µL de formamide et 0,5 µL de marqueur de taille CXR ILS 600. Le formamide facilite la rupture des liaisons entre deux brins d'une molécule d'ADN et maintient l'ADN sous forme simple brin pour la migration capillaire. Le marqueur de taille permet d'obtenir une échelle de taille des fragments, précise à la base près. Une dénaturation 3 minutes à 95°C, puis une conservation sur glace permet d'obtenir des fragments d'ADN simple brin avant séparation des fragments sur un séquenceur capillaire AB3130 ou AB3130xl. En général, 3 à 5 marqueurs sont informatifs avec ce système sur les 16 explorés. Pour chaque locus, les allèles présents dans la population générale avec une fréquence supérieure à 1/1000 sont pré-annotés par le fichier d'annotation du fournisseur. Un échantillon test échelonné (*allelic ladder*) permet de vérifier que l'ensemble des allèles les plus fréquents des 16 loci sont amplifiés (Figure 9). Il doit être passé tous les 8 puits et permet de vérifier le bon positionnement des allèles, et donc leur bonne annotation. Les allèles rares de faible fréquence sont également détectés, mais ne seront pas annotés.

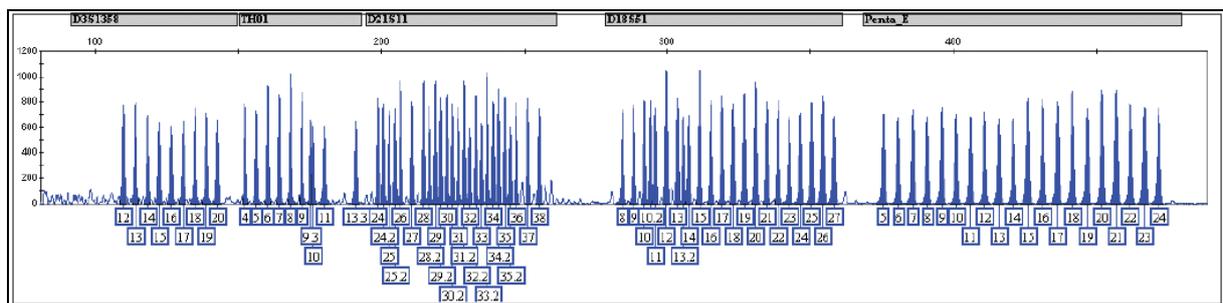


Figure 9 : Exemple du profil électrophorétique obtenu pour l'allelic ladder, pour les loci marqués à la fluorescéine

L'allelic ladder comprend un très large panel d'allèles possibles pour chaque locus.

Avec cette technique, même les ADN dégradés sont généralement exploitables (taille < 500 pb), mais les quantités d'ADN extrêmement faibles nécessitent une vigilance renforcée vis-à-vis des contaminations. Les kits commerciaux STR sont utilisés en médecine légale (Thiede *et al.*, 1999), mais n'ont pas été initialement validés pour une analyse quantitative. Ils ont pour objectif principal une discrimination efficace entre individus, au sein des différentes ethnies les plus fréquentes.

Or la détermination du chimérisme nécessite une quantification, calculée par comparaison des aires sous les pics avec exclusion des allèles partagés (Thiede *et al.*, 1999). Les calculs nécessaires à cette quantification au laboratoire sont réalisés en fonction du profil des pics obtenus (Figure 10). Pour être interprétable, plusieurs marqueurs doivent être analysés, et c'est la moyenne d'au moins 3 marqueurs qui est rendue, si le coefficient de variation (écart-type/moyenne*100) est inférieur à 5%.

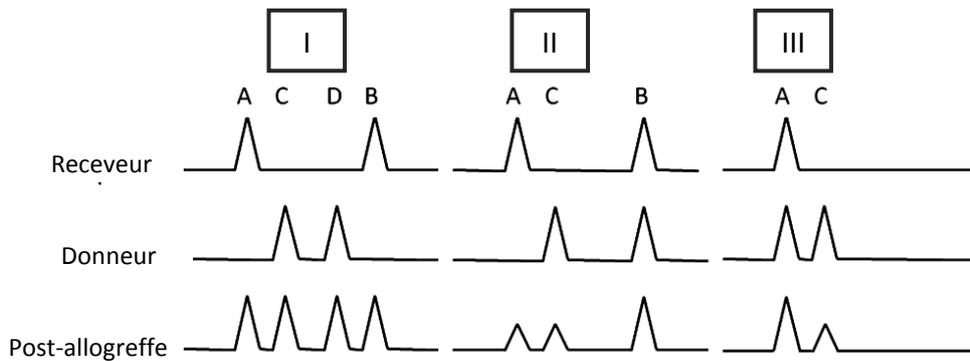


Figure 10 : Profils électrophorétiques possibles d'un couple donneur/receveur

(Adapté de Clark *et al.*, 2015).

Calcul du pourcentage de chimérisme (% donneur)

I : Receveur et donneur hétérozygotes, 4 allèles distincts.

$$I : (C+D) / [(C+D) + (A+B)] * 100$$

II : Receveur et donneur hétérozygotes, avec un allèle B partagé.

$$II : C / (A + C) * 100$$

III : Receveur homozygote, donneur hétérozygote, avec l'allèle receveur A partagé avec le donneur. L'inverse est possible.

$$III : C / [(A-C)/2 + C] * 100$$

Les calculs sont réalisés sur un logiciel dédié, ChimerMarker® (SoftGenetics®, Etats-Unis). L'analyse quantitative est déterminée à partir des aires des pics et non des hauteurs des pics uniquement, afin d'obtenir une meilleure reproductibilité. Des signaux artéfactuels, appelés *stutter* pics, sont possibles. Ces *stutter* pics correspondent à une perte d'une unité de répétition durant l'amplification, et sont donc situés à n-4 ou n-5 pb du pic authentique du patient : n-4 pb pour les marqueurs tétramériques, n-5 pb pour les marqueurs pentamériques PentaD et E (Walsh *et al.*, 1996). Leur aire peut correspondre de 5 à 15% de l'aire du pic authentique et peut ainsi majorer l'allèle receveur, si celui-ci est 4 ou 5 pb plus court que l'allèle donneur. Le logiciel ChimerMarker permet une analyse automatisée et prend en compte les *stutter* pics potentiels pour lesquels il applique un facteur correcteur. Cette correction permet d'analyser des marqueurs qui seraient sinon ininterprétables. Selon les recommandations, les causes d'exclusion d'un marqueur sont l'absence d'au moins un allèle différent entre le receveur et le donneur, et l'amplification préférentielle d'un allèle par rapport à l'autre. Enfin, l'utilisation de marqueurs pour lesquels l'allèle receveur est plus petit que l'allèle donneur serait préférable, car les courts fragments sont préférentiellement amplifiés durant la PCR. La sensibilité de détection de l'allèle receveur minoritaire serait augmentée (Lion, 2003).

Le typage des échantillons pré-allogreffe donneur et receveur s'effectue simultanément au premier suivi post-allogreffe. Pour les autres suivis, seul le prélèvement du jour et l'antérieur sont analysés. Dans le cas des greffes d'USP, il n'y a pas d'échantillon pré-allogreffe donneur, car la totalité du prélèvement est dédiée au greffon. Lors du premier point de suivi, à J30, on compare alors l'échantillon post-allogreffe à l'échantillon receveur pré-allogreffe. Si aucun marqueur n'est différent entre les deux échantillons, la technique ne permet pas un suivi de chimérisme ultérieur. En effet, on ne peut déterminer si le donneur et le receveur ont une concordance parfaite avec un chimérisme à 100% donneur, ou si la greffe s'est soldée par un échec, avec un chimérisme à 0% donneur.

4.1.4.3. Etude par PCR quantitative en temps réel par chimie TaqMan®

Cette technique a fait l'objet d'une accréditation COFRAC, avec des validations de méthode pour le typage préallogreffe et pour le suivi de chimérisme. La PCR quantitative en temps réel TaqMan® est un système de PCR quantitative en temps réel utilisant un couple d'amorces et une sonde s'hybridant au niveau de la séquence d'ADN comprise entre les deux amorces. Cette sonde TaqMan® est un oligonucléotide marqué par deux groupements, un fluorochrome Reporter en 5' (exemple : FAM, VIC), dont l'émission de fluorescence est absorbée par un groupement Quencher en 3' (exemple : TAMRA). Lors de l'élongation, l'ADN polymérase clive la sonde, le Reporter est libéré, avec émission de fluorescence (Figure 11).

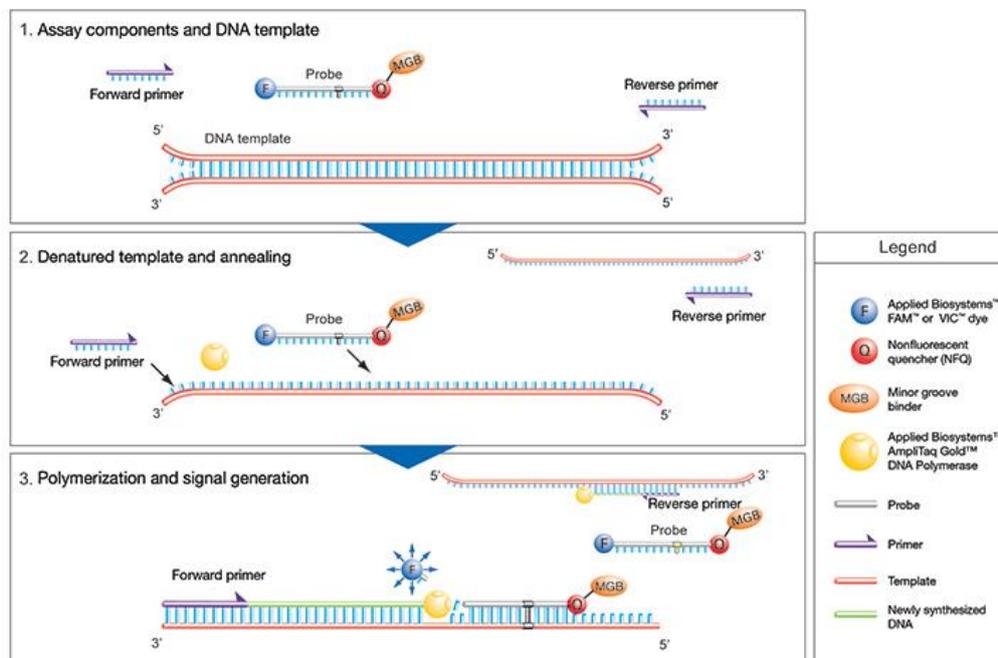


Figure 11 : Principe de la PCR quantitative par chimie TaqMan®.

1. ADN matrice mis en présence des amorces sens (forward primer), anti-sens (reverse primer) et de la sonde marquée (probe). 2. Après dénaturation, les amorces et la sonde s'hybrident à l'ADN. 3. Pendant l'élongation, la polymérase clive la sonde, libérant le groupement fluorochrome F. (Brochure TaqMan Gene Expression Assays, ThermoFisher).

A chaque cycle de PCR correspond une émission de fluorescence, d'abord indétectable, la quantité d'ADN étant trop faible, puis une fois le seuil de détection atteint, le nombre de copies d'ADN évoluant selon 2^n copies d'ADN pour n cycles, l'augmentation de fluorescence est explosive. Après cette phase, la courbe atteint un plateau, du fait de l'épuisement des réactifs au sein du milieu réactionnel. Le nombre de cycle correspondant à cette phase exponentielle, ou C_t (*Cycle threshold*) est proportionnel à la quantité d'ADN initiale, selon une relation logarithmique. Plus le C_t est faible, plus la quantité d'ADN initiale était élevée (Figure 12). La quantification est relative à un gène de référence ubiquitaire, le gène *GAPDH*. On obtient ainsi un $\Delta C_t = C_t(\text{marqueur spécifique}) - C_t(\text{GAPDH})$. La quantification est également comparative, par rapport aux échantillons pré-allogreffe, l'échantillon pré-greffe correspondant à un taux de 100% donneur pour les marqueurs étudiés. Le résultat est ainsi exprimé sous la forme $2^{-[\Delta C_t(\text{post-greffe}) - \Delta C_t(\text{pré-greffe})]}$ (Alizadeh *et al.*, 2002a).

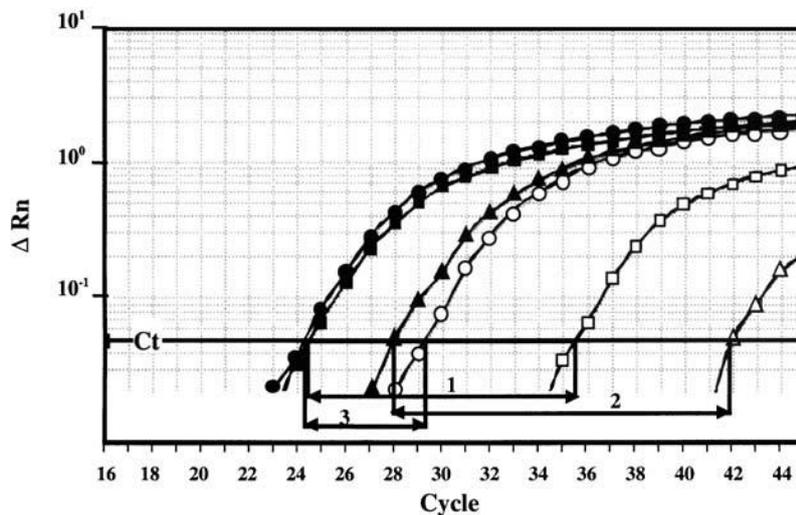


Figure 12 : Exemple de courbe d'amplification en PCR quantitative en temps réel TaqMan® allèle-spécifique pour le gène *MLH1*.

*L'amorce sens est commune. Avec une première amorce anti-sens, le C_t est de 24,5 pour l'allèle A et 35,9 pour l'allèle G (ΔC_t 1). Avec une deuxième amorce anti-sens, le C_t est de 28,2 pour l'allèle A et 41,8 pour l'allèle G (ΔC_t 2). Avec une troisième amorce anti-sens, le C_t est de 24,4 pour l'allèle A et 29,1 pour l'allèle G (ΔC_t 2) (Maas *et al.*, 2003).*

Le typage des échantillons pré-allogreffe consiste à analyser 32 marqueurs décrits par Alizadeh *et al.*, 2002 : *GAPDH*, S01a et b, S02, S03, S04a et b, S05a et b, S06, S07a et b, S08a et b, S09a et b, S10a et b, S11a et b, M15, M19a et b, M21a, M22b, M24a et b, M25a et b, M26a et b, M27b et M28b (Alizadeh *et al.*, 2002a). Pour chaque marqueur, des oligonucléotides sens et anti-sens permettent d'amplifier la séquence, et une sonde marquée FAM-TAMRA permet la détection après hybridation. Un pré-mix est réalisé pour l'ensemble des marqueurs :

Pré-mix pour typage	Volume par échantillon
TaqMan® Universal PCR Master Mix 2X (REF 4318157)	20 µL
H2O	8 µL
ADN à 100 ng/µL	0,5 µL

Tableau 7 : Préparation du mix réactionnel pour typage pré-allogreffe par chimie TaqMan®

Ainsi, 50ng d'ADN sont introduits par puits, c'est-à-dire 2µg d'ADN au total pour l'ensemble des marqueurs. 23,5 µL de ce pré-mix est déposé dans chaque puits de la plaque TaqMan®, auquel est ajouté 6,5 µL du mix des amorces sens et anti-sens et de la sonde (600 nM pour chaque amorce, 200 nM pour la sonde). La plaque TaqMan® est ensuite analysée sur automate Applied Biosystems 7900® FAST Real Time PCR, avec un programme de PCR quantitative standard à 50 Cycles. Les Ct receveur et donneur sont ensuite calculés. A titre d'exemple, le plan de plaque suivant est obtenu pour chaque couple receveur-donneur :

	RECEVEUR					ADN 26196	DONNEUR					ADN 26195
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	24.59	50.00	50.00	50.00	24.43		50.00	39.55	50.00	39.98	23.45	
B	24.98	37.31	34.53	23.86	25.15		24.02	22.95	28.18	23.56	36.38	
C	24.68	24.11	29.51	25.49	23.97		50.00	50.00	29.21	25.31	23.87	
D	50.00	50.00	24.15	24.04	25.81		50.00	24.71	23.99	36.15	27.25	
E	25.19	23.50	24.01	36.17			50.00	24.98	24.12	35.99		
F	25.90	34.84	50.00	23.80			24.70	35.59	50.00	22.67		

Figure 13 : Exemple de résultat d'une plaque TaqMan® pour typage pré-allogreffe Cycles seuils (Ct) obtenus pour le receveur et le donneur.

On recherche un complexe amorce-sonde spécifique du receveur, non amplifié chez le donneur et un complexe amorce-sonde spécifique du donneur, non amplifié chez le receveur. Il est possible de suivre un patient s'il n'y a qu'un marqueur receveur, mais il est impossible de suivre un patient s'il n'y a qu'un marqueur donneur. Sur la figure 13, les marqueurs encadrés et grisés sont par exemple des marqueurs spécifiques du receveur, car amplifiés respectivement à 24,59 Ct et 24,11 Ct chez le receveur à gauche et non amplifiés chez le donneur à droite (50 Ct). A l'inverse, le marqueur encadré à droite est un marqueur spécifique du donneur, car amplifié à 24,71 Ct chez le donneur et non amplifié chez le receveur.

En suivi post-allogreffe, 3 mix sont réalisés, un pour le marqueur spécifique du donneur, un pour le marqueur spécifique du receveur et un troisième pour le gène *GAPDH*, afin de pouvoir introduire les volumes suivants par puits :

	Volume par puits
Master Mix Applied 2x	12,5 µl
Amorces sens et anti-sens et sonde (600 nM pour chaque amorce, 200 nM pour la sonde)	6,5 µL
H2O qsp 25 µL	6 µL

Tableau 8 : Préparation du mix réactionnel pour suivi post-allogreffe par chimie TaqMan®

25 µL de ce pré-mix est déposé dans chaque puits de la plaque TaqMan®, auquel est ajouté 2,5 µL d'ADN à 100 ng/µL, soit 250 ng par puits, c'est-à-dire 2µg d'ADN au total pour l'étude de chimérisme. Les marqueurs spécifiques du donneur et du receveur sont analysés en triplicat, sur 3 puits différents, et le gène de référence *GAPDH* en duplicat (Figure 14). La quantification est alors rendue possible par la gamme de dilution. La plaque TaqMan® est également analysée sur automate Applied Biosystems 7900® Real Time PCR, avec un programme de PCR quantitative standard à 50 Cycles. Trois paramètres permettent de contrôler la qualité de la technique. Le gène *GAPDH* est un gène ubiquitaire, marqueur de la qualité de l'ADN de l'échantillon. Les profils sont contrôlés par STR lors du 1^{er} suivi post allogreffe. A partir du 2^{ème} suivi post-allogreffe, chaque examen de suivi est réalisé en reprenant l'échantillon antérieur comme contrôle interne de qualité.

		Receveur		Donneur	Gamme de calibration		
		1	2	3	4	5	6
M Rv	A	21.96	37.50	35.61	35.65	3.65	24.77
	B	22.31	38.35	35.69	36.39	25.30	46.48
	C	22.20	36.75	35.42	35.52	50.00	35.92
GAPDH	D	22.55	23.04	22.36	22.39	50.00	50.00
	E	22.78	23.48	22.47	22.60	50.00	50.00
M Dr	F	50.00	24.44	23.18	23.33	18.04	50.00
	G	50.00	24.42	23.44	23.17	21.38	50.00
	H	50.00	24.60	23.40	23.41	50.00	50.00

Figure 14 : Exemple de résultat d'une plaque TaqMan® en suivi post-allogreffe
Cycles seuils (Ct) obtenus pour un receveur Rv et son donneur Dr

Les avantages d'un suivi de chimérisme par chimie TaqMan® sont sa rapidité de réalisation, avec une quantification très précise, notamment quand la population minoritaire est inférieure à 10%. Il s'agit par conséquent de la méthode de choix utilisée au laboratoire. Deux inconvénients majeurs sont à prendre en compte : l'importante consommation d'ADN pour assurer une excellente sensibilité, et une quantification non fiable pour un chimérisme compris entre 10% et 90%. En effet, cette technique est alors moins reproductible, car une même différence de Ct se traduit par une plus grande différence en pourcentage. Dans ce cas, un contrôle, précédemment par étude des VNTR, et à présent par étude des STR est requis. C'est également le cas si le chimérisme varie par rapport à l'antériorité. De plus, en cas d'épuisement de l'ADN donneur pré-allogreffe (limite fixée à 300 ng, soit 30 µL à 100 ng/µL), la méthode TaqMan® n'est plus utilisée, et la suite du suivi est réalisée par étude des STR. En cas quantité d'ADN inférieure à 250 ng, le suivi par étude des STR sera privilégié.

4.1.5. Processus du suivi de chimérisme au laboratoire

Globalement, le suivi de chimérisme peut être réalisé par plusieurs techniques au laboratoire et un arbre décisionnel a été mis en place pour rationaliser ce suivi. La décision d'utiliser une technique ou une autre dépend principalement de la quantité d'ADN disponible et de l'informativité des marqueurs utilisés. Si plus de 150µg d'ADN est disponible pré-allogreffe, la PCR quantitative par chimie TaqMan® sera privilégiée. L'étude des STR est réalisée si ce seuil limite n'est pas atteint pré-allogreffe, si la quantité d'ADN post-allogreffe est inférieure à 250ng (5µL à 50ng/µL), si le chimérisme par chimie TaqMan® est compris entre 10% et 90% donneur, si la qualité de l'ADN est insuffisante (*GAPDH*>25Ct), ou si le chimérisme baisse significativement par rapport au suivi antérieur.

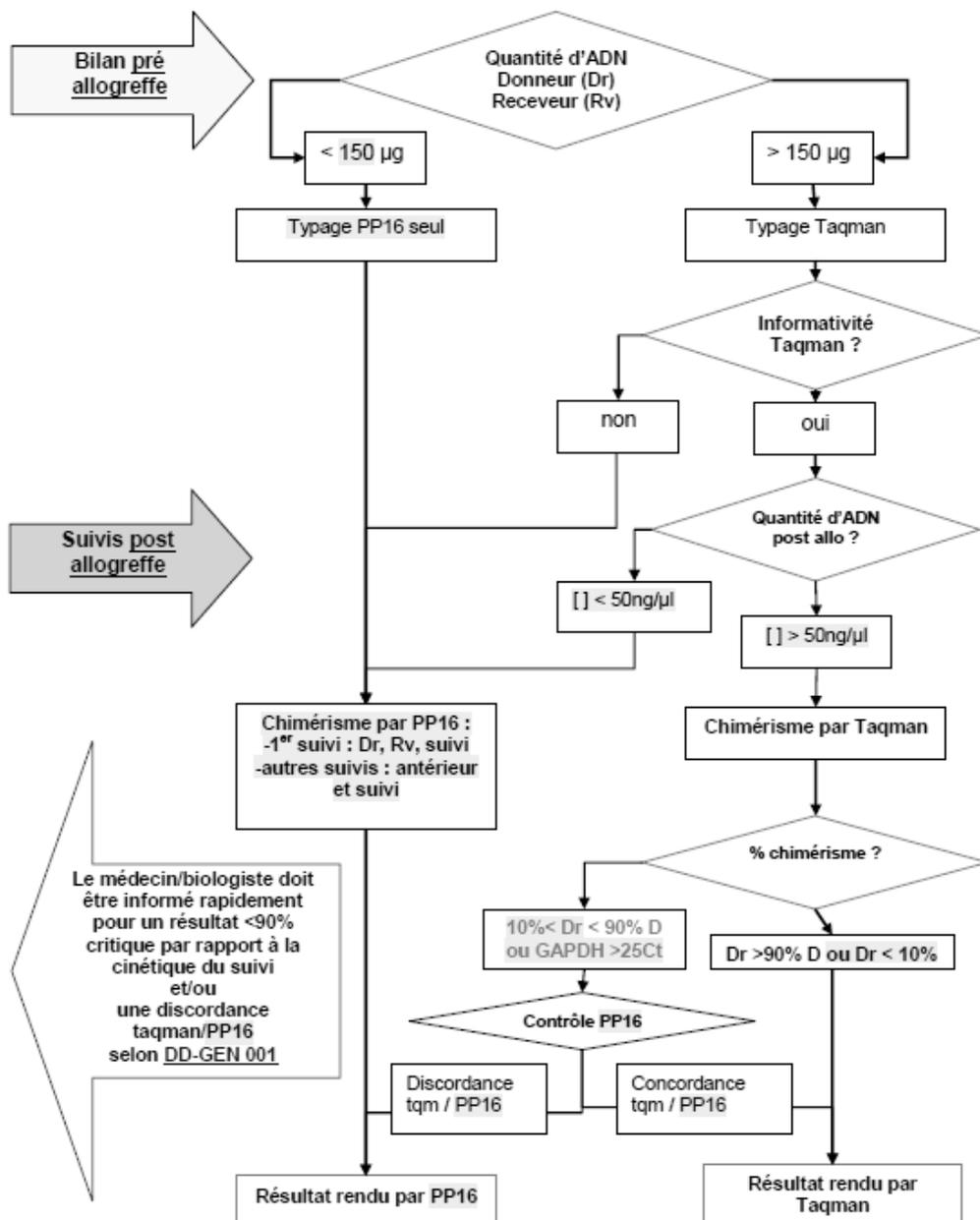


Figure 15 : Arbre décisionnel de choix de technique pour le suivi de chimérisme post-allogreffe au laboratoire

4.2. Constitution rétrospective de la cohorte

Depuis une dizaine d'années, le calendrier de suivi du chimérisme a été défini au Centre Henri Becquerel comme suit :

- En cas de conditionnement standard, hors aplasie, le chimérisme est réalisé sur sang total à J30, J100, 6 mois et 1 an de l'allogreffe.
- En cas de conditionnement atténué ou d'aplasie, le chimérisme est réalisé avec tri à J30, J100, 6 mois et 1 an de l'allogreffe minimum.
- Après DLI, le rythme varie, un chimérisme trié doit précéder la première injection de DLI, et le chimérisme est ensuite réalisé régulièrement, au minimum à J30 post-injection.

En cas de chimérisme mixte ou en cas de nécessité clinique, la fréquence du suivi peut également être augmentée sur prescription médicale ou conseil du biologiste médical. Un suivi de chimérisme sur sang total et/ou dans les sous-populations myéloïde et lymphoïde T a été réalisé par PCR quantitative par chimie TaqMan[®], étude des VNTR ou des STR, pour 258 greffes réalisées dans le service d'hématologie adulte du Centre Henri Becquerel à Rouen.

4.3. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel Prism[®] Version 6.01 (GraphPad, Etats-Unis). Les données sont exprimées en nombre (n), en pourcentage (%) ou en moyennes associées à leur écart standard à la moyenne (sem). Les tests de comparaisons entre deux groupes ont été réalisés par des tests statistiques non paramétriques de Mann-Whitney bilatéraux. Les analyses de survie ont été menées avec détermination de la survie par tests de Log-rank de Mantel-Cox. La survie sans rechute a été évaluée de la date de la greffe à la date de la rechute ; la survie globale de la date de la greffe à la date du décès quelle qu'en soit la cause. La significativité a été définie par une valeur $p < 0,05$ pour tous les tests statistiques.

5. Résultats de l'étude

Cette étude rétrospective sur dix ans nous permet de faire un bilan du suivi de chimérisme, devenu systématique à J30 et à J100. Quelques points de chimérisme n'ont pas pu être réalisés, pour les raisons suivantes : décès avant J100 ou échec technique sur une population cellulaire, celle-ci étant en trop faible quantité au moment du prélèvement. Ces données nous permettent également de comparer l'étude des VNTR à celle des STR, le remplacement de la première par la seconde ayant été mis en place au cours de cette période. Trois groupes distincts peuvent être étudiés : les pathologies non malignes, les hémopathies malignes avec conditionnement standard et les hémopathies malignes avec conditionnement atténué. L'étude du chimérisme sur populations myéloïde et lymphoïde T est l'objet principal de cette analyse, leur rôle et leur apport étant encore débattu, notamment en termes de prédiction de la GVH et de la rechute. Les suivis ultérieurs à J100 ont été particulièrement analysés lorsque le patient a bénéficié de DLI.

5.1. Caractéristiques de la cohorte étudiée

258 patients allogreffés entre les 1^{er} janvier 2007 et 2017 au Centre Henri Becquerel ont été inclus dans l'étude, à partir des analyses réalisées au laboratoire de génétique oncologique du centre. Les patients du service d'oncohématologie pédiatrique du CHU de Rouen et les patients du CHU d'Amiens ont été exclus. Quinze patients ont été allogreffés pour aplasie (5,8%) tandis que les 243 autres patients ont bénéficié d'une allogreffe dans le cadre d'hémopathies malignes très diverses. Chacune représentait entre 2 et 9% de la cohorte, à l'exception des LAM, beaucoup plus nombreuses (n=111 ; 43%) (Tableau 9). Le faible nombre de LMC par rapport à la littérature est lié à l'introduction des ITK depuis 2001. L'âge moyen à la greffe était de 46 ans, avec des patients de tout âge (18 à 70 ans), un tiers des patients ont rechuté (n=86, 33%, entre 19 et 2963 jours, en moyenne 340 jours), et la moitié des patients est décédé au cours du suivi toute cause confondue (n=124 ; 48%, entre 25 et 3071 jours, moyenne 503 jours). Aucun patient n'a rechuté parmi les 5 traités pour une MF, et un seul parmi les 9 allogreffés pour un LHc. Les allogreffes pouvaient différer par le type de donneur, le type de greffon, la richesse du greffon, ou le type de conditionnement. En effet, le greffon était majoritairement issu de CSP (n=197 ; 75%), à l'exception des allogreffes pour aplasie, avec 60% des greffons issus de MO. Le couple donneur-receveur était phénoïdétique (n=147, 57%), génoidétique (n=107 ; 41%), et rarement haploïdétique (n=6 ; 2%). Les deux tiers des patients ont bénéficié d'un conditionnement atténué (n=163 ; 63%) dont la totalité des patients allogreffés pour aplasie ; les autres ont suivi un conditionnement standard (n=95 ; 37%). Des *mismatches* HLA concernaient 24 allogreffes (17 HLA 8 ou 9/10, 7 HLA 4 ou 5/6) dont 14 conditionnements atténués.

Pathologies	Aplasie médullaire idiopathique		Aplasie médullaire HPN+		LAL-B		LAL-T		LA biphéno-typique		LAM		LMC		MF		SMP autre, SMD, SMD/SMD		LNH-B dont LLC		LNH-T		MM		LHc		Total		
Type de greffe																													
Phénoïdétique	0	0%	4	67%	13	59%	5	56%	5	63%	65	59%	8	80%	5	100%	7	54%	10	42%	5	56%	14	61%	4	44%	145	56%	
Génoïdétique	8	89%	2	33%	8	36%	4	44%	3	38%	43	39%	2	20%	0	0%	6	46%	14	58%	4	44%	9	39%	4	44%	107	42%	
Haploïdétique	1	11%	0	0%	1	5%	0	0%	0	0%	3	3%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	1	12%	6	2%	
Type de greffon																													
MO	6	67%	3	50%	5	23%	4	44%	2	25%	16	14%	2	20%	1	20%	4	29%	2	8%	3	33%	1	4%	1	11%	50	19%	
CSP	3	33%	3	50%	16	73%	5	56%	5	63%	88	79%	7	70%	4	80%	9	64%	22	92%	5	56%	22	96%	8	89%	197	77%	
USP	0	0%	0	0%	1	5%	0	0%	1	13%	7	6%	1	10%	0	0%	0	0%	0	0%	1	11%	0	0%	0	0%	11	4%	
Conditionnement																													
Standard	0	0%	0	0%	14	64%	8	89%	6	75%	46	41%	4	40%	2	40%	6	46%	3	13%	5	56%	1	4%	1	13%	95	37%	
Atténué	9	100%	6	100%	8	36%	1	11%	2	25%	65	59%	6	60%	3	60%	7	54%	21	88%	4	44%	22	96%	8	87%	163	63%	
Rechute	0	0%	0	0%	8	36%	3	33%	3	38%	47	42%	5	50%	0	0%	2	21%	4	17%	1	11%	12	52%	1	10%	86	33%	
Décès	1	11%	0	0%	12	55%	3	33%	4	50%	61	55%	5	50%	0	0%	6	50%	10	42%	5	56%	16	70%	1	10%	124	48%	
DLI	0	0%	0	0%	1	5%	0	0%	2	25%	9	8%	3	30%	0	0%	1	7%	1	4%	0	0%	3	13%	0	0%	20	8%	
Age moyen (ans)	31 ± 13		34 ± 14		41 ± 16		31 ± 14		36 ± 12		47 ± 14		45 ± 13		52 ± 13		54 ± 7		53 ± 9		51 ± 13		50 ± 8		34 ± 12		47 ± 14		
Total	9	3%	6	2%	22	8%	9	3%	8	3%	111	43%	10	4%	5	2%	13	5%	24	9%	9	3%	23	9%	9	3%	258	100%	

Tableau 9 : Caractéristiques de la cohorte

Répartition des patients en fonction de leur pathologie, du type de couple donneur-receveur, de greffon, de conditionnement, de la survenue ou non de rechute, de décès ou de l'usage éventuel de DLI.

5.2. Choix de la technique pour le suivi de chimérisme

Le suivi de chimérisme a été réalisé dans 77% des cas uniquement par PCR quantitative en temps réel par chimie TaqMan®. Dans 16% des cas, deux techniques ont été utilisées, la PCR quantitative et l'étude des VNTR (14%) ou des STR (2%). Ces techniques alternatives ont été réalisées pour confirmer un résultat obtenu en PCR quantitative, notamment s'il était compris entre 10 et 90% de chimérisme. Dans respectivement 6% et 1% des cas, seule l'étude des VNTR et des STR a pu être effectuée, généralement pour quantité d'ADN insuffisante, inférieure à 150 µg pré-allogreffe ou inférieure à 250 ng post-allogreffe. L'ensemble de ces données rétrospectives nous permet de faire un bilan technique de la stratégie adoptée et des performances de chaque méthode utilisée, sans tenir compte du contexte clinique.

Tout d'abord, il apparaît que les chimérismes dissociés sont très fréquents. Par exemple, à J30, sur 43 résultats de PCR quantitative inférieurs à 90% donneur sur population lymphoïde T ($60,3 \pm 4,1\%$), seulement 4 patients présentaient également un chimérisme inférieur à 90% donneur sur sang total ($93,4 \pm 1,5\%$). Il n'est donc pas nécessaire de contrôler le pourcentage de chimérisme sur sang total par une deuxième technique, ce qui est en accord avec la procédure prévue au laboratoire. Ces contrôles excessifs auraient un impact négatif sur le plan économique et sur les délais de rendus des résultats.

Concernant les corrélations entre le pourcentage de chimérisme obtenu par chimie TaqMan® et VNTR ou STR, elles sont excellentes, et plus forte entre TaqMan® et étude des STR qu'entre TaqMan® et étude des VNTR. Entre 0 et 100%, les coefficients de corrélation par rapport à la méthode TaqMan® sont respectivement de 0,9825 et de 0,9566 (Tableau 10).

	Comparaison TaqMan® et étude des STR			Comparaison TaqMan® et étude des VNTR		
	Chimérisme 0-100%	Chimérisme 10-90%	Chimérisme >90%	Chimérisme 0-100%	Chimérisme 10-90%	Chimérisme >90%
Effectifs	41	9	30	277	60	203
Coefficient de corrélation (r ²)	0,9825	0,9150	0,8119	0,9566	0,7692	0,3122
Equation de la droite en fonction du résultat TaqMan®	$Y = 0,9527 * X + 4,947$	$Y = 0,9586 * X + 6,018$	$Y = 0,3730 * X + 62,20$	$Y = 0,9747 * X + 1,959$	$Y = 0,8769 * X + 6,304$	$Y = 0,8565 * X + 13,96$

Tableau 10 : Corrélation entre pourcentage de chimérisme obtenus par PCR quantitative en temps réel par chimie TaqMan® et étude des VNTR ou des STR

Si l'on s'intéresse uniquement aux chimérismes compris entre 10 et 90% donneur par chimie TaqMan®, situation pour laquelle la PCR quantitative est peu linéaire et reproductible, ces coefficients de corrélation sont moins élevés, respectivement 0,9150 et 0,8119 pour l'étude des STR et des VNTR (Tableau 10). L'étude des STR reste cependant mieux corrélée à la PCR quantitative que l'étude des VNTR, ce qui justifie son utilisation, l'étude des VNTR ne permettant qu'une appréciation du chimérisme à ± 10 -20% (Figure 16). Ainsi, le résultat de la technique STR permet de confirmer ou d'affiner la fourchette du résultat de la PCR quantitative dans l'intervalle 10-90% donneur.

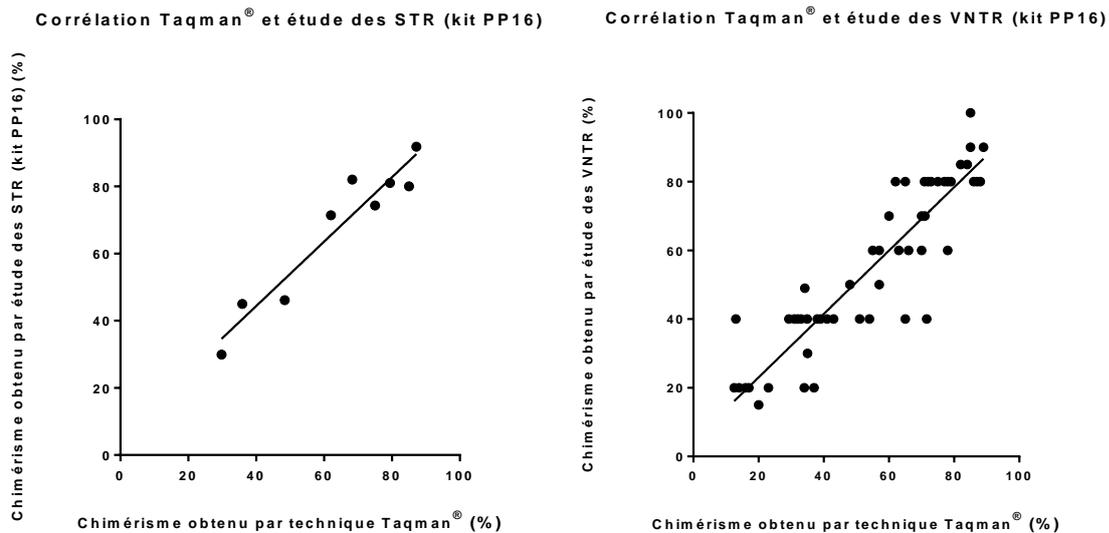


Figure 16 : Pourcentages de chimérisme obtenus par étude des STR ou des VNTR par rapport aux résultats compris entre 10 et 90% donneur par chimie TaqMan®

Si la quantité d'ADN est inférieure à 250ng, la sensibilité de la technique de PCR quantitative diminue et l'étude des VNTR était privilégiée, même en cas de pourcentage de chimérisme supérieur à 90% donneur. Nous nous sommes intéressés à la différence de pourcentage entre les résultats obtenus par étude des VNTR ou des STR et les résultats obtenus par PCR quantitative par chimie TaqMan®. Les performances des études des VNTR et STR ne sont pas diminuées en cas de quantité d'ADN inférieure à 250 ng, à l'inverse de la PCR quantitative par chimie TaqMan®. Il apparaît que les différences de pourcentages ne sont pas augmentées en dessous de 250 ng (Figure 18). Même si la sensibilité de la PCR quantitative par chimie TaqMan® diminue, et passe de 0,001% à 250 ng à 0,01% à 150 ng, elle reste très inférieure à la sensibilité des techniques d'étude des STR (environ 5%) et des VNTR (10-20%). Si l'ADN est de bonne qualité, le pourcentage de chimérisme reste fiable, la différence de pourcentage par rapport à l'autre technique n'étant pas plus éloignée de 0, et ne dépassant pas le seuil de sensibilité de l'étude des STR (5%) ou des VNTR (10 à 20%). Des résultats interprétables en PCR quantitative ont été obtenus pour des dosages d'ADN compris entre 7 et 50 ng/μL ($30,3 \pm 1,5$ ng/μL ; n=72), tandis que des échecs par PCR quantitative sont retrouvés entre 5 et 43 ng/μL ($24,5 \pm 3,9$ ng/μL ; n=15). Le dosage d'ADN ne permet donc pas de préjuger de la qualité de l'ADN, seul le Ct du gène *GAPDH* est informatif. Aucun seuil limite ne peut donc être fixé, et seules des exigences de sensibilité limitent le rendu de résultats, pour de faibles quantités d'ADN.

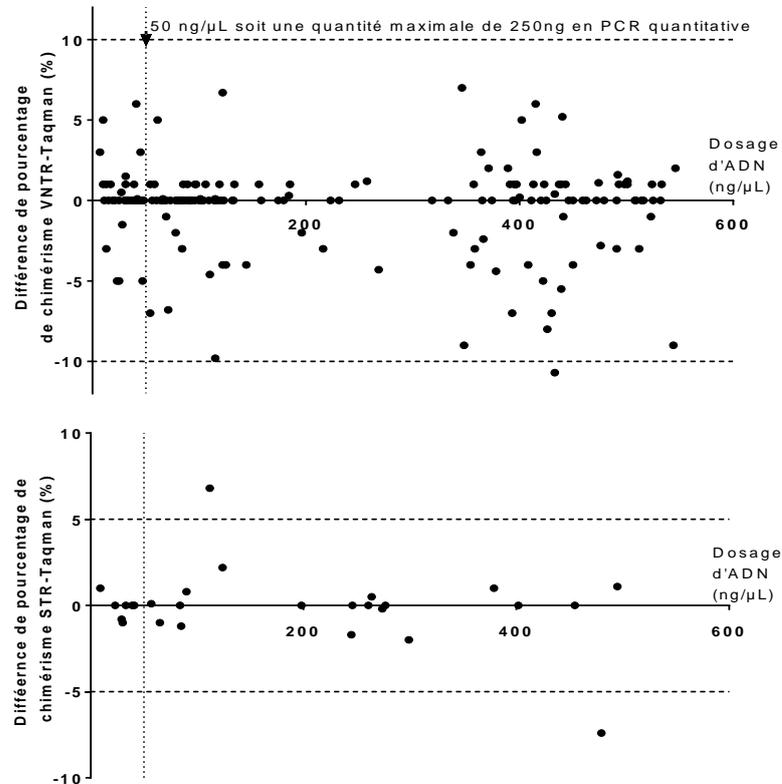


Figure 18 : Différences des pourcentages de chimérisme obtenus par étude des VNTR ou STR – pourcentages obtenus par PCR quantitative, en fonction de la quantité d'ADN post-allogreffe. VNTR en haut, STR en bas. Les seuils de sensibilité sont représentés par des pointillés horizontaux, à 5% pour l'étude des STR, et 10 à 20% pour l'étude des VNTR

A noter que sur 36 comparaisons entre PCR quantitative et étude des STR, 2 chimérismes étaient considérés comme complets par étude des STR, et mixtes par PCR quantitative (100% vs 93,2% ; 97,2% vs 95% donneur), et un autre était à l'inverse sous-estimé par étude des STR (90% vs 97,4% donneur). Les quantités d'ADN étaient supérieures à 250 ng.

En conclusion, l'étude des STR permet bien d'obtenir une meilleure corrélation avec la PCR quantitative par chimie TaqMan® que l'étude des VNTR, qui souffre d'une faible sensibilité. Ces résultats valident le choix fait par le laboratoire d'abandonner l'étude des VNTR, et de réaliser une confirmation du résultat de PCR quantitative par études des STR si le pourcentage de chimérisme est compris entre 10 et 90% donneur. Pour des pourcentages de chimérisme supérieurs à 90% donneur, de faibles quantités d'ADN impactent la sensibilité de la PCR quantitative, mais celle-ci reste supérieure à celle par étude des STR, et les résultats des deux techniques sont aussi bien corrélés que pour des quantités d'ADN supérieures. Un contrôle par étude des STR n'est donc pas nécessaire en cas de faible quantité d'ADN, si l'ADN est de bonne qualité, et si les résultats sont cohérents avec les antériorités. En cas d'évolution significative du pourcentage de chimérisme par rapport à l'antériorité, un contrôle par étude des STR reste cependant souhaitable.

5.3. Pathologies non malignes : les aplasies médullaires

Dans notre cohorte adulte, seuls 15 patients ont bénéficié d'une allogreffe de CSH dans le cadre d'une pathologie non maligne, tous dans le cadre d'une aplasie ayant reçu un conditionnement atténué. Six patients présentaient un clone HPN sous sa forme aplasique en cytométrie et les 9 autres ont présenté une aplasie médullaire qualifiée d'idiopathique. Aucun des 15 patients n'a manifesté de rechute documentée. Un patient est décédé à 80 jours post-allogreffe d'une défaillance multiviscérale, sans être sorti d'aplasie et avec des CC à J30 et J60 sur sang total, attestant de la prise de greffe. Trois autres patients étaient toujours dépendants des transfusions à J100, malgré un CC sur sang total. Dix donneurs étaient génoidentiques, un haploidentique, quatre phénoïdentiques au receveur (Tableau 11).

	Effectifs (/15 patients)
Type d'aplasie :	
- Avec clone HPN	6
- Idiopathique	9
Donneur :	
- Génoidentique	10
- Phénoïdentique	4
- haploidentique	1
Greffon issu de :	
- MO	9
- CSP	6

Tableau 11 : Effectifs des patients allogreffés pour aplasie médullaire

Un CM serait associé aux greffons issus du MO : parmi les 9 greffons issus de MO, 3 patients sur 4 présentaient un CM sur population lymphoïde T à J30 et 4 autres patients étaient en échec. Parmi les 6 greffons issus d'une collecte de CSP, un seul a présenté un chimérisme inférieur ou égal à 95% donneur à J30, sur sang total (95%, 1 patient/5) et sur population lymphoïde T (90%, 1 patient/4) et un autre était en échec sur population lymphoïde T. A J100, 6 patients sur 7 présentent un chimérisme inférieur ou égal à 95% donneur parmi ceux avec greffon issu de MO, contre 1 patient sur 4 pour ceux ayant reçu des CSP (Tableau 12).

Greffon	Patients avec chimérisme \leq 95% à J30			Patients avec chimérisme \leq 95% à J100		
	Sang total	Myéloïde	Lymphoïde T	Sang total	Myéloïde	Lymphoïde T
MO	3/9	1/9	3/4 ; 4 échecs	4/8	1/7	6/7
CSP	1/5	0/5	1/4; 1 échec	¼	0/4	¼

Tableau 12 : Profil de chimérisme des patients allogreffés pour aplasie médullaire

Ces allogreffes sont bien tolérées, comme cela est confirmé sur notre cohorte, avec un seul patient ayant présenté des manifestations de GVHa de score II et 3 de score I de Glucksberg. Un seul patient avec signe de GVH a présenté un CM à J100, sur sang total et sur population lymphoïde T. Ce patient présentait une GVHa de score I, mais il a finalement perdu son greffon. Trois patients ont manifesté des signes de GVHc. Le premier patient est celui ayant présenté des manifestations de GVHa de score II et a présenté par la suite une GVHc cutanée et hépatique. Le deuxième est l'un des 3 patients avec une GVHa de score I, et a présenté une GVHc cutanéomuqueuse. Le troisième patient, n'ayant pas été sujet à une GVHa a également manifesté des signes cutanéomuqueux de GVHc. Au total, 5 patients ont eu des signes de GVHa et/ou de GVHc et un seul a eu un chimérisme inférieur à 95% donneur, sur sang total et sur population lymphoïde T à J100 (Tableau 13). A l'inverse, parmi les 10 patients sans GVHa et/ou GVHc, 7 ont présenté soit à J30 soit à J100 un chimérisme inférieur ou égal à 95% donneur sur population lymphoïde T (à J30, 4 CM/6 allant de 20 à 79% et à J100, 6 CM/6 allant de 11 à 95% donneur à J100) et dans une moindre mesure sur sang total (à J30, 3/10 allant de 80 à 95% donneur et à J100, 3/8 allant de 82 à 95% donneur) (Tableau 13). Un seul patient a présenté un CM sur population myéloïde (95% à J30, 87% à J100), sans qu'il ne présente d'évènement indésirable post-allogreffe.

	Chimérisme sur sang total		Chimérisme sur population lymphoïde T	
	≤95% à J30	≤95% à J100	≤95% à J30	≤95% à J100
GVHa et/ou GVHc	1/5	1/5	1/5	1/5
Absence de GVH	4/6	6/6	3/10	3/8

Tableau 13 : Suivi de chimérisme à J30 et à J100 en fonction de la survenue d'une GVH ou non

Globalement, ces patients ayant bénéficié d'un conditionnement atténué, certains d'entre eux présentent un CM. Les faibles effectifs ne permettent pas d'analyse statistique. Les chimérismes sur sang total sont peu discriminants. En revanche, le chimérisme sur population lymphoïde T, serait plus fréquemment mixte en cas de greffon issu de MO et en absence de GVHa. Il s'agit de la majorité des patients, les épisodes de GVHa ou de GVHc étant peu fréquents et non recherchés dans cette indication de greffe. Les échecs dus à de faibles quantités d'ADN à J30 limitent les conclusions quant à l'évolution de ces CM, mais 4 patients sur 5 avec CM à J30 ont un pourcentage de chimérisme plus bas à J100. Un suivi à J60 permettrait de préciser cette cinétique.

5.4. Pathologies malignes

Les analyses ci-après ont été réalisées sur tous les patients, à l'exception de ceux allogreffés pour aplasie (n=243). Ils présentaient donc tous une hémopathie maligne, avec un objectif de remplacement de la totalité du système hématopoïétique, ce qui n'est pas le cas dans les aplasies, où le maintien d'une hématopoïèse résiduelle du receveur n'est pas inquiétant.

Le greffon était issu de CSP dans 78% des cas (n=189), de MO dans 17% des cas (n=41) ou d'USP dans 5% des cas (n=13) avec 58% de donneurs phénoïdiques (n=142), 40% génoïdique (n=97) et 2% haploïdique (n=5) (Tableau 14). Aucune différence de survie n'a été retrouvée en fonction du greffon issu de CSP ou de MO ($p=0,1750$, $\text{Khi}^2=1,839$) et du type de donneur, phénoïdique ou génoïdique ($p=0,0975$; $\text{Khi}^2=2,746$).

	Génoïdique	Phénoïdique	Haploïdique	Total
CSP	80 (33%)	109 (45%)	0 (0%)	189 (78%)
MO	17 (7%)	21 (9%)	3 (1%)	41 (17%)
USP	0 (0%)	11 (4%)	2 (1%)	13 (5%)
Total	97 (40%)	142 (58%)	5 (2%)	243

Tableau 14 : Répartition des patients allogreffés pour hémopathie maligne, en fonction du type de greffe et de greffon

Il apparaît que les greffons issus de CSP sont significativement plus riches en cellules hématopoïétiques nucléées CD45+ ($p<0,0001$), et en particulier en cellules CD34+ ($p<0,0001$) et CD3+ ($p<0,0001$) (Tableau 15).

		Richesse du greffon	Effectifs	Valeurs p
Cellules nucléées CD45+ ($10^8/\text{kg}$)	MO	$2,79 \pm 0,37$	41	<0,0001
	CSP	$9,56 \pm 0,25$	176	
Cellules CD34+ ($10^6/\text{kg}$)	MO	$2,84 \pm 0,26$	41	<0,0001
	CSP	$7,49 \pm 0,27$	191	
Cellules CD3+ ($10^7/\text{kg}$)	MO	$3,95 \pm 1,02$	41	<0,0001
	CSP	$25,50 \pm 0,77$	189	

Tableau 15 : Richesse cellulaire en fonction du type de greffon

Concernant les études de chimérisme, les analyses statistiques dépendent du seuil fixé pour définir un CC. A titre d'exemple, à J30, avec un seuil de 90% donneur pour différencier CM de CC, les proportions de CM sont respectivement de 1/94 et 13/140 pour des conditionnements standards et atténués ($p=0,0097$). Au seuil de 95% donneur, elles sont de 4/94 et 25/140 ($p=0,0020$) ; au seuil de 98% donneur, elles sont de 9/94 et 49/140 ($p<0,0001$) (Tableau 16). Dans cet exemple, un conditionnement atténué est associé à un CM de manière significative quel que soit le seuil, mais la significativité varie.

Pour définir ce seuil, des arguments de sensibilité de la technique et de pertinence clinique sont considérés. La majorité des études menées jusqu'à présent définissent un seuil à 95% donneur, car elles reposent sur une étude des STR dont la sensibilité ne permet pas d'affirmer qu'un chimérisme est complet au-delà de 95% donneur. L'étude des VNTR est peu sensible, le seuil peut difficilement être fixé au-dessus de 90% donneur pour définir un CC. La méthode par chimie TaqMan® est très sensible, et permet de définir un seuil théorique de chimérisme complet à 99% ou supérieur. Dans la suite des analyses statistiques, nous avons choisi le seuil de 95% donneur, qui correspond aux dernières recommandations de la SFGM-TC (AHPA 2016) et permet d'être homogène avec d'autres études, même si la majorité des résultats ayant été obtenus par méthode TaqMan®, un seuil plus élevé aurait été possible. Les patients suivis par étude des VNTR ou STR l'ont été majoritairement pour confirmer un chimérisme compris entre 10 et 90% donneur par chimie TaqMan®, ou parfois en cas de faible quantité d'ADN, inférieure à 250ng d'ADN.

	Chimérisme sur sang total	Conditionnements standards	Conditionnements atténués	Valeurs p
Sur sang total				
Sang total J30	Chimérisme \leq 90%	1/94 (1%)	13/140 (9%)	0,0097
	Chimérisme \leq 95%	4/94 (4%)	25/140 (18%)	0,0020
	Chimérisme \leq 98%	9/94 (10%)	49/140 (35%)	<0,0001
	Pourcentage de chimérisme	99,23 \pm 0,16%	96,75 \pm 0,58%	<0,0001
Sang total J100	Chimérisme \leq 90%	2/74 (3%)	12/124 (10%)	0,0856
	Chimérisme \leq 95%	2/74 (3%)	20/124 (16%)	0,0040
	Chimérisme \leq 98%	4/74 (5%)	30/124 (24%)	0,0007
	Pourcentage de chimérisme	99,20 \pm 0,30%	95,30 \pm 1,249%	0,0074
Sur population myéloïde				
Myéloïde J30	Chimérisme \leq 95%	0/22 (0%)	11/124 (9%)	NS (0,2173)
	Pourcentage de chimérisme	100,00 \pm 0,00%	97,47 \pm 1,03%	0,0008
Sur population lymphoïde T				
Lymphoïde T J30	Chimérisme \leq 95%	11/20 (55%)	53/100 (53%)	NS (1,000)
	Pourcentage de chimérisme	91,57 \pm 2,32%	82,49 \pm 2,57%	NS (1,000)

Tableau 16 : Suivi de chimérisme à J30 et à J100 en fonction du type de conditionnement

D'autre part, ces données confirment bien qu'un CM sur sang total, à J30 comme à J100, est beaucoup plus rare avec un conditionnement standard (Tableau 15 et Figure 19), la moelle du receveur étant détruite selon des modalités plus intensives. La moyenne de chimérisme est significativement plus basse pour les conditionnements atténués par rapport aux conditionnements standards sur sang total, à J30 ($p < 0,0001$) et à J100 ($p = 0,0074$) et également sur population myéloïde à J30 ($p = 0,0008$), mais pas sur population lymphoïde T (Tableau 16). Ces données sont confirmées en proportions au seuil de 95% donneur à J30 et à J100 sur sang total (respectivement $p = 0,0020$ et $p = 0,0040$) mais pas sur population myéloïde ($p = 0,2173$).

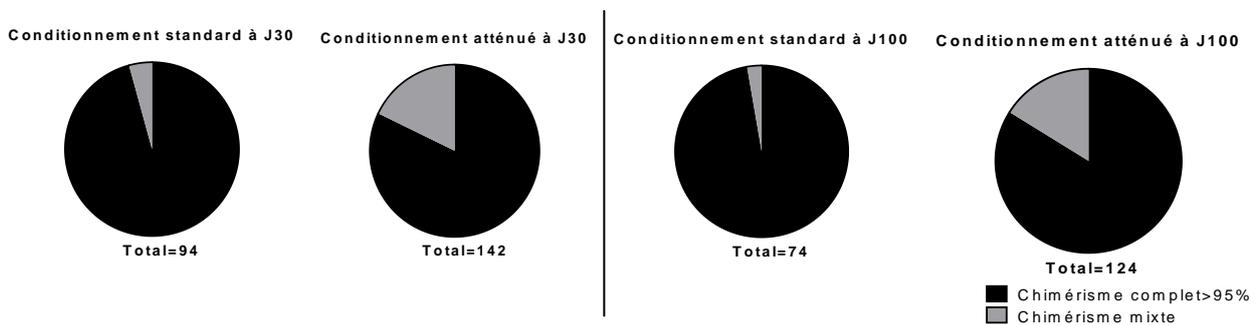


Figure 19 : Proportion des patients avec chimérisme mixte ou complet sur sang total. Chimérismes à J30 à gauche, à J100 à droite. Le seuil de définition du CC est défini comme supérieur à 95% donneur.

Les analyses statistiques ultérieures ont été réalisées en séparant les 96 patients ayant bénéficié d'un conditionnement standard (39%) des 149 ayant bénéficié d'un conditionnement atténué (61%), compte-tenu de profils de chimérisme différents.

De plus, le type de conditionnement détermine le calendrier de suivi de chimérisme au Centre Henri Becquerel, un tri cellulaire n'étant pas prévu en cas de conditionnement standard, en dehors des greffes haploidentiques. Toutefois, 29 patients sur 96 ont bénéficié d'un tel tri cellulaire sur au moins un prélèvement, notamment les 7 patients conditionnés par traitement myéloablatif modéré (FB3, FB4) dont le chimérisme évolue potentiellement de manière intermédiaire entre un conditionnement myéloablatif standard et un conditionnement atténué. A noter que les patients ayant reçu un conditionnement standard sont plus jeunes que ceux ayant bénéficié d'un conditionnement atténué (37 ± 11 ans ; contre 53 ± 11 ans pour les conditionnements atténués ; $p < 0,0001$), ce qui est cohérent avec les indications des conditionnements atténués.

Les greffons issus de MO semblent privilégiés lors des conditionnements standards (34/96 soit 35% dans les conditionnements standards ; contre 7/148 soit 5% dans les conditionnements atténués ; $p < 0,0001$), et davantage de GVHa (45/96 soit 64% ; contre 48/149 soit 33% ; $p < 0,0001$) (Tableau 17). Les greffons issus de MO sont moins riches en cellules mais cela n'explique pas la fréquence augmentée de GVHa. En effet, les patients ayant présenté une GVHa n'ont pas un greffon significativement moins riche, même en séparant greffons issus de MO et de CSP, que ce soit pour les patients ayant reçu un conditionnement standard ou atténué. Aucune association n'est non plus retrouvée entre GVHc et richesse du greffon. Cette augmentation de GVHa par rapport aux conditionnements atténués peut s'expliquer par la nature plus intensive du conditionnement, qui faciliterait l'implantation du greffon. En effet, l'hématopoïèse du receveur ayant été détruite, il n'y a pas de compétition entre hématopoïèses du receveur et du donneur. L'hématopoïèse de type donneur serait alors active plus précocement, provoquant des réactions immunitaires précoces, de type GVHa.

	Conditionnement standard	Conditionnement atténué	Total	Valeurs p
CSP	59 (62%)	132 (90%)	191 (78%)	<0,0001 K _{hi} ² = 38,97
MO	34 (35%)	7 (5%)	41 (17%)	
USP	3 (3%)	8 (5%)	11 (5%)	
Génoïdétique	35 (36%)	62 (42%)	97 (40%)	NS
Phénoïdétique	60 (6%)	81 (55%)	141 (58%)	
Haploïdétique	1 (10%)	4 (3%)	5 (2%)	
GVHa 0-I	26 (37%)	99 (67%)	125 (56%)	<0,0001 K _{hi} ² = 18,48
GVHa II, III, IV	45 (64%)	48 (33%)	93 (44%)	
pas de GVHc	39 (50%)	67 (51%)	106 (50%)	NS
GVHc	49 (50%)	65 (49%)	104 (50%)	
Rechute	22 (23%)	65 (44%)	87 (36%)	0,0007 K _{hi} ² = 11,46
pas de rechute	74 (77%)	82 (56%)	156 (64%)	
Décédé	42 (44%)	81 (55%)	123 (51%)	NS
en vie	54 (56%)	66 (45%)	120 (49%)	
Total	96 (39%)	147 (61%)	243 (100%)	

Tableau 17 : Caractéristiques des patients allogreffés pour hémopathie maligne en fonction du type de conditionnement

Le pourcentage de rechute est plus élevé ($p=0,0007$) en cas de conditionnement atténué (65/147 ; 44%) par rapport aux conditionnements standards (22/96 ; 23%), avec un impact négatif sur la survie sans rechute ($p=0,0023$, $\text{Khi}^2=9,278$), ce qui justifie également l'étude séparée des deux types de conditionnement (Figure 20). Cette différence peut s'expliquer car la population bénéficiant d'une greffe avec conditionnement atténué est une population plus fragile, notamment plus âgée et présentant des comorbidités. L'âge étant associé à une baisse globale de l'immunité, l'effet GVL pourrait être réduit chez ces patients, ce qui pourrait expliquer la diminution de survie sans rechute de ces patients. En survie globale, la tendance est similaire mais non significative : $p=0,1667$; $\text{Khi}^2=1,912$ (Figure 20).

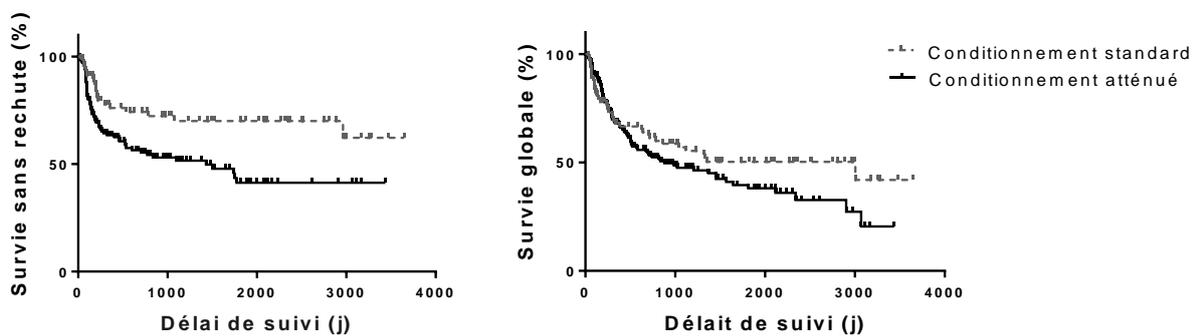


Figure 20 : Survie sans rechute et survie globale en fonction du type de conditionnement
Courbes en pointillés : conditionnement standard myéloablatif ; courbes continues : conditionnement atténué

Globalement, le profil de chimérisme, les modalités de suivi du chimérisme, le type de greffon, la survenue d'une GVHa et la survie sans rechute diffèrent entre conditionnements standards et atténués.

5.4.1. Conditionnements standards

Chez les patients ayant bénéficié d'un conditionnement standard, le chimérisme n'est pas significativement différent en fonction du type de greffon, du couple donneur-receveur, de la survenue de GVHc ou d'une rechute. Très peu de patients présentent un CM sur sang total à J30 (4/94 soit 4%, pourcentages compris entre 90 et 95% donneur) et à J100 (2/74 soit 3%, un à 80%, l'autre à 90% donneur). Peu de tris cellulaires ont été réalisés, 29 patients sur 96, à J30 et/ou à J100. Tous les tris sur population myéloïde ont mis en évidence un CC, à 99 ou 100% donneur. En revanche, sur 20 tris sur population lymphoïde T à J30, 11 étaient inférieurs ou égal à 95% donneur (en moyenne $85,49 \pm 3,21\%$), sans association avec un type de conditionnement (avec ou sans ICT, busulfan, protocole FB3) ou un autre paramètre (origine du greffon, GVH, rechute). A J100, 2 patients sur 21 présentaient un CM sur population lymphoïde T (l'un à 83, l'autre à 90% donneur).

Les manifestations majeures de GVHa, de score II, III ou IV de Glucksberg surviennent chez des patients présentant un chimérisme significativement plus élevé à J30 sur sang total ($p=0,0338$). Cependant, cette différence est inférieure à 1% sur la moyenne des pourcentages des deux groupes et n'est pas retrouvée en comparaison de proportion ($p=0,6622$) (Tableau 18). Cette donnée est toutefois cohérente avec la littérature, et peut s'expliquer par une prépondérance d'une hématopoïèse de type donneur, interagissant fortement avec les CPA du receveur, mais ne peut pas être utilisable à l'échelle d'un individu.

		Pourcentage de chimérisme	Effectifs	valeur p	Chimérisme $\leq 95\%$	Valeurs p
Sang total J30	GVHa 0-I	$99,02 \pm 0,254\%$	50	0,0338	2/50	NS (0,6622)
	GVHa II, III, IV	$99,47 \pm 0,167\%$	44		3/44	

Tableau 18 : Pourcentages de chimérisme à J30 sur sang total en fonction de la survenue d'une GVHa ou non

5.4.2. Conditionnements atténués

Les tris cellulaires myéloïde et lymphoïde T ayant été très majoritairement réalisés dans le groupe des patients recevant un conditionnement atténué, les effectifs nous permettent davantage d'études statistiques.

5.4.2.1. *Type de greffon*

En cas de couple donneur-receveur génoïdétique, le chimérisme est significativement plus bas à J30 par rapport à un couple phénoïdétique sur sang total ($p=0,0003$), sur population lymphoïde T ($p=0,0354$), mais pas sur population myéloïde. Si l'on compare le statut CM ou CC au seuil de 95% donneur, cette différence n'est significative que sur sang total ($p=0,0447$ contre $p=0,0647$ sur population lymphoïde T) (Tableau 19). Beaucoup de patients avec greffon phénoïdétique présentent en effet un chimérisme élevé, mais inférieur à 95% donneur, donc classé comme CM sur population lymphoïde T.

		Pourcentage de chimérisme	Effectifs	Valeurs p	Chimérisme $\leq 95\%$	Valeurs p
Sang total J30	Génoïdétique	95,55 \pm 0,93%	61	0,0003	16/61	0,0447
	Phénoïdétique	97,59 \pm 0,76%	75		9/75	
Myéloïde J30	Génoïdétique	96,68 \pm 1,52%	56	NS (0,5227)	8/56	NS (0,1095)
	Phénoïdétique	98,03 \pm 1,46%	66		3/66	
Lymphoïde T J30	Génoïdétique	77,33 \pm 3,74%	48	0,0354	31/48	NS (0,0647)
	Phénoïdétique	86,41 \pm 3,70%	48		21/48	

Tableau 19 : Pourcentages de chimérisme à J30 sur sang total et sur population lymphoïde T en fonction du caractère génoïdétique ou phénoïdétique du donneur par rapport au receveur

Ainsi, il existe donc un retard d'obtention du CC, qui disparaît à J100 si le donneur est génoïdétique au receveur. Ce résultat peut s'expliquer par une moindre alloréactivité. Si l'on s'intéresse aux patients avec alloréactivité accrue, les 4 patients avec greffon haploïdétique présentaient des chimérismes élevés à J30 et J100, généralement supérieurs à 99% donneur sauf un patient avec un chimérisme à 90% donneur sur population lymphoïde T à J30, et un autre avec des chimérismes sur sang total et sur population myéloïde respectivement à 98,20% et 98,30% à J100. Parmi les 10 patients avec mismatch 9/10 et les 5 avec mismatch 4/6 ou 5/6, les 12 chimérismes sur sang total à J30 et les 13 à J100 étaient complets. Les seuls CM mis en évidence sont retrouvés dans la population lymphoïde T à J30 (3 des 7 patients étudiés). Au total, moins la compatibilité HLA est importante, plus le chimérisme semble élevé sur sang total et sur population lymphoïde T. Le chimérisme sur population lymphoïde T ne semble pas plus discriminant que sur sang total.

A noter que le type de greffon (MO, CSP ou USP) n'a pas d'impact sur le pourcentage de chimérisme post-allogreffe. Concernant la richesse du greffon, seuls les greffons issus de CSP ont été analysés, peu de greffes avec MO ou USP ayant été réalisées en cas de conditionnement atténué. Le nombre de cellules CD45+ dans le greffon n'a alors pas d'influence significative sur le chimérisme post-allogreffe. Le nombre de cellules CD34+ est significativement plus élevé, pour un CC à J30 ($p=0,0054$), et surtout, les CC à J30 sur sang total, ou à J100 sur sang total et population lymphoïde T sont associés à des greffons plus riches en cellules CD3+ (respectivement $p=0,0127$; $0,0149$ et $0,0078$) (Tableau 20). La richesse en cellules CD34+ permettrait donc une reconstitution hématopoïétique plus rapide et la richesse en cellules CD3+ aurait également une influence importante sur cette reconstitution post-allogreffe. Plus le greffon serait riche, plus le chimérisme serait élevé, particulièrement sur sang total et dans une moindre mesure sur population lymphoïde T. Concernant les cellules CD3+, cela peut-être lié à la richesse cellulaire mais peut-être aussi à la diversité du répertoire T transféré.

			Richesse en cellules CD3+ ($10^7/\text{kg}$)	Effectifs	Valeurs p
Richesse en CD3+	Sang total J30	Chimérisme $\leq 95\%$	$20,39 \pm 1,78$	24	0,0155
		Chimérisme $> 95\%$	$25,97 \pm 1,00$	108	
	Sang total J100	Chimérisme $\leq 95\%$	$18,73 \pm 2,07$	16	0,0101
		Chimérisme $> 95\%$	$25,66 \pm 0,96$	116	
	Lymphoïde T J100	Chimérisme $\leq 95\%$	$20,58 \pm 1,59$	31	0,0058
		Chimérisme $> 95\%$	$26,12 \pm 1,03$	101	
Richesse en CD34+	Sang total J30	Chimérisme $\leq 95\%$	$5,90 \pm 0,57$	24	0,0061
		Chimérisme $> 95\%$	$7,71 \pm 0,35$	108	

Tableau 20 : Richesse du greffon en cellules CD3+ et CD34+ en fonction du chimérisme Suivi de chimérisme à J30 et J100. Tableau présentant uniquement les résultats significatifs

5.4.2.2. Evolution post-allogreffe

5.4.2.2.1. GVH

De manière plus franche que chez les patients ayant bénéficié d'un conditionnement standard, des manifestations majeures de GVHa (score II, III ou IV de Glucksberg) apparaissent en cas de chimérisme plus élevé à J30 sur sang total. Ce résultat est confirmé sur population lymphoïde T à J30 et aussi à J100, avec un écart de pourcentages plus important que sur sang total (Tableau 21). Un pourcentage de chimérisme élevé est donc associé à la survenue d'une GVHa, quel que soit le conditionnement (Tableaux 18 et 21), avec une différence plus importante en pourcentage sur population lymphoïde T en cas de conditionnement atténué, ce qui faciliterait en pratique l'interprétation. A noter également que les résultats de chimérisme à J30 et J100 ne sont pas prédictifs d'une GVHc.

		Pourcentage de chimérisme	Effectifs	Valeurs p	Chimérisme $\leq 95\%$	Valeurs p
Sur les patients avec conditionnement atténué						
Sang total J30	GVHa 0-I	95,97 \pm 0,817%	95	0,0204	22/95	0,0182
	GVHa II, III, IV	98,41 \pm 0,452%	45		3/45	
Lymphoïde T J30	GVHa 0-I	79,33 \pm 3,264%	68	0,0285	41/68	0,0524
	GVHa II, III, IV	89,20 \pm 3,856%	32		12/32	
Lymphoïde T J100	GVHa 0-I	87,53 \pm 2,660%	72	0,0137	28/72	0,0035
	GVHa II, III, IV	94,24 \pm 3,242%	35		4/35	
Sur tous les patients, quel que soit le conditionnement						
Sang total J30	GVHa 0-I	97,02 \pm 0,555%	145	0,0004	24/145	0,0063
	GVHa II, III, IV	98,93 \pm 0,248%	89		4/89	

Tableau 21 : Pourcentages de chimérisme à J30 et à J100 sur sang total et sur population lymphoïde T en fonction de la survenue d'une GVHa ou non

5.4.2.2.2. Rechute

La survenue d'une rechute est associée à un pourcentage de chimérisme plus bas à J100 sur sang total ($p=0,0064$) et sur population lymphoïde T ($p=0,0022$), avec des CM significativement plus nombreux sur population lymphoïde T ($p=0,0133$) (Tableau 22). Ce résultat était attendu, car on considère toutes les rechutes même celles survenues avant J100. A J30, ces résultats ne sont pas significatifs, probablement car le CM est alors plus fréquent et imputable à d'autres paramètres de tels que la reconstitution hématopoïétique, le type de donneur, génoidentique plutôt que phénoïdentique, et la GVHa.

De plus, certaines rechutes étant extramédullaires, il est tout à fait logique que le chimérisme ne soit pas impacté, notamment dans les LAM sous forme de sarcomes granulocytaires localisés (4 patients dans la cohorte), ou dans les lymphomes (2 LHc, un LNH-B). Dans le MM, un faible pourcentage de cellules tumorales plasmocytaires n'exclue pas une rechute, l'infiltration médullaire étant fréquemment focale.

De manière plus intéressante, le suivi de chimérisme à J100 sur population lymphoïde T serait prédictif d'une rechute ultérieure, avec un chimérisme significativement plus bas en cas de rechute ($p=0,0065$) et par conséquent une proportion de CM plus importante, sans atteindre le seuil de significativité ($p=0,1474$) (Tableau 22). Au final, un CM serait associé à un risque de rechute plus important, mais doit être confirmé par d'autres examens, le chimérisme dépendant d'autres facteurs. La population lymphoïde T à J100 apparaît particulièrement intéressante et un point de suivi à J60 pourrait permettre d'anticiper le risque de rechute.

		Pourcentage de chimérisme	Effectifs	Valeurs p	Chimérisme $\leq 95\%$	Valeurs p
Rechute avant ou après J100						
Sang total J100	Toute rechute	92,17 \pm 2,61%	52	0,0013	14/52	0,1502
	Absence de rechute	97,56 \pm 0,98%	72		6/72	
Lymphoïde T J100	Toute rechute	82,28 \pm 4,59%	42	0,0022	17/42	0,0133
	Absence de rechute	93,11 \pm 2,07%	66		16/66	
Rechute après J100						
Lymphoïde T J100	Rechute après J100	84,36 \pm 7,38%	30	0,0108	12/30	0,1474
	Absence de rechute	93,11 \pm 2,07%	66		16/66	

Tableau 22 : Pourcentages de chimérisme à J100 en fonction de la survenue ou non d'une rechute

5.4.2.3. Type d'hémopathie

Nous nous sommes également intéressés à l'apport du tri sur population spécifique de l'hémopathie. Concernant le tri sur population lymphoïde T, aucune conclusion n'est possible : uniquement 5 LNH-T ou LAL-T ont été allogreffés avec conditionnement atténué, deux ont rechuté, et le tri cellulaire n'a pas été effectué systématiquement à J30 et J100. En revanche, le tri sur population myéloïde est plus spécifique des pathologies myéloïdes et leurs effectifs sont conséquents (LAM, SMD, MF, LMC, LMMC, n=81 pour les conditionnements atténués). Ces pathologies ont été comparées aux hémopathies malignes non myéloïdes (LAL, LNH, MM, LHC, n=64). A J30, les pathologies non myéloïdes présentent un chimérisme plus volontiers mixte sur sang total ($p=0,0205$), sur population lymphoïde T ($p=0,0557$) et avec une plus grande significativité sur population myéloïde ($p=0,0036$) (Tableau 23). La reconstitution hématopoïétique serait donc plus rapide dans les pathologies myéloïdes et en particulier dans le compartiment myéloïde.

		Pourcentage de chimérisme	Effectifs	Valeurs p
Sang total J30	Myéloïde	97,21 ± 0,78%	77	0,0205
	Non myéloïde	96,20 ± 0,86%	63	
Myéloïde J30	Myéloïde	98,11 ± 1,48%	65	0,0036
	Non myéloïde	96,77 ± 1,45%	59	
Lymphoïde T J30	Myéloïde	83,29 ± 3,82%	50	0,0557
	Non myéloïde	81,69 ± 3,47%	50	

Tableau 23 : Pourcentages de chimérisme à J30 en fonction du type d'hémopathie, myéloïde ou non

En cas de rechute, les pathologies myéloïdes présentent un chimérisme significativement plus bas à J100, spécifiquement sur population myéloïde, par rapport aux pathologies non myéloïdes (Tableau 23). Sur sang total et population lymphoïde T, les pourcentages de chimérisme ne sont pas significativement différents, avec toutefois une tendance à des pourcentages de chimérisme plus élevés dans les pathologies non myéloïdes, dont certaines sont plus à risque de rechute extramédullaire. A J30, aucune différence significative n'est retrouvée.

		Pourcentage de chimérisme	Effectifs	Valeurs p
Sang total J100	Myéloïde	89,45 ± 4,17%	30	NS (0,4325)
	Non myéloïde	95,88 ± 2,28%	22	
Myéloïde J100	Myéloïde	91,60 ± 4,32%	27	0,0278
	Non myéloïde	97,95 ± 1,95%	20	
Lymphoïde T J100	Myéloïde	80,55 ± 5,92%	25	NS (0,9845)
	Non myéloïde	84,83 ± 7,43%	17	

Tableau 24 : Pourcentages de chimérisme à J100 en cas de rechute, en fonction du type d'hémopathie, myéloïde ou non

Concernant ces hémopathies myéloïdes, un chimérisme plus élevé sur population lymphoïde T à J30 est associé à la survenue d'une GVHc ($p=0,0060$) (Tableau 25), ce qui n'était pas retrouvé sur l'ensemble de la cohorte, mais va dans le même sens que l'augmentation du chimérisme en cas de GVHa. L'étude de la population lymphoïde T pourrait donc être intéressante pour explorer le processus de GVHc, notamment à J30.

En cas de rechute, la diminution du pourcentage de chimérisme est significative sur toutes les populations à J100, avec une plus grande significativité sur population myéloïde que sur population lymphoïde T (Tableau 25). La population myéloïde étant plus spécifique de la population tumorale, ce résultat est cohérent et est un argument pour que le tri cellulaire soit ciblé sur la population tumorale.

Pathologies myéloïde uniquement		Pourcentage de chimérisme	Effectifs	Valeurs p	Chimérisme $\leq 95\%$	Valeurs p
Sang total J30	GVHc	99,01 \pm 0,30%	29	0,0516	2/29	0,2852
	Absence de GVHc	96,78 \pm 1,14%	40		7/40	
Lymphoïde T J30	GVHc	92,97 \pm 3,67%	19	0,0060	4/19	0,0347
	Absence de GVHc	79,48 \pm 5,40%	26		14/26	
Sang total J100	Rechute	89,45 \pm 4,17%	30	0,0022	10/30	0,0323
	Absence de rechute	97,38 \pm 1,39%	39		4/39	
Myéloïde J100	Rechute	91,60 \pm 4,32%	27	0,0048	8/27	0,0133
	Absence de rechute	98,29 \pm 1,36%	37		2/37	
Lymphoïde J100	Rechute	80,55 \pm 5,92%	25	0,0300	11/25	0,0875
	Absence de rechute	91,61 \pm 3,84%	33		7/33	

Tableau 25 : Pourcentages de chimérisme à J30 et à J100 en fonction des évènements post-allogreffe

5.4.3. Evolution post-greffe : les manifestations de GVH chronique

Concernant les patients présentant une GVHc, les caractéristiques de celle-ci sont énoncées ci-après, pour l'ensemble des allogreffes d'hémopathies malignes, quel que soit le conditionnement.

104 patients sur les 210 ayant vécu au moins 100 jours post-allogreffe, ont présenté à un moment donné des manifestations de GVHc. Parmi ces 104 patients, il s'agissait pour 87 d'entre eux d'une GVH cutanéomuqueuse, le plus souvent sclérodermiforme. Les autres types de GVHc constatées étaient par ordre de fréquence : hépatiques, digestives, oculaires et pulmonaires. Elles concernaient dans la majorité des cas des patients présentant également une GVHc cutanée : 22 GVHc cutanées/28 patients avec GVHc hépatiques, 18/26 GVHc digestives, 17/19 GVHc oculaires et 11/16 GVHc pulmonaires. Quatre patients supplémentaires ne présentaient pas initialement de GVHc, mais celle-ci s'est manifestée après DLI sous une forme cutanéomuqueuse et hépatique. Les manifestations de GVHc n'ont pas d'impact sur la survie sans rechute. En revanche, il existe une tendance non significative à un impact délétère sur la survie globale : $p=0,0545$; $\text{Khi}^2=3,699$ en analyse de survie (Figure 21). Ainsi, 59 patients, sur 108 ayant présenté une GVHc, sont décédés contre 32 sur 102 patients indemnes de GVHc.

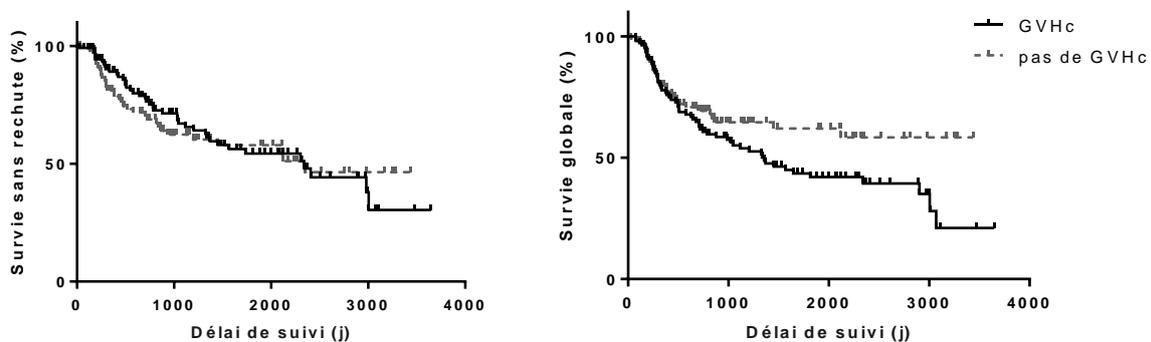


Figure 21 : Survie sans rechute et survie globale chez les patients ayant présenté ou non une GVHc

5.5. Patients ayant reçu des injections de lymphocytes du donneur

Dans la cohorte d'étude, 19 patients ont bénéficié de DLI au cours de leur suivi post-allogreffe. Ces patients avaient été allogreffés dans le cadre d'une LA pour 14 d'entre eux, d'un SMD pour un autre, d'un MM pour 3 patients et d'un LNH-B pour le dernier (Tableau 26). Parmi les LA, on compte 12 LAM dont 2 secondaires à une LMC, 2 LAL Phi+, dont une secondaire à une LMC et une LA biphénotypique Phi+. Le greffon était issu de CSP pour 17 patients, les deux autres ont reçu un prélèvement de MO. L'indication aux DLI était variable (Tableau 25). Au total, un seul patient a présenté des manifestations de GVHa (grade II), les 18 autres patients étant évalués avec un score de Glucksberg de 0 ou I (Tableau 26).

Trois patients ont eu une seule injection, le premier est décédé 20 jours après cette première injection des suites de sa rechute ; le deuxième, allogreffé pour MM, a vu son pic monoclonal régresser à 0,4 g/L et le chimérisme suivant était complet ; le troisième a bénéficié de DLI car il s'agissait d'une LAM à risque élevé de rechute, en progression au moment de l'allogreffe, mais ayant atteint un CC dès J30 (Tableau 26). Ce patient n'a jamais rechuté, mais est décédé d'une hépatite toxique associée à une aspergillose pulmonaire et à une dénutrition.

Quatre patients ont reçu deux injections et les 12 derniers patients ont eu trois injections. La première injection a été réalisée entre 77 et 820 jours après l'allogreffe, en moyenne 276 ± 201 jours. La deuxième suivait la première de 30 à 70 jours, et la dernière suivait la deuxième de 30 à 100 jours. Douze patients ont présenté des manifestations de GVHc dont 6 avant DLI, 10 post-DLI dont 4 avant puis après DLI.

Neuf patients présentaient avant DLI des CC supérieurs à 95% donneur sur sang total, sur population myéloïde et sur population lymphoïde T, mais présentaient un risque de rechute élevé. Trois patients présentaient un CM uniquement sur la population lymphoïde T (70%, 47% et 83% donneur). Ce CM a été corrigé post-DLI. Un patient est resté en rémission, les deux autres ont rechuté, dont un est décédé. Chez les trois derniers patients, l'injection de DLI n'a pas corrigé la baisse de chimérisme, deux sont décédés, le troisième conserve un CM sur les 3 populations, sans rechuter.

En conclusion, beaucoup de patients présentaient déjà un CC avant DLI, qui s'est maintenu ensuite. Parmi les patients avec CM avant DLI, certains patients ont atteint un CC tandis que d'autres ont maintenu un CM voire perdu leur greffon. Sur population lymphoïde T, population avec le plus grand nombre de CM avant DLI, seules 3 patients ont atteint un CC, sur les 7 avec CM. Les effectifs sont faibles et il n'y a pas d'impact évident des DLI sur l'évolution du pourcentage de chimérisme.

Âge	Indication de greffe	Marqueur moléculaire	Donneur	Greffon : MO ou CSP	Conditionnement	Score de GVHa	Motif des DLI	Nombres d'injections	Evolution du chimérisme post-DLI			GVHc post-DLI	Décès	
									Total	myéloïde	Lymphoïde T			
29	LAM		génénoïdentique	CSP	standard	0	Absence de GVH malgré l'arrêt des immunosuppresseurs	3	CC stable	CC stable	CM stable	non	oui	non
58	LAM		génénoïdentique	CSP	atténué	0	Chimérisme mixte	3				non	non	non
38	LAM		phénoïdentique	CSP	atténué	0	Chimérisme mixte	2	CC stable	CC stable	CC atteint	non	oui	oui
25	LAM	RUNX1-RUNX1T1	phénoïdentique	CSP	standard	0	Rechute moléculaire RUNX1-RUNX1T1	3				oui	oui	oui
34	LAM	CBFB-MYH11	phénoïdentique	MO	standard	1	Rechute moléculaire CBFB-MYH11	3	CC stable	CC atteint	CC atteint	oui	oui	non
49	LAM		génénoïdentique	CSP	standard	0	LAM réfractaire à J0 de la greffe sans GVHa	3	CC stable	CC stable	CC stable	non	oui	oui
53	LAM secondaire		génénoïdentique	CSP	standard	0	Evolutivité SMD	3		CC stable	CC stable	non	oui	oui
65	LAM secondaire		génénoïdentique	CSP	atténué	0	Perte complète de chimérisme	2	<5% stable	0% stable	<5% stable	non	non	oui
24	LAM secondaire		phénoïdentique	CSP	atténué	0	LAM réfractaire à J0 de la greffe	1		CC stable	CC stable	non	non	oui
37	LAM secondaire à une LMC	BCR-ABL	génénoïdentique	CSP	atténué	0	Rechute moléculaire BCR-ABL	3	CC stable	CC stable	CC stable	non	oui	oui
60	LAM secondaire à une LMC	BCR-ABL	génénoïdentique	CSP	atténué	0	Rechute moléculaire BCR-ABL	1	CC stable	CC stable	CC stable	non	non	oui
51	LA biphénotypique	BCR-ABL	phénoïdentique	CSP	atténué	1	Rechute moléculaire BCR-ABL	3	CC stable	CC stable	CC stable	oui	oui	oui
59	LAL	BCR-ABL	génénoïdentique	CSP	atténué	0	Rechute moléculaire BCR-ABL	1	CM stable	CC stable	<5% stable	oui	non	oui
41	LAL secondaire à une LMC	BCR-ABL	phénoïdentique	CSP	standard	2	Rechute moléculaire BCR-ABL	3				oui	non	oui
50	SMD		génénoïdentique	CSP	atténué	0	Absence de GVH malgré l'arrêt des immunosuppresseurs	3	CC stable	CC stable	CC stable	non	non	non
45	MM		génénoïdentique	CSP	atténué	0	Chimérisme mixte et augmentation du pic	1	CC stable	CC stable	CC atteint	non	oui	non
46	MM		phénoïdentique	CSP	atténué	0	Persistance plasmocytes dystrophiques	3	CC stable	CC stable	CC stable	oui	oui	non
46	MM		génénoïdentique	CSP	atténué	0	Pic à 1,8g/L	2				non	non	non
57	LNH B		génénoïdentique	MO	atténué	0	Chimérisme mixte	3	CM stable	CM stable	CM stable	non	non	non

Tableau 26 : Caractéristiques des patients ayant bénéficié de DLI

6. Discussion

L'objectif principal de ce travail était d'étudier la place des techniques de suivi de chimérisme et le chimérisme après tri cellulaire. Il s'agissait de préciser dans quel contexte l'étude de certaines populations cellulaires est la plus pertinente, en particulier en termes de prédiction de la survenue d'une GVH ou d'une rechute. Il s'agissait également de reconsidérer le calendrier de suivi suite aux nouvelles recommandations et de valider le remplacement de l'étude des VNTR par l'étude des STR au laboratoire.

La collecte des informations a été rétrospective, avec nécessairement des biais liés à la sélection des patients. S'agissant d'une cohorte d'adulte, l'involution thymique liée à l'âge a très probablement un impact sur la reconstitution du compartiment lymphocytaire T, mais cette cohorte n'a pas été comparée avec des patients de pédiatrie pour l'objectiver. Malgré une prédominance des LAM (40%), cette cohorte est disparate en ce qui concerne l'indication à la greffe, les conditionnements proposés, la prophylaxie de la GVH instaurée et le stade de la maladie au moment de la greffe (première rémission complète, deuxième rémission complète après une première rechute, ou encore réponse partielle après plusieurs lignes de traitement). En ce qui concerne la GVHa et la GVHc, la difficulté principale consiste à grader précisément les manifestations, en particulier cutanées, lorsque leur sévérité clinique est faible. L'appréciation d'une GVHc est délicate d'autant que des stigmates de GVHa peuvent persister, ou que des manifestations iatrogènes peuvent ressembler à une GVHc. Le recueil de données a donc pâti de ces difficultés à étiqueter une GVH.

Dans notre étude, seuls deux groupes de conditionnement ont été considérés, les conditionnements standards et les conditionnements atténués. La diversité effective des conditionnements atténués a toutefois un impact sur le chimérisme. En effet, il a été montré que les CNMA peuvent conserver un CM prolongé jusqu'à 6 mois, surtout sur population lymphoïde T, ce qui est moins vrai avec les CIR (Baron and Storb, 2006; Baron *et al.*, 2004; Carvallo *et al.*, 2004; Valcárcel *et al.*, 2003). Les conditionnements sans ICT seraient également plus pourvoyeurs de CM (Thannberger, 2007). Le traitement immunomodulateur post-allogreffe a également un impact significatif sur le chimérisme, un arrêt de la ciclosporine permettant d'atteindre un CC ou de prévenir un rejet de greffe (Hoelle *et al.*, 2004).

Concernant le choix de la technique, l'étude des STR permet une quantification plus fine que l'étude des VNTR, avec une meilleure sensibilité. De plus, l'usage de 16 marqueurs par l'étude des STR permet d'augmenter l'informativité et la quantité d'ADN nécessaire est encore plus faible qu'avec l'étude des VNTR. Ce travail nous permet de valider le changement de technique opéré au laboratoire.

La PCR quantitative par chimie TaqMan® nécessite des quantités d'ADN importantes lors du bilan pré-allogreffe. Un typage pour l'ensemble des marqueurs de la technique n'est possible que si cette quantité est supérieure à 150 µg. Si la quantité d'ADN est comprise entre 50 et 150 µg, le typage est réalisé sur un nombre restreint de marqueurs, correspondant aux marqueurs les plus souvent informatifs dans l'expérience du laboratoire. En cas de quantité d'ADN inférieure à 50 µg, un typage TaqMan® n'est pas possible, et le suivi de chimérisme sera réalisé par étude des STR (Figure 22).

Ce travail nous permet de proposer une révision de l'arbre décisionnel pour le suivi de chimérisme post-allogreffe (Figure 22). Lors des suivis avec chimérisme compris entre 10 et 90% donneur, l'étude des STR est utile car elle permet de confirmer l'ordre de grandeur du résultat, qui est peu reproductible par PCR quantitative par chimie TaqMan®. En cas de chimérisme supérieur à 90% donneur, l'étude des STR n'est pas nécessaire si les résultats sont similaires aux résultats précédents, même si les quantités d'ADN sont faibles (Figure 22). En effet, la sensibilité de la PCR quantitative diminue, mais elle reste supérieure à celle de l'étude des STR et il n'y a pas de biais par rapport aux résultats obtenus avec 250 ng d'ADN. En revanche, pour les variations importantes de chimérisme par rapport aux antécédents, un contrôle par étude des STR est préférable. Ce contrôle permettra de conforter le résultat, qui devra également être confirmé sur un nouveau prélèvement, avant d'envisager une modification de prise en charge, et notamment d'immunothérapie post-allogreffe.

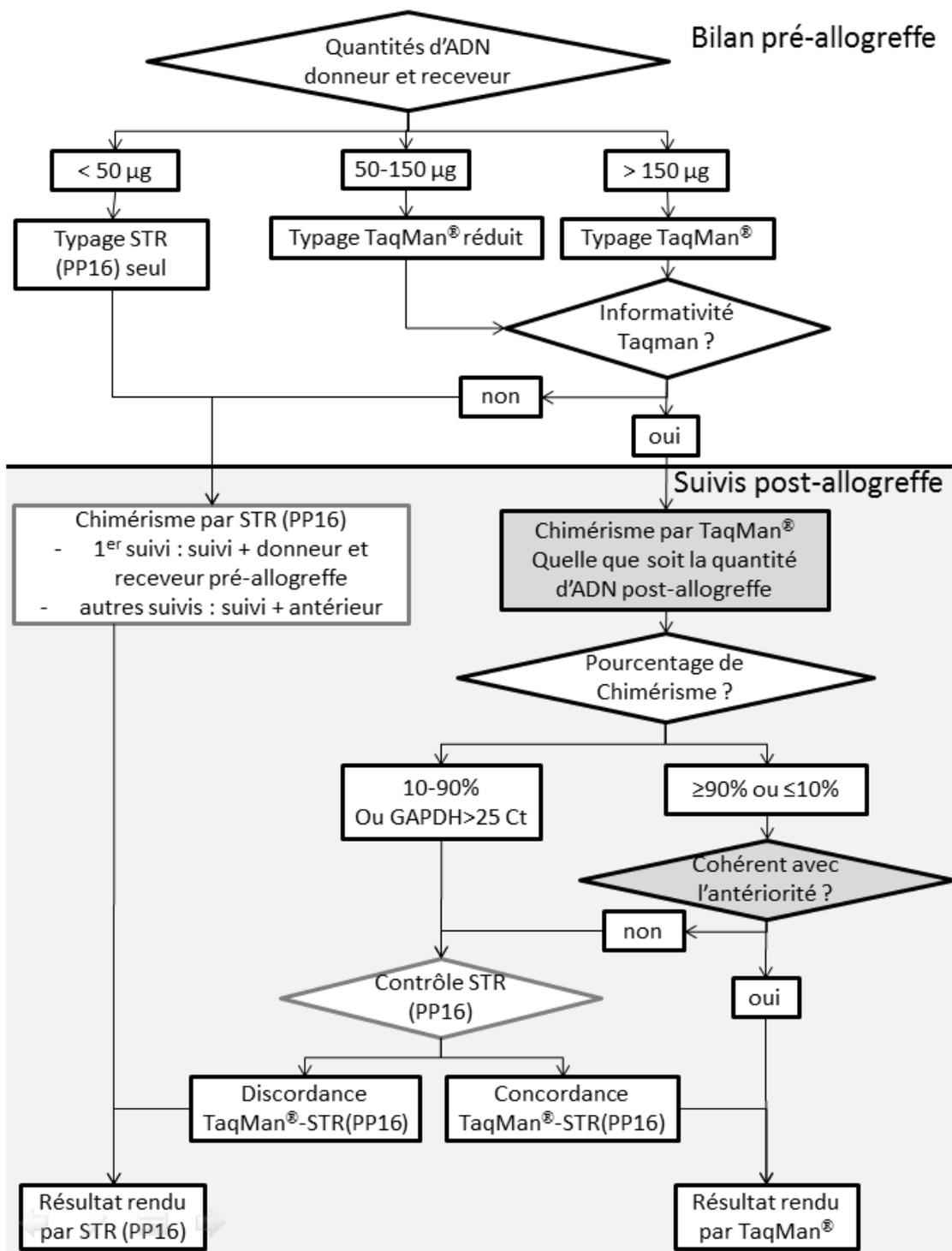


Figure 22 : Arbre décisionnel révisé de choix de technique pour le suivi de chimérisme post-allogreffe au laboratoire

Les recommandations émises par la SFGM-TC (AHPA 2016) préconisent qu'un chimérisme soit considéré comme mixte s'il est inférieur ou égal à 95% donneur. Un chimérisme entre 90 et 95% donneur nécessite une réévaluation précoce. Ce seuil à 95% donneur est adapté à l'étude des processus immunitaires tels que le rejet de greffe et la GVH, impliquant des populations hématopoïétiques significatives. Dans cette étude, ce seuil a été utilisé car il permet de comparer notre population à la littérature et d'exploiter les résultats des études des VNTR et des STR, dont les limites de détection sont plus faibles qu'en PCR quantitative. La PCR quantitative par chimie TaqMan® a une limite de détection de 0,1% ou moins, en fonction de la quantité d'ADN (Alizadeh *et al.*, 2002a; Chen *et al.*, 2011; Qin *et al.*, 2011). Le laboratoire de génétique oncologique du Centre Henri Becquerel privilégiant la PCR quantitative par chimie TaqMan®, un seuil plus élevé doit donc être fixé, dans l'optique de détecter un chimérisme mixte très résiduel ou une rechute. Il a notamment été montré qu'une quantification des faibles niveaux de chimérisme permettait une détection plus précoce d'évènements défavorables, notamment des rechutes (Qin *et al.*, 2011).

D'une manière générale, coupler le suivi de chimérisme et le suivi de maladie résiduelle constituerait une bonne stratégie pour prédire le risque de rechute (Lange *et al.*, 2011; Pérez-Simón *et al.*, 2002; Rossi *et al.*, 2013). Ainsi, en cas de décroissance du pourcentage de chimérisme, l'atelier d'harmonisation de la SFGM-TC préconise un contrôle anticipé et un suivi de maladie résiduelle par d'autres marqueurs moléculaires ou en cytométrie (AHPA 2016). Le tri sur populations ciblées a été proposé afin d'étudier plus spécifiquement certains phénomènes et d'augmenter la sensibilité pour un mécanisme donné. Cependant, son utilisation n'a pas été incluse dans les dernières recommandations, par manque de données bibliographiques.

Ainsi, sur notre cohorte, un CM à J100 sur sang total est associé aux rechutes. Cette association n'est pas retrouvée si on considère uniquement les rechutes survenues après J100, à la différence du chimérisme sur population lymphoïde T, qui est significativement diminué, même si on ne considère que les rechutes ultérieures à J100. Le chimérisme à J100 sur cette population serait donc prédictif du risque de rechutes. Un point de suivi à J60, mériterait d'être réalisé afin d'anticiper ce risque de rechutes, si ce résultat est confirmé. Un tel résultat sur population lymphoïde T a déjà été rapporté en cas de CM prolongé (Mohty *et al.*, 2007), ou précoce (Baron *et al.*, 2004; Keil *et al.*, 2003; Matthes-Martin *et al.*, 2003) et pourrait témoigner d'un défaut d'alloréactivité préalable à la rechute (Elkaim *et al.*, 2014). La population NK semble aussi particulièrement discriminante, un CM à J14 ou à J28 étant associé au rejet de greffe et à un impact négatif sur la survie globale, avec une significativité parfois supérieure au chimérisme sur population lymphoïde T (Baron *et al.*, 2004; Matthes-Martin *et al.*, 2003; Miura *et al.*, 2006). Ces CM précoces seraient ainsi liés au rôle immunitaire antitumoral des populations T et NK, et non à la réémergence des cellules tumorales, au moment de la rechute.

Pour étudier cette réémergence, la population spécifique des cellules tumorales devrait être ciblée (Zetterquist *et al.*, 2000). Ainsi, le tri sur cellules CD19+ serait utile dans les LLC, les LNH-B et les LAL-B, CD138+ dans les MM, CD3+ dans les lymphomes T et CD34+ ou CD15+ dans les LAM, comme cela a déjà été proposé (Bornhauser *et al.*, 2009; Lange *et al.*, 2011; Mattsson *et al.*, 2001b; Serrano *et al.*, 2000; Zeiser *et al.*, 2005; Zetterquist *et al.*, 2000). Dans les pathologies myéloïdes, le chimérisme sur population myéloïde à J100 est significativement diminué en cas de rechute, davantage que sur sang total ou population lymphoïde T. Il est également davantage diminué dans les pathologies myéloïdes par rapport aux pathologies non myéloïdes en rechute. Dans cette optique de prédiction des rechutes, le suivi de chimérisme se positionne comme une technique de suivi de maladie résiduelle. Pour cela, en plus d'être spécifique de la population tumorale, la sensibilité doit être excellente. Dans une étude récente sur des LAM, l'équivalence entre suivi de chimérisme et suivi de maladie résiduelle par étude de l'expression de WT1 n'a pu être démontrée, mais le suivi de chimérisme n'a pas été réalisé sur la population spécifique de l'hémopathie (Duléry *et al.*, 2017). Au contraire, d'autres études montrent que le chimérisme sur cellules CD34+ dans les LAM serait prédictif de la rechute avec une sensibilité et une spécificité comparables à l'expression de WT1 (Kwon *et al.*, 2012; Lange *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2013). Un tel suivi de chimérisme sur cellules CD34+, par une technique suffisamment sensible, serait particulièrement utile en absence de marqueur moléculaire disponible permettant un suivi de maladie résiduelle, comme c'est le cas dans certaines LAM et dans la LLC.

Cependant, le chimérisme étant un phénomène multifactoriel, même sur population spécifique de l'hémopathie, un CM peut être transitoire ou stable sur le long terme, sans rechute. Pour faciliter l'interprétation et détecter les facteurs confondants, un suivi ciblé sur la population tumorale doit être couplé à une autre population et au sang total, afin de différencier des mécanismes immunitaires et des mécanismes tumoraux. L'étude de la population lymphoïde T est la plus pertinente pour étudier les phénomènes immunitaires, à l'exception du suivi de chimérisme dans le cadre d'hémopathies lymphoïdes T allogreffées, où l'étude de la population NK pourrait être une alternative. D'une manière générale, nos résultats montrent que le chimérisme sur population lymphoïde T est plus volontiers mixte que sur sang total et sur population myéloïde. En cas de CM sur population lymphoïde T, la présence concomitante de cellules du donneur et du receveur limiterait l'alloréactivité et donc la GVHa (Baron *et al.*, 2004; Childs *et al.*, 1999; McSweeney *et al.*, 2001; Mohty *et al.*, 2007; Stikvoort *et al.*, 2013). L'association CC et GVHa est ainsi retrouvée aussi bien à J30 et à J100, sur sang total, mais surtout sur population lymphoïde T, avec une différence en pourcentages plus importante. En ce qui concerne la GVHc, elle est associée à un CC sur population lymphoïde T à J30, mais uniquement dans les pathologies myéloïdes. Ce CC interviendrait très en amont par rapport aux manifestations de GVHc, et pourrait être le signe d'une reconstitution précoce du répertoire T, qui se maintiendrait au long cours et provoquerait des réactions de GVH durables. D'autres études ont montré une association entre CC à J30

sur population lymphoïde T et survenue d'une GVHc (Rupa-Matysek *et al.*, 2011). Un CC sur population lymphoïde T semblerait également associé aux greffons issus de CSP dans les aplasies médullaires à J30 et à J100. La richesse en cellules CD3+ a également un impact sur le chimérisme, parmi les greffons issus de CSP, un prélèvement riche en cellules CD3+ étant encore davantage associé à un CC, sur sang total et sur population lymphoïde T. Il est à noter qu'un chimérisme sur population lymphoïde T ne doit pas être interprété si du SAL a été administré au patient. Les lymphocytes T circulants sont en effets détruits dans une telle circonstance.

Les patients ayant bénéficié d'un conditionnement standard présentent un chimérisme presque systématiquement complet sur sang total dès J30. Le tri cellulaire n'est actuellement pas réalisé actuellement chez ces patients. Cependant, il apparait que sur la vingtaine de tris cellulaires de notre cohorte, la moitié présentait un CM sur population lymphoïde T à J30 et un quart à J100. Ce CM ne semble associé à aucun évènement particulier, mais mériterait une étude plus poussée, afin d'éclaircir son mécanisme et son intérêt potentiel. Un tri cellulaire sur population lymphoïde T pourrait donc être envisagé chez ces patients. L'étude du chimérisme sur population spécifique des cellules tumorales, est également pertinente quel que soit le conditionnement, et en particulier, si aucun marqueur moléculaire n'est disponible pour le suivi de maladie résiduelle.

La majorité des patients ont été suivis à J30 et à J100 d'après le calendrier fixé au Centre Henri Becquerel, puis à J180 et à J360. Ainsi, le point intermédiaire à J60 n'a pas été systématique puisque non préconisé. Un suivi à J60 est cependant de plus en plus souvent réalisé, ce qui est en adéquation avec l'AHPA 2016 de la SFGM-TC. Nous proposons donc de systématiser ce suivi. Un point intermédiaire entre J30 et J100 pourrait en effet donner des indications sur la cinétique du suivi de chimérisme, si le chimérisme n'est pas complet à J30. En effet, au-delà des valeurs absolues, la cinétique d'évolution du chimérisme est un paramètre primordial à l'interprétation (Rupa-Matysek *et al.*, 2011). Ce point fournirait également des indications importantes sur les phénomènes précoces, qui surviennent juste après la greffe. Un CC précoce est, par exemple, associé à la richesse en cellules CD34+ du greffon, qui pourrait avoir un rôle important dans la reconstitution hématopoïétique, même si le chimérisme n'est pas le meilleur reflet d'une telle reconstitution (Carvallo *et al.*, 2004; Elkaim, 2014). Un point de suivi supplémentaire fournirait aussi des données intéressantes sur l'obtention retardée d'un CC sur population myéloïde en cas de conditionnement atténué ou en cas de donneur génoidentique. De plus, les pathologies allogreffées à l'heure actuelle sont majoritairement des hémopathies à croissance tumorale rapide, notamment des LA, alors que dans le passé, des pathologies d'évolution plus lente étaient greffées telle que la LMC. Un suivi plus rapproché, serait indiqué, afin d'assurer une détection précoce des rechutes, celles-ci survenant plus brutalement (Bader *et al.*, 2004). A cela s'ajoute l'importance de la cinétique du suivi de chimérisme, un point supplémentaire à J60 permettrait alors de

suppléer aux échecs de suivi à J30 pour quantités d'ADN trop faibles. Toutefois, ces échecs, liés à l'aplasie post-allogreffe, sont devenus rares avec l'amélioration des techniques d'extraction.

Dans cette étude, trop peu de greffes haploidentiques ont été réalisées pour en tirer des conclusions (n=6 dont une aplasie et un conditionnement standard). A l'avenir, ce type de greffe devrait se développer et les modalités de suivi de chimérisme sont par conséquent à affiner dans cette indication, avec une place du tri cellulaire à préciser.

L'essor actuel de techniques de séquençage de nouvelle génération pose la question de leur positionnement dans le suivi de chimérisme. Le NGS pourrait ainsi être une alternative aux techniques actuelles d'étude des STR. En effet, la limite de détection de ces deux techniques est similaire mais la quantification par étude des STR est potentiellement limitée par les artefacts techniques. Elle présente cependant l'avantage d'utiliser des kits commerciaux standardisés. Les techniques de NGS présentent également des limites, en termes de délais de rendus des résultats, de coût et d'estimation de la fréquence allélique. Cette dernière est parfois mal estimée pour certaines régions, du fait d'un déséquilibre d'amplification entre le brin sens et antisens, ou d'une séquence en nucléotides ne permettant pas une amplification optimale. L'usage du NGS ne sera donc possible qu'après optimisation des panels et des *pipelines* bio-informatiques, mais surtout si les délais de rendus deviennent compatibles avec le suivi de chimérisme.

La PCR digitale, technique de PCR allèle-spécifique également émergente, pourrait être une alternative à la PCR quantitative par chimie TaqMan® compte tenu de sa bonne sensibilité (George *et al.*, 2013). Elle présente l'avantage d'utiliser de faibles quantités d'ADN par rapport à la chimie TaqMan®, pour une quantification absolue ne nécessitant ni courbe de calibration, ni réplicats. Elle offre également la possibilité d'un multiplexage simple à mettre en œuvre. A l'avenir, cette technique pourrait permettre le développement du suivi de chimérisme comme technique de suivi de maladie résiduelle, si une limite de détection à 10^{-4} voire 10^{-5} est atteinte. La limite de détection de cette technique dépend cependant du bruit de fond, qui peut être variable d'un allèle à un autre.

Conclusion

En conclusion, ce travail a permis de valider le remplacement de l'étude des VNTR par l'étude des STR et de revoir ses indications. Il doit notamment permettre de limiter les contrôles réalisés, lorsque le pourcentage de chimérisme par PCR quantitative est supérieur à 90% donneur. Il en résulte un gain de réactifs et de temps technique pour le laboratoire.

D'un point de vue médico-économique, un typage pré-allogreffe est codé dans les RIHN comme l'acte G225 et correspond à un BHN 1700. L'étude du chimérisme sur sang total correspond à l'acte G179, coté BHN 500 et l'étude sur cellules triées correspond à l'acte G180, coté BHN 700. L'étude sur populations triées doit donc être limitée aux types cellulaires d'intérêt. Un suivi de chimérisme réalisé sur sang total et sur deux populations triées est raisonnable. En effet, un chimérisme sur sang total seul est difficile à interpréter mais reste utile, car il permet d'avoir une vision d'ensemble du chimérisme. L'utilisation du tri cellulaire permet d'étudier avec plus de spécificité certains paramètres, sans qu'aucune population ne soit spécifique d'un seul mécanisme. Ainsi, les populations lymphoïdes T et NK sont plus spécifiques des réactions immunitaires, telles que la GVH, mais elles sont également impactées par les rejets de greffe et les rechutes. *A contrario*, l'étude spécifique de la population tumorale permettrait d'être plus sensible aux rechutes.

Ce travail permet également de proposer de nouvelles modalités de suivi du chimérisme au Centre Henri Becquerel, fixé à J30, **J60**, J100, 6 mois et 1 an de l'allogreffe minimum, en accord avec l'AHPA 2016 de la SFGM-TC. Nous proposons de réaliser **un tri, quel que soit le conditionnement et le type de greffe, même haploidentique :**

- **sur population lymphoïde T** (ou NK si hémopathie lymphoïde T)
- **sur population spécifique de l'hémopathie** (tri CD33 et CD66b, CD34, CD19, CD138, CD3...)

Dans les aplasies médullaires, nous proposons de maintenir un tri :

- sur population lymphoïde T, pour les mêmes raisons que dans les hémopathies malignes
- sur population myéloïde, correspondant à la population hématopoïétique majoritaire

Enfin, après DLI, le rythme varie, un chimérisme trié doit précéder la première injection de DLI, et le chimérisme est ensuite réalisé régulièrement, au minimum à J30 post-injection, afin de suivre l'efficacité des DLI.

Références bibliographiques

Alizadeh, M., Bernard, M., Danic, B., Dauriac, C., Birebent, B., Lapart, C., Lamy, T., Le Prisé, P.-Y., Beauplet, A., Bories, D., *et al.* (2002a). Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood*, 99, 4618–4625.

Alizadeh, M., Bernard, M., Danic, B., Dauriac, C., Birebent, B., Lapart, C., Lamy, T., Le Prisé, P.-Y., Beauplet, A., Bories, D., *et al.* (2002b). Quantitative assessment of hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood*, 99, 4618–4625.

Aloisio, M., Licastro, D., Caenazzo, L., Torboli, V., D'Eustacchio, A., Severini, G.M., and Athanasakis, E. (2016). A technical application of quantitative next generation sequencing for chimerism evaluation. *Mol. Med. Rep.*, 14, 2967–2974.

Aloisio, M., Bortot, B., Gandin, I., Severini, G.M., and Athanasakis, E. (2017). A semi-nested real-time PCR method to detect low chimerism percentage in small quantity of hematopoietic stem cell transplant DNA samples. *Genome*, 60, 183–192.

Antin, J.H., Childs, R., Filipovich, A.H., Giral, S., Mackinnon, S., Spitzer, T., and Weisdorf, D. (2001). Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 7, 473–485.

Aoudjhane, M., Labopin, M., Gorin, N.C., Shimoni, A., Ruutu, T., Kolb, H.-J., Frassoni, F., Boiron, J.M., Yin, J.L., Finke, J., *et al.* (2005). Comparative outcome of reduced intensity and myeloablative conditioning regimen in HLA identical sibling allogeneic haematopoietic stem cell transplantation for patients older than 50 years of age with acute myeloblastic leukaemia: a retrospective survey from the Acute Leukemia Working Party (ALWP) of the European group for Blood and Marrow Transplantation (EBMT). *Leukemia*, 19, 2304–2312.

Bader, P., Hölle, W., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Niethammer, D., and Beck, J. (1996). Quantitative assessment of mixed hematopoietic chimerism by polymerase chain reaction after allogeneic BMT. *Anticancer Res.*, 16, 1759–1763.

Bader, P., Beck, J., Frey, A., Schlegel, P.G., Hebarth, H., Handgretinger, R., Einsele, H., Niemeyer, C., Benda, N., Faul, C., *et al.* (1998). Serial and quantitative analysis of mixed hematopoietic chimerism by PCR in patients with acute leukemias allows the prediction of relapse after allogeneic BMT. *Bone Marrow Transplant.*, 21, 487–495.

Bader, P., Stoll, K., Huber, S., Geiselhart, A., Handgretinger, R., Niemeyer, C., Einsele, H., Schlegel, P.G., Niethammer, D., Beck, J., *et al.* (2000). Characterization of lineage-specific chimerism in patients with acute leukaemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation before and after relapse. *Br. J. Haematol.*, 108, 761–768.

Bader, P., Kreyenberg, H., Hoelle, W., Dueckers, G., Handgretinger, R., Lang, P., Kremens, B., Dilloo, D., Sykora, K.-W., Schrappe, M., *et al.* (2004). Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem-cell transplantation: possible role for pre-emptive immunotherapy? *J. Clin. Oncol. Off.*, 22, 1696–1705.

- Bader, P., Niethammer, D., Willasch, A., Kreyenberg, H., and Klingebiel, T. (2005). How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant.*, 35, 107–119.
- Barker, J.N., Weisdorf, D.J., DeFor, T.E., Blazar, B.R., McGlave, P.B., Miller, J.S., Verfaillie, C.M., and Wagner, J.E. (2005). Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood*, 105, 1343–1347.
- Baron, F., and Sandmaier, B.M. (2006). Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Leukemia*, 20, 1690–1700.
- Baron, F., and Storb, R. (2006). Allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning as treatment for hematologic malignancies and inherited blood disorders. *Mol. Ther.*, 13, 26–41.
- Baron, F., Baker, J.E., Storb, R., Gooley, T.A., Sandmaier, B.M., Maris, M.B., Maloney, D.G., Heimfeld, S., Oparin, D., Zellmer, E., *et al.* (2004). Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood*, 104, 2254–2262.
- Barrios, M., Jiménez-Velasco, A., Román-Gómez, J., Madrigal, M.E., Castillejo, J.A., Torres, A., and Heiniger, A. (2003). Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Haematologica*, 88, 801–810.
- Beckerich, F. Analyse du suivi de la maladie résiduelle chez les patients suivis pour leucémie aiguë au troisième mois de l'allogreffe: une étude lyonnaise de 212 cas. Th D Med, Lyon 1, 2013.
- Bethge, W.A., Hegenbart, U., Stuart, M.J., Storer, B.E., Maris, M.B., Flowers, M.E.D., Maloney, D.G., Chauncey, T., Bruno, B., Agura, E., *et al.* (2004). Adoptive immunotherapy with donor lymphocyte infusions after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Blood*, 103, 790–795.
- Blazar, B.R., Orr, H.T., Arthur, D.C., Kersey, J.H., and Filipovich, A.H. (1985). Restriction fragment length polymorphisms as markers of engraftment in allogeneic marrow transplantation. *Blood*, 66, 1436–1444.
- Bleakley, M., and Riddell, S.R. (2004). Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat. Rev. Cancer*, 4, 371–380.
- Blum, W., Brown, R., Lin, H.S., Zehnbauser, B., Khoury, H., Goodnough, L.T., Westervelt, P., Vij, R., DiPersio, J., and Adkins, D. (2002). Low-dose (550 cGy), single-exposure total body irradiation and cyclophosphamide: consistent, durable engraftment of related-donor peripheral blood stem cells with low treatment-related mortality and fatal organ toxicity. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 8, 608–618.
- Bornhauser, M., Oelschlaegel, U., Platzbecker, U., Bug, G., Lutterbeck, K., Kiehl, M.G., Schetelig, J., Kiani, A., Illmer, T., Schaich, M., *et al.* (2009). Monitoring of donor chimerism in sorted CD34+ peripheral blood cells allows the sensitive detection of imminent relapse after allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*, 94, 1613–1617.
- Bretagne, S., Vidaud, M., Kuentz, M., Cordonnier, C., Henni, T., Vinci, G., Goossens, M., and Vernant, J.P. (1987). Mixed blood chimerism in T cell-depleted bone marrow transplant recipients: evaluation using DNA polymorphisms. *Blood*, 70, 1692–1695.
- van der Burg, M., Kreyenberg, H., Willasch, A., Barendregt, B.H., Preuner, S., Watzinger, F., Lion, T., Roosnek, E., Harvey, J., Alcoceba, M., *et al.* (2011). Standardization of DNA isolation from low cell numbers for chimerism analysis by PCR of short tandem repeats. *Leukemia*, 25, 1467–1470.

Carvallo, C., Geller, N., Kurlander, R., Srinivasan, R., Mena, O., Igarashi, T., Griffith, L.M., Linehan, W.M., and Childs, R.W. (2004). Prior chemotherapy and allograft CD34+ dose impact donor engraftment following nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation in patients with solid tumors. *Blood*, 103, 1560–1563.

Casarino, L., Carbone, C., Capucci, M.A., Izzi, T., and Ferrara, G.B. (1992). Analysis of chimerism after bone marrow transplantation using specific oligonucleotide probes. *Bone Marrow Transplant.*, 10, 165–170.

Chen, D.-P., Tseng, C.-P., Wang, W.-T., Wang, M.-C., Tsai, S.-H., and Sun, C.-F. (2011). Real-time biallelic polymorphism-polymerase chain reaction for chimerism monitoring of hematopoietic stem cell transplantation relapsed patients. *Clin. Chim. Acta*, 412, 625–630.

Chen, H., Liu, K., Xu, L., Liu, D., Chen, Y., Zhao, X., Han, W., Zhang, X., Wang, Y., Zhang, Y., *et al.* (2012). Administration of imatinib after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation may improve disease-free survival for patients with Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *J. Hematol. Oncol.*, 5, 29.

Childs, R., Clave, E., Contentin, N., Jayasekera, D., Hensel, N., Leitman, S., Read, E.J., Carter, C., Bahceci, E., Young, N.S., *et al.* (1999). Engraftment kinetics after nonmyeloablative allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: full donor T-cell chimerism precedes alloimmune responses. *Blood*, 94, 3234–3241.

Choi, S.J., Lee, K.H., Lee, J.H., Kim, S., Chung, H.J., Lee, J.S., Kim, S.H., Park, C.J., Chi, H.S., and Kim, W.K. (2000a). Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant.*, 26, 327–332.

Choi, S.J., Lee, K.H., Lee, J.H., Kim, S., Chung, H.J., Lee, J.S., Kim, S.H., Park, C.J., Chi, H.S., and Kim, W.K. (2000b). Prognostic value of hematopoietic chimerism in patients with acute leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant.*, 26, 327–332.

Clift, R.A., Buckner, C.D., Thomas, E.D., Bryant, E., Anasetti, C., Bensinger, W.I., Bowden, R., Deeg, H.J., Doney, K.C., and Fisher, L.D. (1994). Marrow transplantation for patients in accelerated phase of chronic myeloid leukemia. *Blood*, 84, 4368–4373.

Cutler, C., Stevenson, K., Kim, H.T., Brown, J., McDonough, S., Herrera, M., Reynolds, C., Liney, D., Kao, G., Ho, V., *et al.* (2011). Double umbilical cord blood transplantation with reduced intensity conditioning and sirolimus-based GVHD prophylaxis. *Bone Marrow Transplant.*, 46, 659–667.

Dausset, J., Colombani, J., Legrand, L., Feingold, N., and Rapaport, F. (1970). Genetic and biological aspects of the HL-A system of human histocompatibility. *Blood*, 35, 591–612.

Duléry, R., Nibourel, O., Gauthier, J., Elsermans, V., Behal, H., Coiteux, V., Magro, L., Renneville, A., Marceau, A., Boyer, T., *et al.* (2017). Impact of Wilms' tumor 1 expression on outcome of patients undergoing allogeneic stem cell transplantation for AML. *Bone Marrow Transplant.*, 52, 539–543.

Durnam, D.M., Anders, K.R., Fisher, L., O'Quigley, J., Bryant, E.M., and Thomas, E.D. (1989). Analysis of the origin of marrow cells in bone marrow transplant recipients using a Y-chromosome-specific in situ hybridization assay. *Blood*, 74, 2220–2226.

Elkaim, E. Facteurs prédictifs du chimérisme après greffe non apparentée de cellules souches de sang placentaire chez l'enfant. Th D Med, Aix-Marseille, 2014.

Elkaim, E., Picard, C., Galambrun, C., Barlogis, V., Loundou, A., Curtillet, C., Oudin, C., Thuret, I., Chambost, H., and Michel, G. (2014). Peripheral blood cells chimerism after unrelated cord blood

transplantation in children: kinetics, predictive factors and impact on post-transplant outcome. *Br. J. Haematol.* 166, 557–565.

Ferrara, J.L.M., and Reddy, P. (2006). Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin. Hematol.*, 43, 3–10.

Gardiner, N., Lawler, M., O’Riordan, J., DeArce, M., Humphries, P., and McCann, S.R. (1997). Persistent donor chimaerism is consistent with disease-free survival following BMT for chronic myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplant.*, 20, 235–241.

George, D., Czech, J., John, B., Yu, M., and Jennings, L.J. (2013). Detection and quantification of chimerism by droplet digital PCR. *Chimerism*, 4, 102–108.

Gineikiene, E., Stoskus, M., and Griskevicius, L. (2009). Single nucleotide polymorphism-based system improves the applicability of quantitative PCR for chimerism monitoring. *J. Mol. Diagn.*, 11, 66–74.

Ginsburg, D., Antin, J.H., Smith, B.R., Orkin, S.H., and Rapoport, J.M. (1985). Origin of cell populations after bone marrow transplantation. Analysis using DNA sequence polymorphisms. *J. Clin. Invest.*, 75, 596–603.

Girgis, M., Hallemeier, C., Blum, W., Brown, R., Lin, H.-S., Khoury, H., Goodnough, L.T., Vij, R., Devine, S., Wehde, M., *et al.* (2005). Chimerism and clinical outcomes of 110 recipients of unrelated donor bone marrow transplants who underwent conditioning with low-dose, single-exposure total body irradiation and cyclophosphamide. *Blood*, 105, 3035–3041.

Guimond, M., Busque, L., Baron, C., Bonny, Y., Bélanger, R., Mattioli, J., Perreault, C., and Roy, D.C. (2000). Relapse after bone marrow transplantation: evidence for distinct immunological mechanisms between adult and paediatric populations. *Br. J. Haematol.*, 109, 130–137.

Hegenbart, U., Niederwieser, D., Sandmaier, B.M., Maris, M.B., Shizuru, J.A., Greinix, H., Cordonnier, C., Rio, B., Gratwohl, A., Lange, T., *et al.* (2006). Treatment for acute myelogenous leukemia by low-dose, total-body, irradiation-based conditioning and hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors. *J. Clin. Oncol. Off.*, 24, 444–453.

Hill, R.S., Petersen, F.B., Storb, R., Appelbaum, F.R., Doney, K., Dahlberg, S., Ramberg, R., and Thomas, E.D. (1986). Mixed hematologic chimerism after allogeneic marrow transplantation for severe aplastic anemia is associated with a higher risk of graft rejection and a lessened incidence of acute graft-versus-host disease. *Blood*, 67, 811–816.

Hoelle, W., Beck, J.F., Dueckers, G., Kreyenberg, H., Lang, P., Gruhn, B., Führer, M., Niethammer, D., Klingebiel, T., and Bader, P. (2004). Clinical relevance of serial quantitative analysis of hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation in children for severe aplastic anemia. *Bone Marrow Transplant.*, 33, 219–223.

Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sondel, P.M., Goldman, J.M., Kersey, J., Kolb, H.J., Rimm, A.A., Ringdén, O., Rozman, C., and Speck, B. (1990). Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, 75, 555–562.

Huss, R., Deeg, H.J., Gooley, T., Bryant, E., Leisenring, W., Clift, R., Buckner, C.D., Martin, P., Storb, R., and Appelbaum, F.R. (1996). Effect of mixed chimerism on graft-versus-host disease, disease recurrence and survival after HLA-identical marrow transplantation for aplastic anemia or chronic myelogenous leukemia. *Bone Marrow Transplant.*, 18, 767–776.

Jeffreys, A.J., Wilson, V., and Thein, S.L. (1985). Individual-specific “fingerprints” of human DNA. *Nature*, 316, 76–79.

- Jiménez-Velasco, A., Barrios, M., Román-Gómez, J., Navarro, G., Buño, I., Castillejo, J.A., Rodríguez, A.I., García-Gemar, G., Torres, A., and Heiniger, A.I. (2005). Reliable quantification of hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation for acute leukemia using amplification by real-time PCR of null alleles and insertion/deletion polymorphisms. *Leukemia*, 19, 336–343.
- Keil, F., Prinz, E., Moser, K., Mannhalter, C., Kalhs, P., Worel, N., Rabitsch, W., Schulenburg, A., Mitterbauer, M., and Greinix, H. (2003). Rapid establishment of long-term culture-initiating cells of donor origin after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation, and significant prognostic impact of donor T-cell chimerism on stable engraftment and progression-free survival. *Transplantation*, 76, 230–236.
- Khan, F., Agarwal, A., and Agrawal, S. (2004). Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplant.*, 34, 1–12.
- Knowlton, R.G., Brown, V.A., Braman, J.C., Barker, D., Schumm, J.W., Murray, C., Takvorian, T., Ritz, J., and Donis-Keller, H. (1986). Use of highly polymorphic DNA probes for genotypic analysis following bone marrow transplantation. *Blood*, 68, 378–385.
- Kögler, G., Wolf, H.H., Heyll, A., Arkesteijn, G., and Wernet, P. (1995). Detection of mixed chimerism and leukemic relapse after allogeneic bone marrow transplantation in subpopulations of leucocytes by fluorescent in situ hybridization in combination with the simultaneous immunophenotypic analysis of interphase cells. *Bone Marrow Transplant.*, 15, 41–48.
- Kolb, H.J. (1998). Donor leukocyte transfusions for treatment of leukemic relapse after bone marrow transplantation. EBMT Immunology and Chronic Leukemia Working Parties. *Vox Sang.*, 74 Suppl 2, 321–329.
- Kolb, H.J., Schattenberg, A., Goldman, J.M., Hertenstein, B., Jacobsen, N., Arcese, W., Ljungman, P., Ferrant, A., Verdonck, L., Niederwieser, D., *et al.* (1995). Graft-versus-leukemia effect of donor lymphocyte transfusions in marrow grafted patients. *Blood*, 86, 2041–2050.
- Korngold, R., and Sprent, J. (1978). Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow. *J. Exp. Med.*, 148, 1687–1698.
- Kröger, N., Shimoni, A., Zabelina, T., Schieder, H., Panse, J., Ayuk, F., Wolschke, C., Renges, H., Dahlke, J., Atanackovic, D., *et al.* (2006). Reduced-toxicity conditioning with treosulfan, fludarabine and ATG as preparative regimen for allogeneic stem cell transplantation (alloSCT) in elderly patients with secondary acute myeloid leukemia (sAML) or myelodysplastic syndrome (MDS). *Bone Marrow Transplant.*, 37, 339–344.
- Kwon, M., Martínez-Laperche, C., Infante, M., Carretero, F., Balsalobre, P., Serrano, D., Gayoso, J., Pérez-Corral, A., Anguita, J., Díez-Martín, J.L., *et al.* (2012). Evaluation of minimal residual disease by real-time quantitative PCR of Wilms' tumor 1 expression in patients with acute myelogenous leukemia after allogeneic stem cell transplantation: correlation with flow cytometry and chimerism. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 18, 1235–1242.
- Lange, T., Hubmann, M., Burkhardt, R., Franke, G.-N., Cross, M., Scholz, M., Leiblein, S., Al-Ali, H.K., Edelmann, J., Thiery, J., *et al.* (2011). Monitoring of WT1 expression in PB and CD34(+) donor chimerism of BM predicts early relapse in AML and MDS patients after hematopoietic cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Leukemia*, 25, 498–505.

Lawler, M., Humphries, P., and McCann, S.R. (1991). Evaluation of mixed chimerism by in vitro amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction. *Blood*, 77, 2504–2514.

van Leeuwen, J.E., van Tol, M.J., Bodzinga, B.G., Wijnen, J.T., van der Keur, M., Joosten, A.M., Tanke, H.J., Vossen, J.M., and Khan, P.M. (1991). Detection of mixed chimaerism in flow-sorted cell subpopulations by PCR-amplified VNTR markers after allogeneic bone marrow transplantation. *Br. J. Haematol.*, 79, 218–225.

van Leeuwen, J.E., van Tol, M.J., Joosten, A.M., Wijnen, J.T., Verweij, P.J., Khan, P.M., and Vossen, J.M. (1994). Persistence of host-type hematopoiesis after allogeneic bone marrow transplantation for leukemia is significantly related to the recipient's age and/or the conditioning regimen, but it is not associated with an increased risk of relapse. *Blood*, 83, 3059–3067.

de Lima, M., Giralt, S., Thall, P.F., de Padua Silva, L., Jones, R.B., Komanduri, K., Braun, T.M., Nguyen, H.Q., Champlin, R., and Garcia-Manero, G. (2010). Maintenance therapy with low-dose azacitidine after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for recurrent acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome: a dose and schedule finding study. *Cancer*, 116, 5420–5431.

Lion, T. (2003). Summary: reports on quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection. *Leukemia*, 17, 252–254.

Lion, T., Daxberger, H., Dubovsky, J., Filipcik, P., Fritsch, G., Printz, D., Peters, C., Matthes-Martin, S., Lawitschka, A., and Gadner, H. (2001). Analysis of chimerism within specific leukocyte subsets for detection of residual or recurrent leukemia in pediatric patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*, 15, 307–310.

Lion, T., Watzinger, F., Preuner, S., Kreyenberg, H., Tilanus, M., de Weger, R., van Loon, J., de Vries, L., Cavé, H., Acquaviva, C., *et al.* (2012). The EuroChimerism concept for a standardized approach to chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*, 26, 1821–1828.

Lucarelli, G., Andreani, M., and Angelucci, E. (2002). The cure of thalassemia by bone marrow transplantation. *Blood Rev.*, 16, 81–85.

Maas, F., Schaap, N., Kolen, S., Zoetbrood, A., Buño, I., Dolstra, H., de Witte, T., Schattenberg, A., and van de Wiel-van Kemenade, E. (2003). Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms. *Leukemia*, 17, 621–629.

Mackinnon, S., Barnett, L., Bourhis, J.H., Black, P., Heller, G., and O'Reilly, R.J. (1992). Myeloid and lymphoid chimerism after T-cell-depleted bone marrow transplantation: evaluation of conditioning regimens using the polymerase chain reaction to amplify human minisatellite regions of genomic DNA. *Blood*, 80, 3235–3241.

Mackinnon, S., Papadopoulos, E.B., Carabasi, M.H., Reich, L., Collins, N.H., Boulad, F., Castro-Malaspina, H., Childs, B.H., Gillio, A.P., and Kernan, N.A. (1995). Adoptive immunotherapy evaluating escalating doses of donor leukocytes for relapse of chronic myeloid leukemia after bone marrow transplantation: separation of graft-versus-leukemia responses from graft-versus-host disease. *Blood*, 86, 1261–1268.

Mangioni, S., Balduzzi, A., Rivolta, A., Rovelli, A., Nesi, F., Rossi, V., Busca, A., Uderzo, C., Miniero, R., and Biondi, A. (1997). Long-term persistence of hemopoietic chimerism following sex-mismatched bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 20, 969–973.

Matthes-Martin, S., Lion, T., Haas, O.A., Frommlet, F., Daxberger, H., König, M., Printz, D., Scharner, D., Eichstill, C., Peters, C., *et al.* (2003). Lineage-specific chimaerism after stem cell transplantation in

children following reduced intensity conditioning: potential predictive value of NK cell chimaerism for late graft rejection. *Leukemia*, 17, 1934–1942.

Mattsson, J., Uzunel, M., Remberger, M., and Ringdén, O. (2001a). T cell mixed chimerism is significantly correlated to a decreased risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation*, 71, 433–439.

Mattsson, J., Uzunel, M., Tammik, L., Aschan, J., and Ringdén, O. (2001b). Leukemia lineage-specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*, 15, 1976–1985.

Maury, S., Lemoine, F.M., Hicheri, Y., Rosenzweig, M., Badoual, C., Cheraï, M., Beaumont, J.-L., Azar, N., Dhedin, N., Sirvent, A., *et al.* (2010). CD4+CD25+ regulatory T cell depletion improves the graft-versus-tumor effect of donor lymphocytes after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Sci. Transl. Med.*, 2, 41ra52.

McSweeney, P.A., Niederwieser, D., Shizuru, J.A., Sandmaier, B.M., Molina, A.J., Maloney, D.G., Chauncey, T.R., Gooley, T.A., Hegenbart, U., Nash, R.A., *et al.* (2001). Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood*, 97, 3390–3400.

Michallet, M. (2011). Allogreffes de cellules souches hématopoïétiques. *Transfus. Clin. Biol.*, 18, 235–245.

Min, G.L., Hibbin, J., Arthur, C., Apperley, J., Jeffreys, A., and Goldman, J. (1988). Use of minisatellite DNA probes for recognition and characterization of relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Br. J. Haematol.* 68, 195–201.

Miura, Y., Tanaka, J., Toubai, T., Tsutsumi, Y., Kato, N., Hirate, D., Kaji, M., Sugita, J., Shigematsu, A., Iwao, N., *et al.* (2006). Analysis of donor-type chimerism in lineage-specific cell populations after allogeneic myeloablative and non-myeloablative stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 37, 837–843.

Mohty, M., Avinens, O., Faucher, C., Viens, P., Blaise, D., and Eliaou, J. (2007b). Predictive factors and impact of full donor T-cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica*, 92, 1004–1006.

Mollet, I., Giannoli, C., Rigal, D., Michallet, M., and Dubois, V. (2012). Suivi de chimérisme des populations cellulaires myéloïdes chez des patients allogreffés atteints de leucémie aiguë myéloïde : étude lyonnaise. *Pathol. Biol.*, 60, 106–111.

Monaco, A.P. (2003). Chimerism in organ transplantation: conflicting experiments and clinical observations. *Transplantation*, 75, 13S–16S.

Nikolousis, E., Robinson, S., Nagra, S., Brookes, C., Kinsella, F., Tauro, S., Jeffries, S., Griffiths, M., Mahendra, P., Cook, M., *et al.* (2013). Post-transplant T cell chimerism predicts graft versus host disease but not disease relapse in patients undergoing an alemtuzumab based reduced intensity conditioned allogeneic transplant. *Leuk. Res.*, 37, 561–565.

Odriozola, A., Riancho, J.A., Colorado, M., and Zarrabeitia, M.T. (2013). Evaluation of the sensitivity of two recently developed STR multiplexes for the analysis of chimerism after haematopoietic stem cell transplantation. *Int. J. Immunogenet.*, 40, 88–92.

Offit, K., Burns, J.P., Cunningham, I., Jhanwar, S.C., Black, P., Kernan, N.A., O'Reilly, R.J., and Chaganti, R.S. (1990). Cytogenetic analysis of chimerism and leukemia relapse in chronic myelogenous leukemia patients after T cell-depleted bone marrow transplantation. *Blood*, 75, 1346–1355.

Panse, J.P., Heimfeld, S., Guthrie, K.A., Maris, M.B., Maloney, D.G., Baril, B.B., Little, M.-T., Chauncey, T.R., Storer, B.E., Storb, R., *et al.* (2005). Allogeneic peripheral blood stem cell graft composition affects early T-cell chimaerism and later clinical outcomes after non-myeloablative conditioning. *Br. J. Haematol.*, 128, 659–667.

Pérez-Simón, J.A., Caballero, D., Diez-Campelo, M., Lopez-Pérez, R., Mateos, G., Cañizo, C., Vazquez, L., Vidriales, B., Mateos, M.V., Gonzalez, M., *et al.* (2002). Chimerism and minimal residual disease monitoring after reduced intensity conditioning (RIC) allogeneic transplantation. *Leukemia*, 16, 1423–1431.

Petz, L.D., Yam, P., Wallace, R.B., Stock, A.D., de Lange, G., Knowlton, R.G., Brown, V.A., Donis-Keller, H., Hill, L.R., and Forman, S.J. (1987). Mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Blood*, 70, 1331–1337.

Qin, X., Li, G., Qin, Y., Wang, Y., Wang, F., Liu, D., Xu, L., Chen, H., Han, W., Wang, J., *et al.* (2011). Quantitative assessment of hematopoietic chimerism by quantitative real-time polymerase chain reaction of sequence polymorphism systems after hematopoietic stem cell transplantation. *Chin. Med. J. (Engl.)*, 124, 2301–2308.

Rezvani, K., Mielke, S., Ahmadzadeh, M., Kilical, Y., Savani, B.N., Zeilah, J., Keyvanfar, K., Montero, A., Hensel, N., Kurlander, R., *et al.* (2006). High donor FOXP3-positive regulatory T-cell (Treg) content is associated with a low risk of GVHD following HLA-matched allogeneic SCT. *Blood*, 108, 1291–1297.

Román, J., Serrano, J., Jiménez, A., Castillejo, J.A., Reina, M.L., González, M.G., Rodríguez, M.C., García, I., Sánchez, J., Maldonado, J., *et al.* (2000). Myeloid mixed chimerism is associated with relapse in bcr-abl positive patients after unmanipulated allogeneic bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Haematologica*, 85, 173–180.

Rossi, G., Carella, A.M., Minervini, M.M., Savino, L., Fontana, A., Pellegrini, F., Greco, M.M., Merla, E., Quarta, G., Loseto, G., *et al.* (2013). Minimal residual disease after allogeneic stem cell transplant: a comparison among multiparametric flow cytometry, Wilms tumor 1 expression and chimerism status (Complete chimerism versus Low Level Mixed Chimerism) in acute leukemia. *Leuk. Lymphoma*, 54, 2660–2666.

Ruggeri, A., Labopin, M., Sanz, G., Piemontese, S., Arcese, W., Bacigalupo, A., Blaise, D., Bosi, A., Huang, H., Karakasis, D., *et al.* (2015). Comparison of outcomes after unrelated cord blood and unmanipulated haploidentical stem cell transplantation in adults with acute leukemia. *Leukemia*, 29, 1891–1900.

Rupa-Matysek, J., Lewandowski, K., Nowak, W., Sawiński, K., Gil, L., and Komarnicki, M. (2011). Correlation between the kinetics of CD3+ chimerism and the incidence of graft-versus-host disease in patients undergoing allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant. Proc.*, 43, 1915–1923.

Sahota, A., Gao, S., Hayes, J., and Jindal, R.M. (2000). Microchimerism and rejection: a meta-analysis. *Clin. Transplant.*, 14, 345–350.

Sanders, R., Huggett, J.F., Bushell, C.A., Cowen, S., Scott, D.J., and Foy, C.A. (2011). Evaluation of Digital PCR for Absolute DNA Quantification. *Anal. Chem.*, 83, 6474–6484.

- Santurtún, A., Riancho, J.A., Arozamena, J., López-Duarte, M., and Zarrabeitia, M.T. (2017). Indel analysis by droplet digital PCR: a sensitive method for DNA mixture detection and chimerism analysis. *Int. J. Legal Med.*, 131, 67–72.
- Schaap, N., Schattenberg, A., Bär, B., Mensink, E., de Man, A., Geurts van Kessel, A., and de Witte, T. (2000). Red blood cell phenotyping is a sensitive technique for monitoring chronic myeloid leukaemia patients after T-cell-depleted bone marrow transplantation and after donor leucocyte infusion. *Br. J. Haematol.*, 108, 116–125.
- Schmid, C., Schleuning, M., Ledderose, G., Tischer, J., and Kolb, H.-J. (2005). Sequential regimen of chemotherapy, reduced-intensity conditioning for allogeneic stem-cell transplantation, and prophylactic donor lymphocyte transfusion in high-risk acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *J. Clin. Oncol. Off.*, 23, 5675–5687.
- Schmid, C., Labopin, M., Nagler, A., Bornhäuser, M., Finke, J., Fassas, A., Volin, L., Gürman, G., Maertens, J., Bordignon, P., *et al.* (2007). Donor lymphocyte infusion in the treatment of first hematological relapse after allogeneic stem-cell transplantation in adults with acute myeloid leukemia: a retrospective risk factors analysis and comparison with other strategies by the EBMT Acute Leukemia Working Party. *J. Clin. Oncol. Off.*, 25, 4938–4945.
- Schmid, C., Schleuning, M., Hentrich, M., Markl, G.E., Gerbitz, A., Tischer, J., Ledderose, G., Oruzio, D., Hiddemann, W., and Kolb, H.-J. (2008). High antileukemic efficacy of an intermediate intensity conditioning regimen for allogeneic stem cell transplantation in patients with high-risk acute myeloid leukemia in first complete remission. *Bone Marrow Transplant.*, 41, 721–727.
- Schütz, E., Fischer, A., Beck, J., Harden, M., Koch, M., Wuensch, T., Stockmann, M., Nashan, B., Kollmar, O., Matthaei, J., *et al.* (2017). Graft-derived cell-free DNA, a noninvasive early rejection and graft damage marker in liver transplantation: A prospective, observational, multicenter cohort study. *PLoS Med.*, 14, e1002286.
- Serrano, J., Roman, J., Sanchez, J., Jimenez, A., Castillejo, J.A., Herrera, C., Gonzalez, M.G., Reina, L., Rodriguez, M.C., Alvarez, M.A., *et al.* (2000). Molecular analysis of lineage-specific chimerism and minimal residual disease by RT-PCR of p210(BCR-ABL) and p190(BCR-ABL) after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia: increasing mixed myeloid chimerism and p190(BCR-ABL) detection precede cytogenetic relapse. *Blood*, 95, 2659–2665.
- Shlomchik, W.D. (2007). Graft-versus-host disease. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 340–352.
- Slavin, S., Naparstek, E., Nagler, A., Ackerstein, A., Samuel, S., Kapelushnik, J., Brautbar, C., and Or, R. (1996). Allogeneic cell therapy with donor peripheral blood cells and recombinant human interleukin-2 to treat leukemia relapse after allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 87, 2195–2204.
- Slavin, S., Nagler, A., Naparstek, E., Kapelushnik, Y., Aker, M., Cividalli, G., Varadi, G., Kirschbaum, M., Ackerstein, A., Samuel, S., *et al.* (1998). Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. *Blood*, 91, 756–763.
- Socié, G., Clift, R.A., Blaise, D., Devergie, A., Ringden, O., Martin, P.J., Remberger, M., Deeg, H.J., Ruutu, T., Michallet, M., *et al.* (2001). Busulfan plus cyclophosphamide compared with total-body irradiation plus cyclophosphamide before marrow transplantation for myeloid leukemia: long-term follow-up of 4 randomized studies. *Blood*, 98, 3569–3574.
- Stahl, T., Böhme, M.U., Kröger, N., and Fehse, B. (2015). Digital PCR to assess hematopoietic chimerism after allogeneic stem cell transplantation. *Exp. Hematol.*, 43, 462–468.e1.

- Stikvoort, A., Gertow, J., Sundin, M., Remberger, M., Mattsson, J., and Uhlin, M. (2013). Chimerism patterns of long-term stable mixed chimeras posthematopoietic stem cell transplantation in patients with nonmalignant diseases: follow-up of long-term stable mixed chimerism patients. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 19, 838–844.
- Swerdlow, S.H., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., and Vardiman, J.W. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Lyon, France, International Agency for Research on Cancer, 2008.
- Sykes, P.J., Neoh, S.H., Brisco, M.J., Hughes, E., Condon, J., and Morley, A.A. (1992). Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques*, 13, 444–449.
- Taira, C., Matsuda, K., Yamaguchi, A., Uehara, M., Sugano, M., Okumura, N., and Honda, T. (2015). Rapid single nucleotide polymorphism based method for hematopoietic chimerism analysis and monitoring using high-speed droplet allele-specific PCR and allele-specific quantitative PCR. *Clin. Chim. Acta*, 445, 101–106.
- Thannberger, A. Etude rétrospective du suivi de chimérisme dans l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques: vers une optimisation de la procédure de surveillance. Th D Med, Rouen, 2007.
- Thein, S.L., Jeffreys, A.J., and Blacklock, H.A. (1986). Identification of post-transplant cell population by DNA fingerprint analysis. *Lancet Lond. Engl.* 2, 37.
- Thiede, C. (2004). Diagnostic chimerism analysis after allogeneic stem cell transplantation: new methods and markers. *Am. J. Pharmacogenomics*, 4, 177–187.
- Thiede, C., Florek, M., Bornhäuser, M., Ritter, M., Mohr, B., Brendel, C., Ehninger, G., and Neubauer, A. (1999). Rapid quantification of mixed chimerism using multiplex amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Bone Marrow Transplant.*, 23, 1055–1060.
- Thomas, E., Storb, R., Clift, R.A., Fefer, A., Johnson, F.L., Neiman, P.E., Lerner, K.G., Glucksberg, H., and Buckner, C.D. (1975a). Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N. Engl. J. Med.*, 292, 832–843.
- Thomas, E.D., Storb, R., Clift, R.A., Fefer, A., Johnson, L., Neiman, P.E., Lerner, K.G., Glucksberg, H., and Buckner, C.D. (1975b). Bone-marrow transplantation (second of two parts). *N. Engl. J. Med.* 292, 895–902.
- Thomas, E.D., Buckner, C.D., Clift, R.A., Fefer, A., Johnson, F.L., Neiman, P.E., Sale, G.E., Sanders, J.E., Singer, J.W., Shulman, H., *et al.* (1979). Marrow transplantation for acute nonlymphoblastic leukemia in first remission. *N. Engl. J. Med.*, 301, 597–599.
- Tsutsumi, Y., Tanaka, J., Miura, Y., Toubai, T., Kato, N., Fujisawa, F., Toyoshima, N., Ota, S., Mori, A., Yonezumi, M., *et al.* (2004). Molecular analysis of T-cell repertoire in patients with graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Leuk. Lymphoma*, 45, 481–488.
- Valcárcel, D., Martino, R., Caballero, D., Mateos, M.V., Pérez-Simón, J.A., Canals, C., Fernández, F., Bargay, J., Muñoz-Díaz, E., Gonzalez, M., *et al.* (2003). Chimerism analysis following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning. *Bone Marrow Transplant.*, 31, 387–392.
- Walsh, P.S., Fildes, N.J., and Reynolds, R. (1996). Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res.*, 24, 2807–2812.

Walters, M.C., Patience, M., Leisenring, W., Rogers, Z.R., Aquino, V.M., Buchanan, G.R., Roberts, I.A., Yeager, A.M., Hsu, L., Adamkiewicz, T., *et al.* (2001). Stable mixed hematopoietic chimerism after bone marrow transplantation for sickle cell anemia. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 7, 665–673.

Watzinger, F., Lion, T., Steward, C., and Eurochimerism consortium (2006). The RSD code: proposal for a nomenclature of allelic configurations in STR-PCR-based chimerism testing after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia*, 20, 1448–1452.

Whitlam, J.B., Ling, L., Swain, M., Harrington, T., Mirochnik, O., Brooks, I., Cronin, S., Challis, J., Petrovic, V., Bruno, D.L., *et al.* (2017). Use of ubiquitous, highly heterozygous copy number variants and digital droplet polymerase chain reaction to monitor chimerism after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Exp. Hematol.*, 49, 39–47.e5.

Zeiser, R., Spyridonidis, A., Wäsch, R., Ihorst, G., Grüllich, C., Bertz, H., and Finke, J. (2005). Evaluation of immunomodulatory treatment based on conventional and lineage-specific chimerism analysis in patients with myeloid malignancies after myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Leukemia*, 19, 814–821.

Zetterquist, H., Mattsson, J., Uzunel, M., Näsman-Björk, I., Svenberg, P., Tammik, L., Bayat, G., Winiarski, J., and Ringdén, O. (2000). Mixed chimerism in the B cell lineage is a rapid and sensitive indicator of minimal residual disease in bone marrow transplant recipients with pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.*, 25, 843–851.

Serment de Galien

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

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

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

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



Florian RENOSI

Apport du tri myéloïde et lymphoïde T dans le suivi de chimérisme post-allogreffe de cellules souches hématopoïétiques chez l'adulte

Th. D. Pharm., Rouen, 2017, 103 p.

RESUME

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) consiste à remplacer le système hématopoïétique du patient par celui d'un donneur sain. Le chimérisme est défini par le pourcentage de cellules d'origine donneur dans le sang ou la moelle du patient. Une étude a été réalisée rétrospectivement sur 258 adultes allogreffés entre les 1^{er} janvier 2007 et 2017 au Centre Henri Becquerel. Trois groupes composaient la cohorte : les aplasies médullaires (n=15), les hémopathies malignes ayant reçu un conditionnement standard (n=96) et celles ayant reçu un conditionnement atténué (n=147). Ce travail a permis de valider le remplacement de l'étude des séquences *Variable Number Tandem Repeats* par l'étude des séquences *Short Tandem Repeats* (STR). Les modalités du suivi de chimérisme ont été réévaluées, notamment les places respectives de la PCR quantitative par chimie TaqMan® et de l'étude des STR. Il a été montré que le tri cellulaire permet d'étudier plus spécifiquement certains paramètres. Le chimérisme sur population lymphoïde T est plus spécifique des réactions immunitaires, notamment du greffon contre l'hôte, où le chimérisme est significativement plus élevé à J30 et à J100. Le chimérisme sur population spécifique de l'hémopathie est plus sensible aux rechutes à J100. Ainsi, ces deux populations sont particulièrement intéressantes et un suivi de chimérisme réalisé sur sang total et deux populations triées reste raisonnable d'un point de vue médico-économique. Enfin, le suivi de chimérisme doit être réalisé au minimum à J30, J60, J100, 6 mois et 1 an de l'allogreffe, en accord avec les nouvelles recommandations, quelle que soit la pathologie et le conditionnement.

MOTS CLES : Chimérisme – Cellules souches hématopoïétiques – Greffe – Tri cellulaire

JURY

Président : Mme PESTEL-CARON Martine, PU-PH

Membres : Mr JARDIN Fabrice, PU-PH

Mme MENARD Anne-Lise, Docteur en Médecine

Mme ETANCELIN Pascaline, Docteur en Pharmacie

DATE DE SOUTENANCE : 17 octobre 2017