

# Facteurs prédictifs du chimérisme après greffe non apparentée de cellules souches de sang placentaire chez l'enfant

Élodie Elkaim

▶ **To cite this version:**

Élodie Elkaim. Facteurs prédictifs du chimérisme après greffe non apparentée de cellules souches de sang placentaire chez l'enfant. Sciences du Vivant [q-bio]. 2014. dumas-01774603

**HAL Id: dumas-01774603**

**https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01774603**

Submitted on 23 Apr 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

# Facteurs prédictifs du chimérisme après greffe non apparentée de cellules souches de sang placentaire chez l'enfant

# T H È S E – A R T I C L E

**Présentée et publiquement soutenue devant**

**LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE**

**Le 7 Février 2014**

**Par Madame Élodie ELKAIM**

**Née le 9 janvier 1984 à Nice (06)**

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

D.E.S. de PÉDIATRIE

**Membres du Jury de la Thèse** :

| | |
|---|---|
| **Monsieur le Professeur MICHEL Gérard** | **Président** |
| **Monsieur le Professeur CHAMBOST Hervé** | **Assesseur** |
| **Monsieur le Professeur VEY Norbert** | **Assesseur** |
| **Monsieur le Professeur TSIMARATOS Michel** | **Assesseur** |
| **Madame le Docteur GALAMBRUN Claire** | **Directeur** |

Faculté de Médecine
Aix*Marseille Université

# Facteurs prédictifs du chimérisme après greffe non apparentée de cellules souches de sang placentaire chez l'enfant

## T H È S E – A R T I C L E

**Présentée et publiquement soutenue devant**

**LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE MARSEILLE**

**Le 7 Février 2014**

**Par Madame Élodie ELKAIM**

**Née le 9 janvier 1984 à Nice (06)**

Pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

D.E.S. de PÉDIATRIE

**Membres du Jury de la Thèse** :

| | |
|---|---|
| **Monsieur le Professeur MICHEL Gérard** | **Président** |
| **Monsieur le Professeur CHAMBOST Hervé** | **Assesseur** |
| **Monsieur le Professeur VEY Norbert** | **Assesseur** |
| **Monsieur le Professeur TSIMARATOS Michel** | **Assesseur** |
| **Madame le Docteur GALAMBRUN Claire** | **Directeur** |

# L'UNIVERSITÉ D'AIX-MARSEILLE

**Président** : Yvon BERLAND

# FACULTÉ DE MÉDECINE

**Doyen** : Georges LEONETTI

**Vice-Doyen aux Affaires Générales : Patrick DESSI**
**Vice-Doyen aux Professions Paramédicales : Philippe BERBIS**

**Assesseurs** :
* aux Études : Jean-Michel VITON
* à la Recherche : Jean-Louis MEGE
* aux Prospectives Hospitalo-Universitaires : Frédéric COLLART
* aux Enseignements Hospitaliers : Patrick VILLANI
* pour le Département Professionnel Continu : Fabrice BARLESI
* pour le Secteur Nord : Christian BRUNET

**Chargés de mission** :
* 1er cycle : Jean-Marc DURAND et Marc BARTHET
* 2ème cycle : Marie-Aleth RICHARD
* 3eme cycle DES/DESC : Gilles BOUVENOT et Pierre-Édouard FOURNIER
* Licences-Masters-Doctorat : Pascal ADALIAN
* DU-DIU : Gérard SEBAHOUN
* Sciences Humaines et Sociales : Pierre LE COZ
* Préparation à l'ECN : Stéphane BERDAH
* Démographie Médicale et Filiarisation : Roland SAMBUC
* Relations Internationales : Philippe PAROLA
* DPC Spécialités Médicales : Gilbert HABIB
* DPC Spécialités Chirurgicales : Jean-Luc JOUVE
*DPC Médecine Générale : Yves FRANCES
* DPC Paramédicaux : Catherine METZLER/GUILLEMAIN
* Personnel BIATSS : Emmanuelle CHARAFFE-JAUFFRET
* Étudiants : Lola LOUSSERT

**Chef des services généraux** :
* Pascale SOLO

**Chefs de service** :
* Communication : Ghislaine HANCY
* Examens : Marie-Thérèse ZAMMIT
* Scolarité Pédagogique : Christine GAUTHIER
* Maintenance : Philippe KOCK
* Intérieur : Joëlle FRAVEGA

**DOYENS HONORAIRES**

M. Yvon BERLAND
M. André ALI CHERIF
M. Jean-François PELLISSIER

# PROFESSEURS HONORAIRES

MM AGOSTINI Serge
ALDIGHIERI René
ALLIEZ Bernard
AQUARON Robert
ARGEME Maxime
ASSADOURIAN Robert
BAILLE Yves
BARDOT André
BERARD Pierre
BERGOIN Maurice
BERNARD Dominique
BERNARD Pierre-Marie
BERTRAND Edmond
BISSET Jean-Pierre
BLANC Bernard
BONERANDI Jean-Jacques
BONNEAU Henri
BONNOIT Jean
BORY Michel
BOURGEADE Augustin
BOUTIN Christian
BOUVENOT Gilles
BOUYALA Jean-Marie
BREMOND Georges
BRICOT René
BUREAU Henri
CAMBOULIVES Jean
CANNONI Maurice
CARCASSONNE Yves
CARTOUZOU Guy
CHAMLIAN Albert
CHARREL Michel
CHOUX Maurice
CIANFARANI François
CLEMENT Robert
CODACCIONI Jean-Louis
COMBALBERT André
CORRIOL Jacques
COTTE Gérard
DALMAS Henri
DESANTI Etienne
DEVIN Robert
DJIANE Pierre
DONNET Vincent
DUCASSOU Jacques
DUFOUR Henri
DUFOUR Michel
FARISSE Jacques
FARNARIER Georges
FAVRE Roger
FIECHI Marius
FIGARELLA Jacques
FRANCOIS Georges
GABRIEL Bernard
GALINIER Louis
GALLAIS Hervé
GARCIN Michel
GASCARD Emile
GAUTHIER André
GERARD Raymond
GEROLAMI-SANTANDREA André
GIUDICELLI Roger
GIUDICELLI Sébastien

MM GOUDARD Alain
GOUIN François
GRIMAUD Charles
GRISOLI François
GROULIER Pierre
HADIDA/SAYAG Jacqueline
HASSOUN Jacques
HEIM Marc
HOUEL Jean
HUGUET Jean-François
JAQUET Philippe
JOUVE Paulette
JUHAN Claude
JUIN Pierre
KAPHAN Gérard
KASBARIAN Michel
KHALIL Richard
KLEISBAUER Jean-Pierre
LACHARD Jean
LAFFARGUE Pierre
LEVY Samuel
LOUCHET Edmond
LOUIS René
LUCIANI Jean-Marie
MAGNAN Jacques
MALLAN- MANCINI Josette
MALMEJAC Claude
MATTEI Jean François
MERCIER Claude
METGE Paul
MICHOTEY Georges
MILLET Yves
MIRANDA François
MONFORT Gérard
MONGES André
MONGIN Maurice
MONTIES Jean-Raoul
NICOLI René
NOIRCLERC Michel
OLMER Michel
OREHEK Jean
PAPY Jean-Jacques
PAULIN Raymond
PELLET William
PELOUX Yves
PENAUD Antony
PENE Pierre
PERRIMOND Henri
PIANA Lucien
PICAUD Robert
PIGNOL Fernand
POGGI Louis
PONCET Michel
POYEN Danièle
PRIVAT Yvan
QUILICHINI Francis
RANQUE Jacques
RANQUE Philippe
REBOUD Eugène
RICHAUD Christian
ROCHAT Hervé
ROHNER Jean-Jacques
ROUX Hubert

# PROFESSEURS HONORAIRES

MM RUF Henri
SAHEL José
SALAMON Georges
SALDUCCI Jacques
SAN MARCO Jean-Louis
SANKALE Marc
SARACCO Jacques
SARLES Henry
SARLES Jean-Claude
SCHIANO Alain
SCOTTO Jean-Claude
SEITE Raymond
SERRATRICE Georges
SOULAYROL René
STAHL André
TAMALET Jacques
TOURNIGAND Pierre
TRIFAUD André
UNAL Daniel
VAGUE Philippe
VAGUE/JUHAN Irène
VANUXEM Paul
VERVLOET Daniel
VIGOUROUX Robert
SARLES Henry
SARLES Jean-Claude
SCOTTO Jean-Claude
SEITE Raymond
SERRATRICE Georges
SOULAYROL René
STAHL André
TAMALET Jacques
TOURNIGAND Pierre
TRIFAUD André
UNAL Daniel
VAGUE Philippe
VAGUE/JUHAN Irène
VANUXEM Paul
VERVLOET Daniel
VIGOUROUX Robert

# DOCTEURS HONORIS CAUSA

| | |
|---|---|
| **1967** | |
| MM. les Professeurs | DADI (Italie) |
| | CID DOS SANTOS (Portugal) |
| **1974** | |
| MM. les Professeurs | MAC ILWAIN (Grande-Bretagne) |
| | T.A. LAMBO (Suisse) |
| **1975** | |
| MM. les Professeurs | O. SWENSON (U.S.A.) |
| | Lord J.WALTON of DETCHANT (Grande-Bretagne) |
| **1976** | |
| MM. les Professeurs | P. FRANCHIMONT (Belgique) |
| | Z.J. BOWERS (U.S.A.) |
| **1977** | |
| MM. les Professeurs | C. GAJDUSEK-Prix Nobel (U.S.A.) |
| | C.GIBBS (U.S.A.) |
| | J. DACIE (Grande-Bretagne) |
| **1978** | |
| M. le Président | F. HOUPHOUET-BOIGNY (Côte d'Ivoire) |
| **1980** | |
| MM. les Professeurs | A. MARGULIS (U.S.A.) |
| | R.D. ADAMS (U.S.A.) |
| **1981** | |
| MM. les Professeurs | H. RAPPAPORT (U.S.A.) |
| | M. SCHOU (Danemark) |
| | M. AMENT (U.S.A.) |
| | Sir A. HUXLEY (Grande-Bretagne) |
| | S. REFSUM (Norvège) |
| **1982** | |
| M. le Professeur | W.H. HENDREN (U.S.A.) |
| **1985** | |
| MM. les Professeurs | S. MASSRY (U.S.A.) |
| | KLINSMANN (R.D.A.) |
| **1986** | |
| MM. les Professeurs | E. MIHICH (U.S.A.) |
| | T. MUNSAT (U.S.A.) |
| | LIANA BOLIS (Suisse) |
| | L.P. ROWLAND (U.S.A.) |
| **1987** | |
| M. le Professeur | P.J. DYCK (U.S.A.) |
| **1988** | |
| MM. les Professeurs | R. BERGUER (U.S.A.) |
| | W.K. ENGEL (U.S.A.) |
| | V. ASKANAS (U.S.A.) |
| | J. WEHSTER KIRKLIN (U.S.A.) |
| | A. DAVIGNON (Canada) |
| | A. BETTARELLO (Brésil) |
| **1989** | |
| M. le Professeur | P. MUSTACCHI (U.S.A.) |

# DOCTEURS HONORIS CAUSA

**1990**

MM. les Professeurs J.G. MC LEOD (Australie)
J. PORTER (U.S.A.)

**1991**

MM. les Professeurs J. Edward MC DADE (U.S.A.)
W. BURGDORFER (U.S.A.)

**1992**

MM. les Professeurs H.G. SCHWARZACHER (Autriche)
D. CARSON (U.S.A.)
T. YAMAMURO (Japon)

**1994**

MM. les Professeurs G. KARPATI (Canada)
W.J. KOLFF (U.S.A.)

**1995**

MM. les Professeurs D. WALKER (U.S.A.)
M. MULLER (Suisse)
V. BONOMINI (Italie)

**1997**

MM. les Professeurs C. DINARELLO (U.S.A.)
D. STULBERG (U.S.A.)
A. MEIKLE DAVISON (Grande-Bretagne)
P.I. BRANEMARK (Suède)

**1998**

MM. les Professeurs O. JARDETSKY (U.S.A.)

**1999**

MM. les Professeurs J. BOTELLA LLUSIA (Espagne)
D. COLLEN (Belgique)
S. DIMAURO (U. S. A.)

**2000**

MM. les Professeurs D. SPIEGEL (U. S. A.)
C. R. CONTI (U.S.A.)

**2001**

MM. les Professeurs P-B. BENNET (U. S. A.)
G. HUGUES (Grande Bretagne)
J-J. O'CONNOR (Grande Bretagne)

**2002**

MM. les Professeurs M. ABEDI (Canada)
K. DAI (Chine)

**2003**

M. le Professeur T. MARRIE (Canada)
Sir G.K. RADDA (Grande Bretagne)

**2004**

M. le Professeur M. DAKE (U.S.A.)

**2005**

M. le Professeur L. CAVALLI-SFORZA (U.S.A.)

**2006**

M. le Professeur A. R. CASTANEDA (U.S.A.)

**2007**

M. le Professeur S. KAUFMANN (Allemagne)

# EMERITAT

| | | |
|---|---|---|
| **2007** | | |
| M. le Professeur | LEVY Samuel | 31/08/2011 |
| **2008** | | |
| M. le Professeur | LEVY Samuel | 31/08/2011 |
| Mme le Professeur | JUHAN-VAGUE Irène | 31/08/2011 |
| M. le Professeur | PONCET Michel | 31/08/2011 |
| M. le Professeur | KASBARIAN Michel | 31/08/2011 |
| M. le Professeur | ROBERTOUX Pierre | 31/08/2011 |
| **2009** | | |
| M. le Professeur | DJIANE Pierre | 31/08/2011 |
| M. le Professeur | VERVLOET Daniel | 31/08/2012 |
| **2010** | | |
| M. le Professeur | MAGNAN Jacques | 31/12/2013 |
| **2011** | | |
| M. le Professeur | DI MARINO Vincent | 31/08/2014 |
| M. le Professeur | MARTIN Pierre | 31/08/2014 |
| M. le Professeur | METRAS Dominique | 31/08/2014 |
| **2012** | | |
| M. le Professeur | AUBANIAC Jean-Manuel | 31/08/2015 |
| M. le Professeur | BOUVENOT Gilles | 31/08/2015 |
| M. le Professeur | CAMBOULIVES Jean | 31/08/2015 |
| M. le Professeur | FAVRE Roger | 31/08/2015 |
| **2013** | | |
| M. le Professeur | BRANCHEREAU Alain | 31/08/2016 |
| M. le Professeur | CARAYON Pierre | 31/08/2016 |
| M. le Professeur | COZZONE Patrick | 31/08/2016 |
| M. le Professeur | DELMONT Jean | 31/08/2016 |
| M. le Professeur | HENRY Jean-François | 31/08/2016 |
| M. le Professeur | LE GUICHAOUA Marie-Roberte | 31/08/2016 |
| M. le Professeur | RUFO Marcel | 31/08/2016 |
| M. le Professeur | SEBAHOUN Gérard | 31/08/2016 |

# PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

AGOSTINI Aubert
ALBANESE Jacques
ALESSANDRINI Pierre
ALIMI Yves
AMABILE Philippe
AMBROSI Pierre
ARGENSON Jean-Noël
ASTOUL Philippe
ATTARIAN Shahram
AUFFRAY Jean-Pierre
AUQUIER Pascal
AUTILLO/TOUATI Amapola
AVIERINOS Jean-François
AZORIN Jean-Michel
AZULAY Jean-Philippe
BAILLY Daniel
BARDOT Jacques
BARLESI Fabrice
BARLIER-SETTI Anne
BARTHET Marc
BARTOLI Jean-Michel
BARTOLIN Robert
BARTOLOMEI Fabrice
BASTIDE Cyrille
BENSOUSSAN Laurent
BERBIS Philippe
BERDAH Stéphane
BERLAND Yvon
BERNARD Jean-Louis
BERNARD Jean-Paul
BEROUD Christophe
BERTUCCI François
BLADOU Franck
BLAISE Didier
*BLANC Jean-Louis Surnombre*
BLIN Olivier
BOLLINI Gérard
BONGRAND Pierre
BONIN/GUILLAUME Sylvie
BONNET Jean-Louis
BOTTA Alain
BOTTA/FRIDLUND Danielle
BOUBLI Léon
BRETELLE Florence
BROUQUI Philippe
BRUDER Nicolas
BRUE Thierry
BRUNET Christian
BRUNET Philippe
BURTEY Stéphane
CASANOVA Dominique
*CAU Pierre Surnombre*
CECCALDI Mathieu
CHABOT Jean-Michel
CHAGNAUD Christophe
CHAMBOST Hervé
CHAMPSAUR Pierre
CHANEZ Pascal
CHARAFFE-JAUFFRET Emmanuelle
CHARREL Rémi
CHIARONI Jacques
CHARPIN Denis
CHAUMOITRE Kathia
CHAUVEL Patrick
CHINOT Olivier
CHOSSEGROS Cyrille
CLAVERIE Jean-Michel
COLLART Frédéric
CONRATH John
*CONTE-DEVOLX Bernard Surnombre*
COSTELLO Régis
*COULANGE Christian Surnombre*
COWEN Didier
CRAVELLO Ludovic
CURVALE Georges
DA FONSECA David
DANIEL Laurent
DARMON Patrice
D'ERCOLE Claude
D'JOURNO Xavier
DE LAGAUSIE Pascal
*DE MICCO Philippe Surnombre*
DEHARO Jean-Claude
DELARQUE Alain
DELPERO Jean-Robert
DENIS Danièle
DESSEIN Alain
DESSI Patrick
DEVRED Philippe
DISDIER Patrick
DODDOLI Christophe
DRANCOURT Michel
DUBUS Jean-Christophe
DUFFAUD Florence
DUFOUR Henry
DURAND Jean-Marc
DUSSOL Bertrand
ENJALBERT Alain
FAUGERE Gérard
FELICIAN Olvier
FIGARELLA/BRANGER Dominique
FLECHER Xavier
FONTES Michel
FOURNIER Pierre-Edouard
FRAISSE Alain
FRANCES Yves
*FUENTES Pierre Surnombre*
FUENTES Stéphane
GABERT Jean
GAINNIER Marc
GAMERRE Marc
GARCIA Stéphane
*GARNIER Jean-Marc Surnombre*
GENTILE Stéphanie
GERBEAUX Patrick
GEROLAMI/SANTANDREA René
GILBERT/ALESSI Marie-Christine
GIORGI Roch
GIOVANNI Antoine
GIRARD Nadine
GIRAUD/CHABROL Brigitte
GONCALVES Anthony
GORINCOUR Guillaume
GRANEL/REY Brigitte
GRILLO Jean-Marie
GRIMAUD Jean-Charles
GROB Jean-Jacques
GUEDJ Eric
GUIEU Régis
GUIS Sandrine
GUYE Maxime
GUYOT Laurent
GUYS Jean-Michel
HABIB Gilbert
HARDWIGSEN Jean
HARLE Jean-Robert
HEIM Marc
HOFFART Louis
HOUVENAEGHEL Gilles
JACQUIER Alexis
JAMMES Yves
JOLIVET/BADIER Monique
JOUVE Jean-Luc
KAPLANSKI Gilles
KARSENTY Gilles
KERBAUL François
KREITMANN Bernard
LAFFORGUE Pierre
LANCON Christophe
LA SCOLA Bernard
LAUGIER René
LAUNAY Franck
LAVIEILLE Jean-Pierre
LE TREUT Yves-Patrice
LECHEVALLIER Eric
LEGRE Régis
LEONE Marc
LEONETTI Georges
LEPIDI Hubert
LEVY Nicolas
MACE Loïc
*MAGALON Guy Surnombre*
MAGNAN Pierre-Edouard
MARANINCHI Dominique
MARTIN Claude
MEGE Jean-Louis
MERROT Thierry
METELLUS Philippe
MEYER/DUTOUR Anne
MICHEL Gérard
MICHELET Pierre
MONCLA Anne
MORANGE Pierre-Emmanuel
MOULIN Guy
MOUTARDIER Vincent
MUNDLER Olivier
NAUDIN Jean
*NAZARIAN Serge Surnombre*
NICOLLAS Richard
NICCOLI/SIRE Patricia
NICOLAS DE LAMBALLERIE Xavier
OLIVE Daniel
OREHEK Jean
OUAFIK L'Houcine
PAGANELLI Franck
PANUEL Michel

## PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

PAPAZIAN Laurent
PAROLA Philippe
PAUT Olivier
PELISSIER-ALICOT Anne-Laure
PELLETIER Jean
PETIT Philippe
PHAM Thao
PIARROUX Renaud
PIERCECCHI/MARTI Marie-Dominique
PIQUET Philippe
PIRRO Nicolas
POINSO François
*POITOUT Dominique Surnombre*
POUGET Jean
RACCAH Denis
RAOULT Didier
REGIS Jean
REYNAUD/GAUBERT Martine
REYNAUD Rachel
RICHARD/LALLEMAND Marie-Aleth
RIDINGS Bernard
ROCHE Pierre-Hugues
ROCH Antoine
ROCHWERGER Richard
ROSSI Dominique
ROSSI Pascal
ROUDIER Jean
SALAS Sébastien
SAMBUC Roland
SARLES Jacques
SARLES/PHILIP Nicole
SASTRE Bernard
SCAVARDA Didier
SCHLEINITZ Nicolas
SEBAG Frédéric
SEITZ Jean-François
*SERMENT Gérard Surnombre*
SERRATRICE Jacques
SIELEZNEFF Igor
SIMEONI Umberto
SIMON Nicolas
STEIN Andréas
TARANGER Colette
THIRION Xavier
THOMAS Pascal
THOMASSIN Jean-Marc
THUNY Franck
TRIGLIA Jean-Michel
TROPIANO Patrick
TSIMARATOS Michel
VACHER-COPONAT Henri
VALERO René
VEY Norbert
*VIALETTES Bernard Surnombre*
VIDAL Vincent
VIENS Patrice
VILLANI Patrick
VITON Jean-Michel
VIEHWEGER Heide Elke
VIVIER Eric
*WEILLER Pierre-Jean Surnombre*
XERRI Luc

### PROFESSEUR DES UNIVERSITES

ADALIAN Pascal
AGHABABIAN Valérie
BELIN Pascal
CHABANNON Christian
CHABRIERE Eric
FERON François
LE COZ Pierre
RANJEVA Jean-Philippe
SOBOL Hagay

### PROFESSEUR CERTIFIE

BRANDENBURGER Chantal

### PRAG

TANTI-HARDOUIN Nicolas

### PROFESSEUR ASSOCIE DE MEDECINE GENERALE *A MI-TEMPS*

FILIPPI Simon
DUMOND-HUSSON Monique

### PROFESSEUR ASSOCIE *A TEMPS PARTIEL*

BURKHART Gary

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES-PRATICIENS HOSPITALIERS

ACHARD Vincent
ANDRAC/MEYER Lucile
ANDRE Nicolas
ATLAN Catherine
AUDOIN Bertrand
BACCINI Véronique
BALIQUE Hubert
BANDINI/MOULY Annick
BARTHELEMY Pierre
BARTOLI Christophe
BECHIS Guy
BEGE Thierry
BELIARD Sophie
BERGE-LEFRANC Jean-Louis
BERNARD Rafaëlle
BLONDEL Benjamin
BONELLO Laurent
BOUCRAUT Joseph
BOULAMERY/VELLY Audrey
BOULLU/CIOCCA Sandrine
BREGEON Fabienne
BUFFAT Christophe
CALAS/AILLAUD Marie-Françoise
CAMILLERI Serge
CARRON Romain
CASTINETTI Frédéric
CHAUDET Hervé
CHICHEPORTICHE Colette
COURBIERE Blandine
COZE Carole
CUISSET Thomas
*DADOUN Frédéric (disponibilité)*
DAHAN ALCARAZ Laétitia
DALES Jean-Philippe
DEGEORGES/VITTE Joëlle
DEL VOLGO/GORI Marie-José
DELLIAUX Stéphane
DESPLAT/JEGO Sophie
DEVEZE Arnaud
DUFOUR Jean-Charles
FARAUT Françoise
FAUGERE Bernard
FENOLLAR Florence
FOBY/FRANCK Jacqueline
FRERE Corinne
GASTALDI Marguerite
GAUDART Jean
GAUDY/MARQUESTE Caroline
GAVARET Martine
GELSI/BOYER Véronique
GIUSIANO COURCAMBECK Sophie
GOURIET Frédérique
GREILLIER Laurent
GUIDON Catherine
HAUTIER/KRAHN Aurélie
JOURDE CHICHE Noémie
KRAHN Martin
LABIT/BOUVIER Corinne
LAFAGE/POCHITALOFF-HUVALE Marina
LAGIER Jean-Christophe
LAGOUANELLE/SIMEONI Marie-Claude
LE CORROLLER Thomas
LE HUCHER-MICHEL Marie-Pascale
LEJEUNE Pierre-Jean
LEVY/MOZZICONACCI Annie
MANCINI Julien
MARGOTAT Alain
MARY Charles
MATONTI Frédéric
METZLER/GUILLEMAIN Catherine
MICALLEF/ROLL Joëlle
MICHEL Fabrice
NGUYEN PHONG Karine
NINOVE Laetitia
OUAISSI Medhi
PAULMYER/LACROIX Odile
PERRIN Jeanne
PLANELLS Richard
POMMIER Gilbert
RANCHIN/MONGES Geneviève
RANQUE Stéphane
REY Marc
ROBAGLIA/SCHLUPP Andrée
ROBERT Philippe
ROLL Patrice
SARI/MINODIER Irène
SARLON BARTOLI Gabrielle
SAVEANU Alexandru
SOULA Gérard
TAIEB David
TEXTORIS Julien
TOGA Caroline
TOGA Isabelle
TREBUCHON/DA FONSECA Agnès
TROUSSE Delphine
VALLI Marc
VELLY Lionel
VELY Frédéric
VION-DURY Jean
VITTON Véronique
ZATTARA/CANNONI Hélène

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

(mono-appartenants)

BARBACARU/PERLES T. A.
BERLAND/BENHAIM Caroline
BERAUD/JUVEN Evelyne
BOUCAULT/GARROUSTE Françoise
BOYER Sylvie
DEGIOANNI/SALLE Anna
DESNUES Benoît
DUBOIS Christophe
GIOCANTI Dominique
LEROUX/MASSACRIER Annick
LIMERAT/BOUDOURESQUE Françoise
MARANINCHI Marie
MINVIELLE/DEVICTOR Bénédicte
POGGI Marjorie
RUEL Jérôme
STEINBERG Jean-Guillaume
THOLLON Lionel
THIRION Sylvie

## MAITRES DE CONFERENCES ASSOCIES DE MEDECINE GENERALE à MI-TEMPS

ADNOT Sébastien
CHEVALLIER Pierre-François
GENTILE Gaëtan
RAKOTO Jean-Claude

## MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE à MI-TEMPS

ALTAVILLA Annagrazia
REVIS Joana

**PROFESSEURS DES UNIVERSITES et MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS**
**PROFESSEURS ASSOCIES, MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES mono-appartenants**

## ANATOMIE *4201*

BRUNET Christian (PU-PH)
CHAMPSAUR Pierre (PU-PH)
*NAZARIAN Serge (PU-PH) Surnombre*
PIRRO Nicolas (PU-PH)

LE CORROLLER Thomas (MCU-PH)

THOLLON Lionel (MCF) (60ème section Service Pr BRUNET C.)

## ANATOMIE ET CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES *4203*

CHARAFE/JAUFFRET Emmanuelle (PU-PH)
DANIEL Laurent (PU-PH)
FIGARELLA/BRANGER Dominique (PU-PH)
GARCIA Stéphane (PU-PH)
TARANGER Colette (PU-PH)
XERRI Luc (PU-PH)

ANDRAC/MEYER Lucile (MCU-PH)
DALES Jean-Philippe (MCU-PH)
GIUSIANO COURCAMBECK Sophie (MCU PH)
LABIT/BOUVIER Corinne (MCU-PH)
RANCHIN/MONGES Geneviève (MCU-PH)

## ANESTHESIOLOGIE ET REANIMATION CHIRURGICALE ; MEDECINE URGENCE *4801*

ALBANESE Jacques (PU-PH)
AUFFRAY Jean-Pierre (PU-PH)
BRUDER Nicolas (PU-PH)
KERBAUL François (PU-PH)
LEONE Marc (PU-PH)
MARTIN Claude (PU-PH)
MICHELET Pierre (PU-PH)
PAUT Olivier (PU-PH)

GUIDON Catherine (MCU-PH)
MICHEL Fabrice (MCU-PH)
VELLY Lionel (MCU-PH)

## ANGLAIS *11*

BRANDENBURGER Chantal (PRCE)

BURKHART Gary (PAST)

## BIOLOGIE ET MEDECINE DU DEVELOPPEMENT ET DE LA REPRODUCTION ; GYNECOLOGIE MEDICALE *5405*

METZLER/GUILLEMAIN Catherine (MCU-PH)
PERRIN Jeanne (MCU-PH)

## BIOPHYSIQUE ET MEDECINE NUCLEAIRE *4301*

## ANTHROPOLOGIE *20*

ADALIAN Pascal (PR)

DEGIOANNI/SALLE Anna (MCF)

## BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE *4501*

CHARREL Rémi (PU PH)
*DE MICCO Philippe (PU-PH) Surnombre*
DRANCOURT Michel (PU-PH)
FOURNIER Pierre-Edouard (PU-PH)
NICOLAS DE LAMBALLERIE Xavier (PU-PH)
LA SCOLA Bernard (PU-PH)
RAOULT Didier (PU-PH)

FENOLLAR Florence (MCU-PH)
GOURIET Frédérique (MCU-PH)
NINOVE Laetitia (MCU-PH)

CHABRIERE Eric (PR) (64ème section)
DESNUES Benoit (MCF) ( 65ème section )

## BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE *4401*

BARLIER/SETTI Anne (PU-PH)

ENJALBERT Alain (PU-PH)
GABERT Jean (PU-PH)
GUIEU Régis (PU-PH)
OUAFIK L'Houcine (PU-PH)

BECHIS Guy (MCU-PH)
BUFFAT Christophe (MCU-PH)
LEJEUNE Pierre-Jean (MCU-PH)

MARGOTAT Alain (MCU-PH)
PLANELLS Richard (MCU-PH)
SAVEANU Alexandru (MCU-PH)

## BIOLOGIE CELLULAIRE *4403*

AUTILLO/TOUATI Amapola (PU-PH)
*CAU Pierre (PU-PH) Surnombre*
FONTES Michel (PU-PH)

GASTALDI Marguerite (MCU-PH)
LEVY/MOZZICONNACCI Annie (MCU-PH)
ROBAGLIA/SCHLUPP Andrée (MCU-PH)
ROLL Patrice (MCU-PH)

DUBOIS Christophe (MCF) (65ème section)
LEROUX/MASSACRIER Annick (MCF) (69ème section)

## CARDIOLOGIE *5102*

GUEDJ Eric (PU-PH)
GUYE Maxime (PU-PH)
MUNDLER Olivier (PU-PH)

BELIN Pascal (PR) (69ème section)
RANJEVA Jean-Philippe (PR) (69ème section)

CAMMILLERI Serge (MCU-PH)
TAIEB David (MCU-PH)
VION-DURY Jean (MCU-PH)

BARBACARU/PERLES Téodora Adriana (MCF) (69ème section)

**BIOSTATISTIQUES, INFORMATIQUE MEDICALE ET TECHNOLOGIES DE COMMUNICATION** *4604*

CLAVERIE Jean-Michel (PU-PH)
GIORGI Roch (PU-PH)

CHAUDET Hervé (MCU-PH)
DUFOUR Jean-Charles (MCU-PH)
GAUDART Jean(MCU-PH)
GIUSIANO Bernard (MCU-PH)
MANCINI Julien (MCU-PH)
SOULA Gérard (MCU-PH)

ABU ZAINEH Mohammad (MCF) (5ème section) (octobre)
BOYER Sylvie (MCF) (5ème section)

**CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE ET TRAUMATOLOGIQUE** *5002*

ARGENSON Jean-Noël (PU-PH)
CURVALE Georges (PU-PH)
FLECHER Xavier (PU PH)
*POITOUT Dominique (PU-PH) Surnombre*
ROCHWERGER Richard (PU-PH)
TROPIANO Patrick (PU-PH)

BLONDEL Benjamin (MCU-PH)

**CANCEROLOGIE ; RADIOTHERAPIE** *4702*

BERTUCCI François (PU-PH)
CHINOT Olivier (PU-PH)
COWEN Didier (PU-PH)
DUFFAUD Florence (PU-PH)
GONCALVES Anthony PU-PH)
HOUVENAEGHEL Gilles (PU-PH)
MARANINCHI Dominique (PU-PH)
SALAS Sébastien (PU-PH)
VIENS Patrice (PU-PH)

AVIERINOS Jean-François (PU-PH)
BONNET Jean-Louis (PU-PH)
DEHARO Jean-Claude (PU-PH)
FRAISSE Alain (PU-PH)
HABIB Gilbert (PU-PH)
PAGANELLI Franck (PU-PH)
THUNY Franck (PU-PH)

BONELLO Laurent (MCU PH)
CUISSET Thomas (MCU-PH)

**CHIRURGIE DIGESTIVE** *5202*

BERDAH Stéphane (PU-PH)
HARDWIGSEN Jean (PU-PH)
LE TREUT Yves-Patrice (PU-PH)
SASTRE Bernard (PU-PH)
SIELEZNEFF Igor (PU-PH)

OUAISSI Medhi (MCU-PH)

**CHIRURGIE GENERALE** *5302*

DELPERO Jean-Robert (PU-PH)

MOUTARDIER Vincent (PU-PH)
SEBAG Frédéric (PU-PH)

BEGE Thierry (MCU-PH)

**CHIRURGIE INFANTILE** *5402*

ALESSANDRINI Pierre (PU-PH)
BOLLINI Gérard (PU-PH)
DE LAGAUSIE Pascal (PU-PH)
GUYS Jean-Michel (PU-PH)
JOUVE Jean-Luc (PU-PH)
LAUNAY Franck (PU-PH)
MERROT Thierry (PU-PH)
VIEHWEGER Heide Elke (PU-PH)

**CHIRURGIE MAXILLO-FACIALE ET STOMATOLOGIE** *5503*

*BLANC Jean-Louis (PU-PH) Surnombre*
CHOSSEGROS Cyrille (PU-PH)
GUYOT Laurent (PU-PH)

**CHIRURGIE THORACIQUE ET CARDIOVASCULAIRE** *5103*

COLLART Frédéric (PU-PH)
D'JOURNO Xavier (PU-PH)
DODDOLI Christophe (PU-PH)
*FUENTES Pierre (PU-PH) Surnombre*
KREITMANN Bernard (PU-PH)
MACE Loïc (PU-PH)
THOMAS Pascal (PU-PH)

TROUSSE Delphine (MCU-PH)

**CHIRURGIE VASCULAIRE ; MEDECINE VASCULAIRE** *5104*

ALIMI Yves (PU-PH)
AMABILE Philippe (PU-PH)

MAGNAN Pierre-Edouard (PU-PH)
PIQUET Philippe (PU-PH)
SARLON BARTOLI Gabrielle (MCU PH)

**CYTOLOGIE ET HISTOLOGIE** *4202*

GRILLO Jean-Marie (PU-PH)

ACHARD Vincent (MCU-PH)
CHICHEPORTICHE Colette (MCU-PH)
LEPIDI Hubert (MCU-PH)
PAULMYER/LACROIX Odile (MCU-PH)

**DERMATOLOGIE - VENEREOLOGIE** *5003*

BERBIS Philippe (PU-PH)
GROB Jean-Jacques (PU-PH)
RICHARD/LALLEMAND Marie-Aleth (PU-PH)

GAUDY/MARQUESTE Caroline (MCU-PH)

**ENDOCRINOLOGIE ,DIABETE ET MALADIES METABOLIQUES ; GYNECOLOGIE MEDICALE** *5404*

BRUE Thierry (PU-PH)
*CONTE-DEVOLX Bernard (PU-PH) surnombre*
NICCOLI/SIRE Patricia (PU-PH)

CASTINETTI Frédéric (MCU-PH)

**EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE DE LA SANTE ET PREVENTION** *4601*

AUQUIER Pascal (PU-PH)
CHABOT Jean-Michel (PU-PH)
GENTILE Stéphanie (PU-PH)
SAMBUC Roland (PU-PH)
THIRION Xavier (PU-PH)

BALIQUE Hubert (MCU-PH)
LAGOUANELLE/SIMEONI Marie-Claude (MCU-PH)

MINVIELLE/DEVICTOR Bénédicte (MCF)(06ème section)
TANTI-HARDOUIN Nicolas (PRAG)

**IMMUNOLOGIE** *4703*

**CHIRURGIE PLASTIQUE, RECONSTRUCTRICE ET ESTHETIQUE ; BRÛLOLOGIE** *5004*

BARDOT Jacques (PU-PH)
CASANOVA Dominique (PU-PH)
LEGRE Régis (PU-PH)
*MAGALON Guy (PU-PH) Surnombre*

HAUTIER/KRAHN Aurélie (MCU-PH)

**GASTROENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE ; ADDICTOLOGIE** *5201*

BARTHET Marc (PU-PH)
BERNARD Jean-Paul (PU-PH)
BOTTA/FRIDLUND Danielle (PU-PH)
GEROLAMI-SANTANDREA René (PU-PH)
GRIMAUD Jean-Charles (PU-PH)
LAUGIER René (PU-PH)
SEITZ Jean-François (PU-PH)

DAHAN ALCARAZ Laetitia (MCU PH)
VITTON Véronique (MCU-PH)

**GENETIQUE** *4704*

BEROUD Christophe (PU-PH)
LEVY Nicolas (PU-PH)
MONCLA Anne (PU-PH)
SARLES/PHILIP Nicole (PU-PH)

BERNARD Rafaëlle (MCU-PH)
KRAHN Martin (MCU-PH)
NGYUEN Karine (MCU-PH)
TOGA Caroline (MCU-PH)
ZATTARA/CANNONI Hélène (MCU-PH)

**GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE ; GYNECOLOGIE MEDICALE** *5403*

AGOSTINI Aubert (PU-PH)
BOUBLI Léon (PU-PH)
BRETELLE Florence (PU-PH)
CRAVELLO Ludovic (PU-PH)
D'ERCOLE Claude (PU-PH)
GAMERRE Marc (PU-PH)

COURBIERE Blandine (MCU-PH)

**HEMATOLOGIE ; TRANSFUSION** *4701*

BONGRAND Pierre (PU-PH)
KAPLANSKI Gilles (PU-PH)
MEGE Jean-Louis (PU-PH)
OLIVE Daniel (PU-PH)
VIVIER Eric (PU-PH)

FERON François (PR) (69ème section)

BOUCRAUT Joseph (MCU-PH)
DEGEORGES/VITTE Joëlle (MCU-PH)
DESPLAT/JEGO Sophie (MCU-PH)
POMMIER Gilbert (MCU-PH)
ROBERT Philippe (MCU-PH)
TEXTORIS Julien (MCU-PH)
VELY Frédéric (MCU-PH)

BERAUD/JUVEN Evelyne (MCF) 65ème section)
BOUCAULT/GARROUSTE Françoise (MCF) 65ème section)

**MALADIES INFECTIEUSES ; MALADIES TROPICALES** *4503*

BROUQUI Philippe (PU-PH)
PAROLA Philippe (PU-PH)
STEIN Andréas (PU-PH)

LAGIER Jean-Christophe (MCU-PH)

**MEDECINE INTERNE ; GERIATRIE ET BIOLOGIE DU VIEILLISSEMENT ; MEDECINE GENERALE ; ADDICTOLOGIE** *5301*

BONIN/GUILLAUME Sylvie (PU-PH)
DISDIER Patrick (PU-PH)
DURAND Jean-Marc (PU-PH)
FRANCES Yves (PU-PH)
GRANEL/REY Brigitte (PU-PH)
HARLE Jean-Robert (PU-PH)
ROSSI Pascal (PU-PH)
SCHLEINITZ Nicolas (PU-PH
SERRATRICE Jacques (PU-PH)

*WEILLER Pierre-Jean (PU-PH) Surnombre*

DUMON-HUSSON Monique (PR associé Méd. Gén. à mi-temps)
FILIPPI Simon (PR associé Méd. Gén. à mi-temps)

ADNOT Sébastien (MCF associé Méd. Gén. à mi-temps)
CHEVALLIER Pierre-François (MCF associé Méd. Gén. à mi-temps)
GENTILE Gaëtan (MCF associé Méd. Gén. à mi-temps)
GUIDA Pierre (MCF associé Méd. Gén. à mi-temps)
RAKOTO Jean-Claude (MCF associé Méd. Gén. à mi-temps)

BLAISE Didier (PU-PH)
COSTELLO Régis (PU-PH)
CHIARONI Jacques (PU-PH)
GILBERT/ALESSI Marie-Christine (PU-PH)
MORANGE Pierre-Emmanuel (PU-PH)

VEY Norbert (PU-PH)

BACCINI Véronique (MCU-PH)
CALAS/AILLAUD Marie-Françoise (MCU-PH)
FRERE Corinne (MCU-PH
GELSI/BOYER Véronique (MCU-PH)
LAFAGE/POCHITALOFF-HUVALE Marina (MCU-PH)

POGGI Marjorie (MCF)

**MEDECINE LEGALE ET DROIT DE LA SANTE** *4603*

LEONETTI Georges (PU-PH)
PELISSIER/ALICOT Anne-Laure (PU-PH)
PIERCECCHI/MARTI Marie-Dominique (PU-PH)

BARTOLI Christophe (MCU-PH)

BERLAND/BENHAIM Caroline (MCF) (1ère section)
GIOCANTI Dominique (MCF) (1ère section)

**MEDECINE PHYSIQUE ET DE READAPTATION** *4905*

BENSOUSSAN Laurent (PU-PH)
DELARQUE Alain (PU-PH)

VITON Jean-Michel (PU-PH)

**MEDECINE ET SANTE AU TRAVAIL** *4602*

BOTTA Alain (PU-PH)

BERGE-LEFRANC Jean-Louis (MCU-PH)
LEHUCHER/MICHEL Marie-Pascale (MCU-PH)
SARI/MINODIER Irène (MCU-PH)

**NEPHROLOGIE** *5203*

BERLAND Yvon (PU-PH)
BRUNET Philippe (PU-PH)
BURTEY Stépahne (PU-PH)
DUSSOL Bertrand (PU-PH)
TSIMARATOS Michel (PU-PH)
VACHER-COPONAT Henri (PU-PH)

JOURDE CHICHE Noémie (MCU PH)

**NUTRITION** *4404*

**NEUROCHIRURGIE** *4902*

DARMON Patrice (PU-PH)
RACCAH Denis (PU-PH)
VALERO René (PU-PH)
*VIALETTES Bernard (PU-PH) Surnombre*

ATLAN Catherine (MCU-PH)
BELIARD Sophie (MCU-PH)

MARANINCHI Marie (MCF) (66ème section)

**ONCOLOGIE 65 (BIOLOGIE CELLULAIRE)**

CHABANNON Christian (PR) (66ème section)
SOBOL Hagay (PR)

**OPHTALMOLOGIE** *5502*

DENIS Danièle (PU-PH)
HOFFART Louis (PU-PH)
RIDINGS Bernard (PU-PH)

MATONTI Frédéric (MCU-PH)

**OTO-RHINO-LARYNGOLOGIE** *5501*

DESSI Patrick (PU-PH)
GIOVANNI Antoine (PU-PH)
LAVIEILLE Jean-Pierre (PU-PH)
NICOLLAS Richard (PU-PH)
THOMASSIN Jean-Marc (PU-PH)
TRIGLIA Jean-Michel (PU-PH)

DEVEZE Arnaud (MCU-PH)

REVIS Joana (MAST) (Orthophonie) (7ème Section)

**PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE** *4502*

DESSEIN Alain (PU-PH)
*DUMON Henri (PU-PH) en surnombre*
PIARROUX Renaud (PU-PH)

FARAUT Françoise (MCU-PH)
FAUGERE Bernard (MCU-PH)
FOBY/FRANCK Jacqueline (MCU-PH)
MARY Charles (MCU-PH)
RANQUE Stéphane (MCU-PH)
TOGA Isabelle (MCU-PH)

**PEDIATRIE** *5401*

BERNARD Jean-Louis (PU-PH)
DUFOUR Henry (PU-PH)
FUENTES Stéphane (PU-PH)
METELLUS Philippe (PU-PH)
REGIS Jean (PU-PH)
ROCHE Pierre-Hugues (PU-PH)
SCAVARDA Didier (PU-PH)

CARRON Romain (MCU PH)

**NEUROLOGIE** *4901*

ATTARIAN Sharham (PU PH)
AZULAY Jean-Philippe (PU-PH)
CECCALDI Mathieu (PU-PH)
FELICIAN Olivier (PU-PH)
NICOLI François (PU-PH)
PELLETIER Jean (PU-PH)
POUGET Jean (PU-PH)

AUDOIN Bertrand (MCU-PH)

**PEDOPSYCHIATRIE; ADDICTOLOGIE** *4904*

DA FONSECA David (PU-PH)
POINSO François (PU-PH)

**PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE - PHARMACOLOGIE CLINIQUE; ADDICTOLOGIE** *4803*

BLIN Olivier (PU-PH)
FAUGERE Gérard (PU-PH)
SIMON Nicolas (PU-PH)

BOULAMERY/VELLY Audrey (MCU-PH)
MICALLEF/ROLL Joëlle (MCU-PH)
VALLI Marc (MCU-PH)

**PHILOSPHIE** *17*

LE COZ Pierre (PR)

ALTAVILLA Annagrazia (MCF Associé à mi-temps)

**PHYSIOLOGIE** *4402*

BARTOLOMEI Fabrice (PU-PH)

CHAMBOST Hervé (PU-PH)
DUBUS Jean-Christophe (PU-PH)
*GARNIER Jean-Marc (PU-PH) surnombre*
GIRAUD/CHABROL Brigitte (PU-PH)
MICHEL Gérard (PU-PH)
REYNAUD Rachel (PU-PH)
SARLES Jacques (PU-PH)
SIMEONI Umberto (PU-PH)

ANDRE Nicolas (MCU-PH)
COZE Carole (MCU-PH)

**PSYCHIATRIE D'ADULTES ; ADDICTOLOGIE** *4903*

AZORIN Jean-Michel (PU-PH)
BAILLY Daniel (PU-PH)
LANCON Christophe (PU-PH)
NAUDIN Jean (PU-PH)

**PSYCHOLOGIE - PSYCHOLOGIE CLINIQUE, PCYCHOLOGIE SOCIALE 16**

AGHABABIAN Valérie (PR)

**RADIOLOGIE ET IMAGERIE MEDICALE** *4302*

BARTOLI Jean-Michel (PU-PH)
CHAGNAUD Christophe (PU-PH)
CHAUMOITRE Kathia (PU-PH)
DEVRED Philippe (PU-PH)
GIRARD Nadine (PU-PH)
GORINCOUR Guillaume (PU-PH)
JACQUIER Alexis (PU-PH)
MOULIN Guy (PU-PH)
PANUEL Michel (PU-PH)
PETIT Philippe (PU-PH)
VIDAL Vincent (PU-PH)

**REANIMATION MEDICALE ; MEDECINE URGENCE** *4802*

GAINNIER Marc (PU-PH)
GERBEAUX Patrick (PU-PH)
PAPAZIAN Laurent (PU-PH)
ROCH Antoine (PU-PH)

**RHUMATOLOGIE** *5001*

GUIS Sandrine (PU-PH)
LAFFORGUE Pierre (PU-PH)
PHAM Thao (PU-PH)
ROUDIER Jean (PU-PH)

CHAUVEL Patrick (PU-PH)
JAMMES Yves (PU-PH)
JOLIVET/BADIER Monique (PU-PH)
MEYER/DUTOUR Anne (PU-PH)

BARTHELEMY Pierre (MCU-PH)
BOULLU/CIOCCA Sandrine (MCU-PH)
BREGEON Fabienne (MCU-PH)
DADOUN Frédéric (MCU-PH) (disponibilité)
DEL VOLGO/GORI Marie-José (MCU-PH)
DELLIAUX Stéphane (MCU-PH)
GAVARET Martine (MCU-PH)
REY Marc (MCU-PH)
TREBUCHON/DA FONSECA Agnès (MCU-PH)

LIMERAT/BOUDOURESQUE Françoise (MCF) (40ème section)
RUEL Jérôme (MCF) (69ème section)
STEINBERG Jean-Guillaume (MCF) (66ème section)
THIRION Sylvie (MCF) (66ème section)

**PNEUMOLOGIE; ADDICTOLOGIE** *5101*

ASTOUL Philippe (PU-PH)
BARLESI Fabrice (PU-PH)
CHANEZ Pascal (PU-PH)
CHARPIN Denis (PU-PH)
REYNAUD/GAUBERT Martine (PU-PH)

GREILLIER Laurent (MCU PH)

**THERAPEUTIQUE . MEDECINE D'URGENCE; ADDICTOLOGIE** *4804*

AMBROSI Pierre (PU-PH)
BARTOLIN Robert (PU-PH)
VILLANI Patrick (PU-PH)

BANDINI/MOULY Annick (MCU-PH)

**UROLOGIE** *5204*

BASTIDE Cyrille (PU-PH)
*COULANGE Christian (PU-PH) Surnombre*
KARSENTY Gilles (PU-PH)
LECHEVALLIER Eric (PU-PH)
ROSSI Dominique (PU-PH)
*SERMENT Gérard (PU-PH) surnombre*

# REMERCIEMENTS:

Au président du jury:

**Professeur Gérard MICHEL**
**Professeur des Universités – Praticien Hospitalier**
**Chef du service d'Hématologie/Oncologie Pédiatrique de l'Hôpital de la Timone Enfants**

C'est dans votre service, il y a maintenant 3 ans, que j'ai été initiée à l'hématologie pédiatrique et que j'ai décidé d'en faire ma spécialité. Depuis, vos conseils précieux m'ont porté, tout au long de mon internat.

Toujours attentif et disponible au cours de ce travail malgré parfois l'éloignement géographique, vous avez veillé chaque fois à partager vos connaissances avec cette grande pédagogie qui vous est propre. C'est votre bienveillance mais aussi votre exigence qui m'ont donné chaque jour, l'envie de progresser.

Je vous remercie sincèrement, pour la richesse de votre enseignement, mais aussi votre soutien et vos encouragements qui me sont si chers.

Aux membres du jury:

**Professeur Hervé CHAMBOST**
**Professeur des Universités – Praticien Hospitalier**
**Service d'Hématologie et Oncologie Pédiatrique de l'Hôpital de la Timone Enfants**

Vous avez été le premier à m'encourager lors de ma toute première présentation de poster à la SFP, il y a maintenant quelques années. Je me souviens comme j'étais terrifiée et combien votre présence à mes cotés ainsi que votre soutien m'ont rassurés.

Je vous remercie pour vos encouragements tout au long de mon internat, votre gentillesse, votre disponibilité ainsi que la pertinence de tous vos conseils.

**Professeur Michel TSIMARATOS**
**Professeur des Universités – Praticien Hospitalier**
**Chef du service du service de Pédiatrie Multidisciplinaire, Hôpital de la Timone Enfants**

C'est un grand plaisir de te compter parmi les membres de ce jury.

Je garde un très bon souvenir de mon passage dans ton service et tenais à te remercier pour la qualité de ton enseignement au lit du patient, ta disponibilité, ton accessibilité ainsi que ton aide toujours donnée avec plaisir.

**Professeur Norbert VEY**
**Professeur des Universités – Praticien Hospitalier**
**Chef du département d'Hématologie-Oncologie 2 et du département d'Essais Thérapeutiques en Hématologie et Oncologie (ETOH) de l'Institut Paoli Calmettes**

De passage dans votre service il y a 2 ans, j'y reste maintenant encore profondément attachée. Pour l'accueil de cette équipe si chaleureuse, qui nous a offert une place parmi elle sans jamais la reprendre malgré le temps qui passe.

Pour les connaissances que vous avez partagé avec toujours tant de bienveillance, sur les hémopathies malignes bien sur, mais aussi sur ce monde mystérieux qu'était celui des essais thérapeutiques, transition passionnante entre la recherche fondamentale et la clinique.

Pour la confiance que vous m'avez accordé en me confiant cette belle étude que nous faisons ensemble, vos encouragements pour me faire participer, à mon niveau, aux différentes réunions et congrès en y présentant nos résultats, votre patience et votre soutien pour les « répétitions », votre présence si rassurante le jour J.

Pour votre disponibilité et votre accessibilité pour nos questions du quotidien. Je garde en mémoire ces boites de chocolats que vous offraient les patients et que vous montiez nous apporter pour nous donner des forces…

Pour toutes ces choses, merci.

**Docteur Claire GALAMBRUN**
**Praticien Hospitalier**
**Service d'Hématologie et Oncologie Pédiatrique de l'Hôpital de la Timone Enfants**

Il y a des personnes que l'on rencontre dans notre vie et qui nous marque. Tu en fais parti.

Cette relation si particulière que tu as avec les patients, basée sur la confiance et la sincérité, fait de toi ce médecin qu'on aspire tous à devenir. Tu as aussi été ma première confidente sur ma volonté de faire cette belle spécialité, et tu m'y as encouragé.

Tes vastes connaissances dans le domaine de la greffe ainsi que l'énergie et le temps que tu y consacres chaque jour, font de toi un modèle, pour moi bien sûr, mais aussi pour la plupart des internes qui passent dans le service.

Avec toute mon admiration et mon amitié.

Parce que c'est grâce à ceux qui nous entourent que l'on se construit jour après jour :

**A mes parents:** Pour votre amour, votre tendresse, votre soutien inconditionnel, vos conseils toujours précieux à mes yeux. Ces quelques années d'études n'auront pas été de tout repos. Merci pour tout ce que vous faites pour moi au quotidien, qui me donne le sentiment d'avoir des parents extraordinaires.

**A ma sœur:** Pour ta présence et ton soutien durant toutes ces années, la confiance que tu accordes à chacun de mes conseils de « grande sœur ». Je souhaite que notre belle complicité dure toujours.

**A ma grand-mère:** Tu nous as donné le gout et la valeur du travail. Merci pour tes encouragements et ton amour qui nous porte jours après jours.

**A mes amies :**

*Julie-Anne:* Pour ta présence et ton soutien aux différentes étapes de ma vie, merci pour cette belle amitié qui dure depuis toujours et à laquelle je tiens énormément.

*Alexandra:* Pour ton écoute, tes conseils, ta confiance et toutes ces petites attentions qui te caractérisent.

*Sabrina:* Pour ton énergie et ta bonne humeur permanente qui me donnent le sourire en toute circonstance.

*Déborah:* Pour ton coaching intensif de ma P1 à mon externat, toutes ces années ou tu as vécu par procuration chacun de mes examens, de mes cours, de mes stages à l'hôpital… en t'adaptant à mes horaires un peu bizarres (et mes retards systématiques)…

**Mes nombreux et nombreuses co-internes** pour tous les petits et grands moments partagés ensemble en particulier Colombe, Delphine et Nathalie, qui ont certes été des co-internes d'exception mais sont beaucoup plus que ca maintenant, et tous les **infirmiers/infirmières** pour leur accueil et leur confiance.

**Les enfants et leur famille:** La vie d'interne est parfois un peu difficile mais ils savent nous la rendre plus douce. Une petite pensée pour eux, pour l'entière confiance qu'ils nous accordent sans aucune hésitation, leur leçon de courage, leur joie de vivre et cette tendresse qu'ils partagent avec nous au quotidien.

**SOMMAIRE :**

PREAMBULE……..2

PARTIE I …….3

Etat actuel des greffes de cellules souches de sang placentaire non apparentées chez l'enfant

Sommaire……...4
Introduction……5
Avantages des greffes de sang placentaire…….6
Limites des greffes de sang placentaire……17
Conclusion……...…….25
Bibliographie……...…….26

PARTIE II : ARTICLE……..……..29

Peripheral blood cells chimerism after unrelated cord blood tranplantation in children: kinetics, predictive factors and impact on post-tranplant outcome

PARTIE III : ARTICLE (traduction française)……..54

Etude du chimérisme après greffe non apparentée de cellules souches de sang placentaire chez l'enfant :
Cinétique, facteurs prédictifs et impact sur le devenir post greffe

ABREVIATIONS……...83

SERMENT D'HIPPOCRATE……84

## PREAMBULE :

Les greffes de cellules souches hématopoïetiques (CSH) à partir d'une unité de sang placentaire non apparentée sont désormais une altenative thérapeutique pour les enfants qui nécessitent une greffe allogénique et qui n'ont pas dans leur fratrie de donneur HLA identique. Cette source de CSH est de plus en plus utilisée, dans le cadre de pathologies malignes comme non malignes, particulièrement chez l'enfant.

L'évaluation du chimérisme est un élément important du suivi des patients greffés. Il represente le pourcentage de cellules originaires du donneur parmi les cellules hématopoietiques de l'hôte. Il peut être réalisé sur sang périphérique par prélèvement sanguin ou sur moelle osseuse au cours d'un myélogramme. Plusieurs techniques permettent de le quantifier (VNTR, STR, Taqman) avec des seuils de sensibilité différents allant de 10 à 0,1%. Bien exploré dans les greffes de moelle osseuse ou de cellules souches de sang périphérique, le chimérisme après greffe de sang placentaire a été très peu étudié et va faire l'objet de ce travail.

La thèse présentée ci-après s'articulera en deux parties : une mise au point générale sur l'état actuel des greffes de cellules souches de sang placentaire non apparentées chez l'enfant suivi d'un travail original sur le chimérisme soumis au British Journal of Haematology.

# I- Etat actuel des greffes de cellules souches de sang placentaire non apparentées chez l'enfant

PARTIE I - Etat actuel des greffes de cellules souches de sang placentaire non apparentées chez l'enfant

Introduction……5

Avantages des greffes de sang placentaire……6

1) Des délais d'obtention plus rapides
2) Une probabilité supérieure de trouver un donneur
3) Un prélèvement sans risque pour la mère et le nouveau né
4) Des résultats identiques en terme de survie
5) Une probabilité de transmission virale (EBV, CMV) diminuée
6) Une disparité HLA donneur/receveur mieux tolérée
7) Un risque de Maladie du greffon contre l'hôte moindre
8) Un effet GVL (Graft versus Leukemia) conservé

Limites des greffes de sang placentaire……17

1) Une reconstitution hématologique plus lente
2) Une reconstitution immunitaire retardée
3) Une richesse cellulaire plus faible
4) Pas de possibilité de réaliser une immunothérapie adoptive

Conclusion……...…….25

Bibliographie……...26

## INTRODUCTION:

La greffe de cellules souches hématopoïétiques est le traitement de référence pour de nombreuses pathologies malignes et non malignes. Elle a pour but, à partir d'une cellule souche pluripotente, de reconstruire les différentes lignées hématopoïétiques faisant défaut dans certaines pathologies. Elle permet ainsi d'apporter au patient du tissu hématopoïétique sain dans le cadre d'hémopathies non malignes (hémoglobinopathies, Wiscott-Aldrich…), du tissu immunocompétent dans le cadre d'un déficit immunitaire (SCID, CID, CGD…), des cellules nécessaires à la correction d'un métabolisme cellulaire ou enzymatique déficient (lymphohistiocytoses, pathologie métabolique comme la maladie de Hurler…). En cas de pathologies malignes (leucémies, lymphomes), elle a un double intérêt : l'intensification du traitement, par une chimiothérapie lourde en permettant la sortie d'aplasie du patient, mais elle est surtout utilisée pour son effet allogénique (aussi appelé effet GVL pour « graft versus leukemia ») qui a pour but d'éradiquer la maladie résiduelle leucémique.

Le principal facteur qui détermine la prise ou le rejet de greffe est le système HLA (Human Leucocyte Antigen), qui est propre à chaque individu. En fonction de la compatibilité entre donneur et receveur, une greffe est dite géno-identique (fratrie HLA-identique), phéno-identique (donneurs volontaires non apparentés), haplo-identique (semi-identique apparentée). Il a été démontré que les meilleurs résultats sont obtenus lorsque donneurs et receveurs sont HLA-identiques et de la même fratrie. Cependant ce type de donneur n'existe que dans 20-25% des cas. Il a donc fallu trouver une alternative pour les patients qui nécessitent une greffe allogénique et n'ont pas, dans leur fratrie, de donneur HLA-identique. Les registres internationaux de donneurs volontaires de moelle osseuse permettent aujourd'hui d'identifier un donneur non apparenté HLA-identique dans 40% des cas, ce chiffre étant très variable selon l'origine du patient.

Depuis le début des années 90, le nombre de greffes de cellules souches hématopoïétiques (CSH) a fortement augmenté. D'abord par l'augmentation des indications de greffe grâce à la diminution de sa morbi-mortalité. En effet, l'amélioration des soins de support et des techniques biologiques de surveillance ainsi que la mise en place de traitements adaptés aux

patients les plus fragiles (conditionnements atténués) ont permis de considérablement réduire la mortalité iatrogène (appelée TRM pour « Transplant Related Mortality »). C'est surtout grâce à l'augmentation et la diversification des greffes non apparentées que de nombreux patients ont pu bénéficier de ce traitement (le nombre de greffes apparentées restant à peu près stable dans le temps).

Pourquoi la greffe de cellules souches de sang placentaire ?

Les cellules souches hématopoïétiques circulent dans le sang en période néonatale. Une partie du sang des nouveau-nés, celui qui est situé sur la face fœtale du placenta ainsi que le cordon ombilical, est inutilisé. Les lymphocytes T du nouveau-né sont plus tolérants que les lymphocytes T d'adulte car encore majoritairement naïfs. Ce sang placentaire peut donc être utilisé comme greffon en situation apparentée ou non apparentée. La première greffe de sang placentaire apparentée a été réalisée en 1988 par le Pr. E Gluckman, à l'Hôpital St Louis, sur un enfant de 5 ans atteint d'une maladie de Fanconi [1].

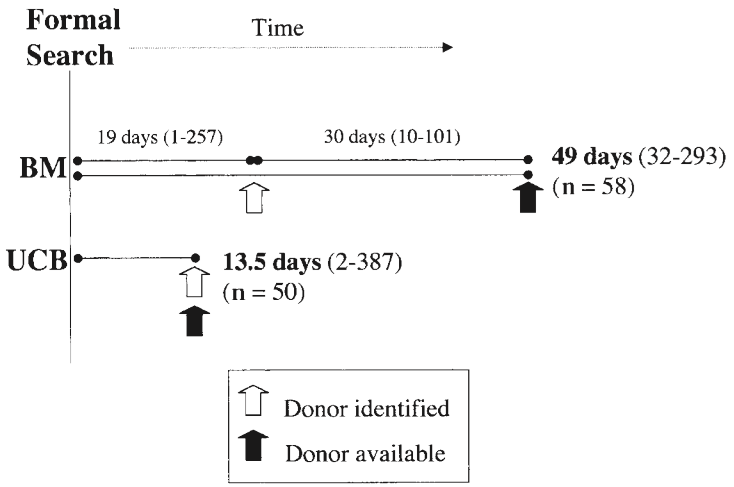
## I- AVANTAGES DES GREFFES DE SANG PLACENTAIRE :

### 1. Des délais d'obtention plus rapides :

Après le recueil, les unités de sang placentaires (USP) sont sélectionnées selon des critères de qualité stricts (volume minimum, cellularité, sérologies règlementaires…) puis traitées, congelées et enfin stockées dans les banques de sang placentaire. Elles sont donc disponibles, à tout moment et de manière durable. Par opposition, la disponibilité des greffons de cellules souches de moelle osseuse dépend du donneur (obligations professionnelles, état de santé, changement d'avis concernant le don…)

En 2002, Barker et al.[2] ont comparé, durant une année, la disponibilité et la rapidité d'obtention des greffons de sang placentaire ou de moelle osseuse (MO) non apparentés chez 108 patients. Le délai médian pour identifier un greffon de sang placentaire était de 13,5 jours, celui-ci étant dès lors, disponible. Pour identifier un donneur de moelle osseuse HLA-compatible, ce délai était de 19 jours. Cependant un temps additionnel médian de 30 jours

était alors nécessaire pour que le donneur soit définitivement recruté. La disponibilité d'une USP est donc significativement plus rapide que celle d'un donneur de moelle osseuse ($p<0,01$). Par contre le délai médian entre la disponibilité du greffon et la date de greffe est le même dans les 2 cas.

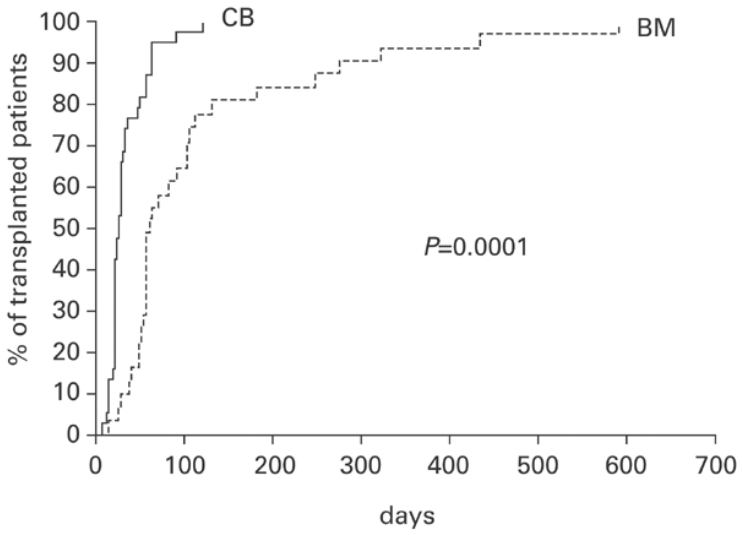



**Comparaison des délais d'identification et de la disponibilité d'une USP versus un donneur de MO :**

- Les USP sont disponibles dès leur identification
- Les greffes de moelle osseuse nécessitent un délai supplémentaire de 30 jours pour contrôler l'état de santé du donneur et obtenir son consentement
- Au total : différence significative ($p<0,01$)

*Barker et al. Biology of Blood and Marrow Transplantation, 2002*

JH Dalle et al. [3] confirment ces résultats en 2004 en rapportant sur 64 enfants greffés, un délai médian entre la décision de greffe et la greffe elle-même raccourci d'un mois dans les greffes de sang placentaires par rapport aux greffes de moelle osseuse ($p<0,0001$).




**Délai entre la décision de greffe et la greffe elle-même pour 36 greffes de cordon non apparentées versus 28 greffes de MO non apparentées :**

- Critères pour cordon : $\leq 2$ mismatch HLA et $\geq 2,5.10^7$ CNT congelées/kg de receveur

- Critères pour MO : HLA identique

Date de décision de greffe = USP et MO identifiées sur fichier → correspond à la date de demande du typage HLA de confirmation du donneur pour MO.

Au total : délai significativement plus court pour USP

*JH Dalle et al. BMT 2004*

Les unités de sang placentaire sont donc disponibles rapidement une fois identifiées. Cela représente un avantage considérable en particulier dans les cas où la rapidité de la greffe conditionne le pronostic (hémopathie maligne à un stade avancé).

2. Une probabilité supérieure de trouver un donneur :

Dans le cadre d'une greffe allogénique, il est nécessaire que donneur et receveur soient HLA-compatibles. Alors que 25% des receveurs ont un donneur géno-identique, 75% d'entre eux seront inscrits sur les fichiers nationaux et internationaux à la recherche d'un donneur non apparenté. La probabilité de trouver un donneur non apparenté sur le registre des donneurs volontaires est de 50% mais dépend surtout de l'origine ethnique du patient. D'après le rapport annuel 2012 de l'agence de biomédecine, 206 471 donneurs volontaires étaient inscrits sur le registre national France Greffe de Moelle le 31/12/2012 et 20,1 millions de donneurs volontaires étaient inscrits sur l'ensemble des registres internationaux. Cependant, dans ces registres, les ethnies caucasiennes sont sur-représentées, et la recherche d'un greffon lorsqu'elle concerne un patient originaire d'une minorité ethnique ou présentant un haplotype rare est souvent vaine. Dès 1995, Beatty et al.[4] avaient démontré que la probabilité de trouver un donneur HLA identique dépendait du polymorphisme génétique de chacun, et donc de nos origines. La présence de certains haplotypes particuliers selon les minorités ethniques rend la recherche de greffon HLA-identique plus difficile pour ces patients.

Les banques de sang placentaire ont pour objectif de développer quantitativement et qualitativement le registre des greffons non apparentés. Les collectes de sang placentaire sont réalisées dans les maternités des grandes villes. De par sa disparité culturelle, cette population permet d'augmenter la diversité génétique des unités dans le registre afin qu'un plus grand nombre de patients puisse bénéficier d'un greffon HLA compatible (et ce d'autant plus que cette source de cellules souches hématopoïétiques nécessite une compatibilité moindre).

Brown et al.[5] , ont analysé les 1500 premières unités de sang placentaire recueillies dans les banques de cordon de Londres, en 2000. Plus de 30% de ces USP étaient dérivées des minorités ethniques de Grande Bretagne comparé à 2% des individus recrutés sur le registre anglais de donneurs volontaires de moelle osseuse.

**Table 1** Ethnic origin of cord blood units and bone marrow donor (BMD) panel members

| *Ethnic group* | *Cord blood units n = 1500* | *BMD volunteers n = 750* |
|---|---|---|
| European Caucasoid | 62.3% | 98.0% |
| Non-European Caucasoid | 24.5% | 1.1% |
| African and Afro-Caribbean | 10.1% | 0.5% |
| Oriental | 1.9% | 0.4% |
| Other[a] | 1.8% | not reported |

**Comparaison des typages HLA** des USP issus des maternités de Londres versus des donneurs volontaires de moelle osseuse de Grande Bretagne.

*Brown et al., BMT 2000*

Le réseau français de sang placentaire comptait le 31/12/2012, 23 539 unités inscrites sur le registre et 666 000 unités de sang placentaire étaient stockées dans l'ensemble des banques internationales.

Les banques de sang placentaire permettent donc d'accroitre la probabilité de trouver un donneur, d'une part en augmentant le nombre de greffons disponibles mais surtout en favorisant la diversité génétique des greffons.

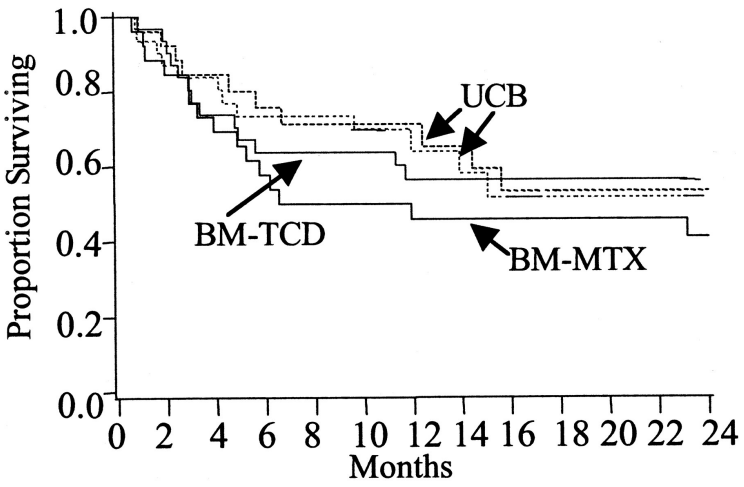
3. Un prélèvement sans risque pour la mère et le nouveau né :

Les prélèvements de cellules souches de la moelle osseuse réalisés chez les donneurs volontaires sains nécessitent soit une stimulation des précurseurs hématopoïétiques par un facteur de croissance (G-CSF en injection SC) pendant 5 jours avant la cytaphérèse, soit une anesthésie générale en cas de prélèvement médullaire direct. A l'inverse, la collecte de sang placentaire ne présente aucun risque, ni pour la mère, ni pour le nouveau-né. En effet, les cellules souches hématopoïétiques du sang foeto-placentaire sont situées dans le cordon ombilical et dans le placenta et seront prélevées par ponction de la veine ombilicale une fois le cordon clampé, c'est à dire dans les minutes qui suivent l'accouchement. Ce prélèvement est totalement indolore et ne modifie pas les gestes médicaux de l'accouchement.

4. Des résultats identiques en terme de survie :

Dès 2001, les premières études comparatives évaluant rétrospectivement la survie globale et la survie sans maladie après greffe de sang placentaire et greffe CSH de moelle osseuse sont publiées. Aucune différence significative n'est mise en évidence entre ces différents types de greffons à la fois chez l'enfant mais aussi chez l'adulte.

Deux équipes (une américaine et une européenne) publient simultanément et dans le même journal (Blood, Mai 2001) des résultats similaires. Barker et al.[6] , en étudiant des séries appariées, ne retrouvaient pas de différence significative concernant la survie globale entre des enfants greffés de manière non apparentée par une USP ou par des CSH de moelle osseuse (T-déplétée ou non) dans le cadre de pathologies malignes ou non malignes.




**Survie globale (courbes de Kaplan-Meier) par comparaison de séries appariées :**

- Greffe de sang placentaire (CSA+CTC) vs Greffe de MO HLA compatible (MTX + CSA)

  → 31 paires

  → Pas de différence significative (p=0,40)

- Greffe de sang placentaire (CSA+CTC) vs Greffe de MO HLA compatible avec T déplétion (CSA+CTC)

  → 26 paires

  → Pas de différence significative (p>0,80)

*Barker J N et al. Blood 2001*

En parallèle, Rocha et al.[7] retrouvaient eux aussi une survie globale identique (p=0,55) chez 541 enfants traités pour leucémie aigue, greffés de manière non apparentée, soit par une USP soit par CSH de moelle osseuse non manipulée alors que la mortalité est significativement supérieure dans les greffes T-déplétée (p=0,07).

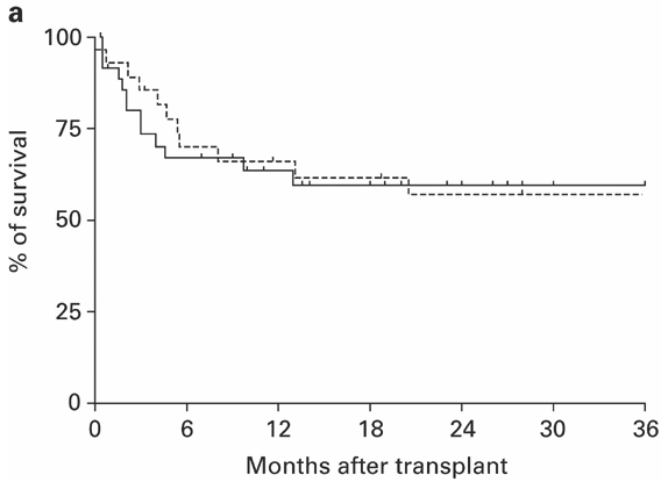
En 2004, la même équipe publie une étude similaire[8] cette fois faite chez l'adulte traité pour leucémie aigue . Ils comparent 98 patients greffés par une USP (dont 94% sont mismatch,

CNT infusées médianes : $2,3.10^7$/kg de receveur) à 584 patients greffés par CSH de moelle osseuse non apparentée HLA-identique. Aucune différence significative n'est rapportée par les auteurs, ni sur la survie globale (p=0,08) ni sur la survie sans maladie (p=0,06) bien que ces résultats soient à la limite de la signification.

Ces conclusions sont cependant tempérées par les résultats de Laughlin et al.[9], publiés dans le même journal (New England Journal of Medicine, Novembre 2004). Sur une population semblable (adultes traités pour leucémie aigue), la survie globale à 3 ans et la survie sans maladie à 3 ans sont significativement meilleures après greffe de moelle osseuse non apparentée HLA-identique comparées aux greffes de sang placentaire avec mismatch (p<0,001 et p=0,001 respectivement). Par contre, aucune différence n'est retrouvée entre les greffes de sang placentaire avec mismatch et les greffes de moelle osseuse avec mismatch (p=0,62 et p=0,69 respectivement).

Une méta-analyse comparant greffes non apparentées de sang placentaire versus de moelle osseuse, réalisée par Hwang et al. en 2007[10] confirme l'absence de différence significative sur la survie et la survie sans maladie à 2 ans post greffe à la fois chez l'adulte et chez l'enfant, dans le cadre de pathologies malignes comme non malignes.

Les résultats semblent meilleurs cependant chez l'enfant que chez l'adulte, avec des survies identiques entre greffe de sang placentaire non HLA-identique et greffe de moelle osseuse HLA-identique, particulièrement dans les hémopathies malignes, comme l'ont décrits JH Dalle et al. en 2004[3] .




**Comparaison de la survie à 3 ans post-greffe entre 36 enfants greffés par 1 USP non apparentée et 28 enfants greffés par MO non apparentée :**

Survie à 3 ans similaire: (p= NS)

- 59% dans USP
- 57% dans MO

*JH Dalle et al. BMT 2004*

En 2007, non seulement Eapen et al.[11] confirment ces résultats avec des survies sans maladie semblables après greffes de cordon non HLA-identiques 4 ou 5/6ème et greffes de moelle osseuse HLA-identiques (8/8ème), mais ils retrouvent, dans les greffes de cordon HLA-identiques, une survie sans maladie à 5 ans significativement meilleure (p=0,04).

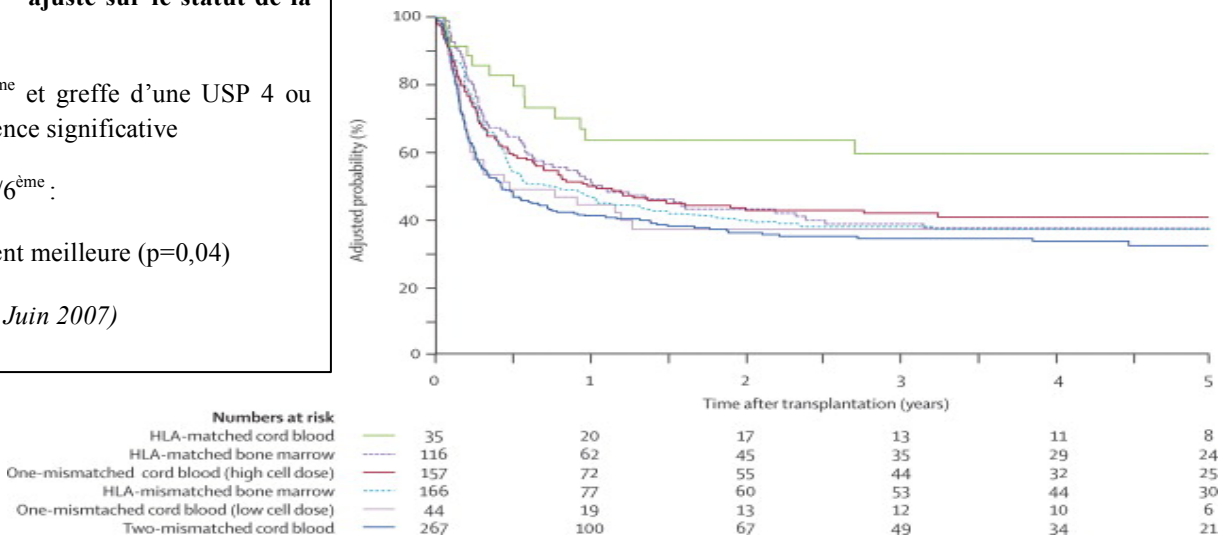
**Survie sans maladie (DFS) à 5 ans post-greffe de moelle osseuse HLA-id versus greffe de sang placentaire 4-5-6/6ème ajusté sur le statut de la maladie à la greffe :**

-Greffe de MO 8/8ème et greffe d'une USP 4 ou 5/6ème : pas de différence significative

-Greffe d'une USP 6/6ème :

-DFS significativement meilleure (p=0,04)

*(Eapen et al. Lancet, Juin 2007)*




Même si certains auteurs commencent à préconiser la greffe de sang placentaire comme source préférentielle de CSH chez l'enfant traité pour leucémie aigue[12] , la majorité des centres de greffe pédiatriques français continue de l'utiliser comme une alternative en cas d'absence de donneur phénoidentique identifié sur le registre international.

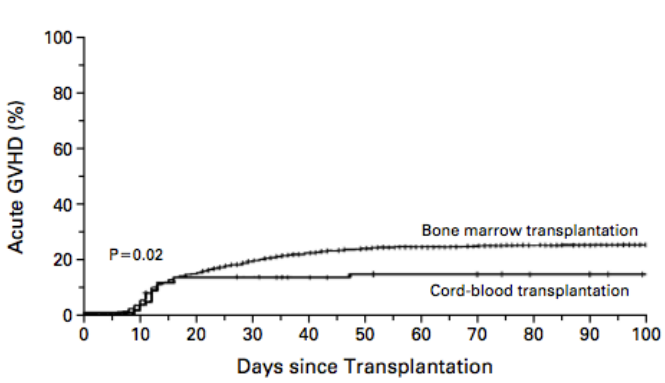
## 5. Une probabilité de transmission virale (EBV, CMV) diminuée :

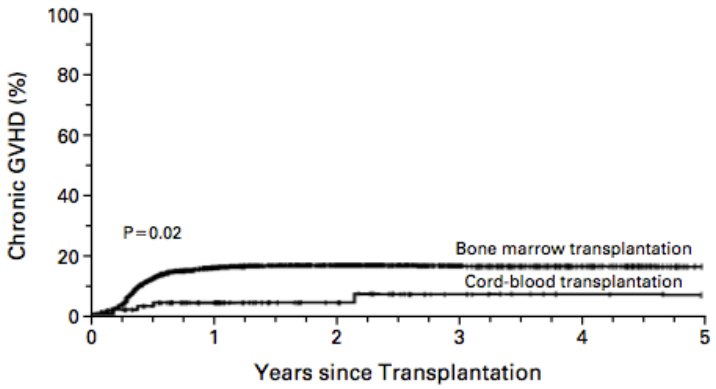
Le risque d'infection virale à EBV et CMV post-greffe est majoré chez les receveurs présentant une sérologie positive en pré-greffe. Cependant, une attention particulière est portée chez l'enfant, car contrairement à la population adulte, beaucoup ont des sérologies EBV et CMV pré-greffe négatives. Afin de diminuer la contamination virale due à la greffe, il est recommandé, dans la mesure du possible (c'est à dire pour une même disparité HLA), de proposer un greffon CMV et EBV négatif aux receveurs séronégatifs. Kögler et al.[13] ont démontrés sur 574 prélèvements de sang placentaire, que seulement 0,3% d'entre eux avaient

une PCR CMV positive contre 40% des donneurs volontaires de moelle osseuse. Les greffons de sang placentaire permettent donc de diminuer le risque de transmission virale, ce qui représente un avantage particulièrement important dans les populations pédiatriques.

6. Une disparité HLA donneur/receveur mieux tolérée :

Le moyen le plus fiable d'évaluer la tolérance de 2 types de greffon (et donc leurs propriétés immunologiques propres) est de comparer des greffes de sang placentaire et de moelle osseuse de compatibilité parfaitement identique. Rocha et al.[14] ont publié dans le NEJM en 2000 une étude comparant 113 enfants greffés par une USP apparentée avec 2052 enfants greffés par cellules souches de moelle osseuse génoidentiques. Les résultats retrouvent une incidence significativement plus faible de GVH aigue (p=0,001) et de GVH chronique (p=0,02) dans les greffes de sang placentaire apparentées. Cela démontre qu'à compatibilité strictement égale, la tolérance immunologique de la greffe de sang placentaire est meilleure.




**Comparaison de greffes apparentées : USP versus MO**

- Différence significative sur incidence cumulative de GVH aigue grade II-III-IV (p=0,02)
- Différence significative sur incidence cumulative GVH chronique (p=0,02)

*Rocha et al. NEJM 2000*

Dès 1997, Gluckman et al.[15] constataient l'absence, dans les greffes de sang placentaire non apparentées, de l'influence du nombre de disparités HLA donneur-receveur sur l'incidence de

GVH aigue post-greffe. En 2003, Michel et al.[16] confirment ces résultats sur 95 enfants greffés par une USP pour leucémie aigue myeloblastique.

La disparité HLA peut aussi être à l'origine de rejet de greffe et donc augmenter la mortalité iatrogène liée à la greffe (TRM).

Dans l'étude de Eapen et al. précédemment décrite[11] , les auteurs ne retrouvaient pas de différence significative sur l'incidence de GVH aigue (y comprit grade 3-4) ou chronique après greffe de moelle osseuse HLA identique et greffe de sang placentaire HLA identique ou mismatch dans les leucémies de l'enfant. Dans cette même étude, aucune différence n'était mise en évidence entre une greffe de sang placentaire 6/6$^{ème}$ ou 5/6$^{ème}$ associée à une quantité cellulaire injectée importante et une greffe de moelle osseuse HLA-identique en terme de mortalité précoce. Par contre, cette TRM est augmentée en cas de greffe de sang placentaire 5/6$^{ème}$ avec faible quantité cellulaire injectée (CNT injectées <0,3.10$^{8}$/kg de receveur) (p=0,045) ou avec une disparité HLA importante (4/6$^{ème}$ ) quelque soit la quantité cellulaire injectée (p=0,0003).

La disparité HLA reste donc un facteur pronostic majeur. Elle est cependant mieux tolérée que dans les greffes de moelle osseuse et peut, de plus, être compensée, dans une certaine mesure, par l'augmentation de la quantité cellulaire injectée.

### 7. Un risque de maladie du greffon contre l'hôte moindre :

La maladie du greffon contre l'hôte est dite « GvHD » pour Graft versus Host Disease. Lorsqu'elle est aigue, elle résulte de l'introduction, chez un hôte immuno incompétent présentant des antigènes d'histocompatibilité (majeurs ou mineurs) absents chez le donneur, de cellules immuno compétentes. L'orage cytokinique lié au conditionnement entraine une augmentation de l'expression des molécules du CMH et des molécules d'adhésion par les cellules de l'hôte. Au contact de ces allo-antigènes, les lymphocytes T matures contenus dans le greffon vont s'activer et proliférer. Il en résulte une destruction des tissus de l'hôte par les lymphocytes T cytotoxiques du donneur (réponse de type Th1) qui cible principalement la peau et le tube digestif. La GvHD chronique est davantage un désordre auto-immun, favorisé par GvHD aigue. Les dommages thymiques secondaires à la GvHD aigue conduiraient à un défaut des mécanismes centraux mais aussi périphériques d'acquisition de la tolérance.

L'absence de délétion des clones auto-réactifs serait responsable de cette GvHD alors dite chronique. GvHD et infections opportunistes sont responsables d'une considérable morbidité chez les patients greffés et les traitements qui traitent l'un des 2 exacerbent généralement le 2ème (par exemple les immunosuppresseurs mis en place dans la GvHD aigue retardent la reconstitution immunitaire favorisant ainsi les infections) [17].

Plusieurs études se sont intéressées à l'influence du type de greffe dont a bénéficié le patient sur la survenue de la maladie du greffon contre l'hôte.

En analysant des séries appariées sur l'âge, le diagnostic et le stade de la maladie chez des enfants atteints de pathologies malignes et non malignes, Barker et al.[6] ne mettent pas en évidence de différence significative sur l'incidence de GvHD aigue ou chronique entre greffe de sang placentaire présentant de 0 à 3 disparités HLA et greffe de moelle osseuse HLA-compatible pour les loci A-B et DRB1. Simultanément Rocha et al.[7] dans une étude multicentrique sur 541 enfants greffés pour pathologies malignes démontrent que ceux greffés avec une USP (avec de 0 à 3 mismatch HLA) ont un risque de GvHD aigue et chronique diminué comparé à ceux greffés par moelle osseuse non manipulée HLA-compatible pour la plupart d'entres elles ($p<0,01$ et $p=0,02$ respectivement).

Ces données suggèrent que malgré une disparité HLA supérieure, le risque de développer une GvHD aigue ou chronique après greffe de sang placentaire est plus faible qu'après greffe de moelle osseuse HLA-identique.

Ces résultats ont par la suite été confirmés par de multiples études [7–9,11,18] et il est maintenant admis que l'incidence et la sévérité de la GvHD est moindre dans les greffes de cordon par rapport aux greffes de moelle osseuse.

Pour expliquer ces résultats, 2 hypothèses ont été avancées :

- La faible quantité de lymphocytes T injectés lors d'une greffe de sang placentaire pourrait contribuer à la diminution de son alloréactivité. Cette hypothèse est appuyée par le fait qu'en T-déplétant une greffe de cellules souches de moelle osseuse on diminue le risque de GvHD post-greffe. Néanmoins, le nombre de lymphocytes T injectés lors d'une greffe de sang placentaire est de l'ordre de $8.10^6$/kg de receveur et nous savons aujourd'hui

qu'une GvHD peut être induite à partir de $1.10^6$ $CD3^+$/kg de receveur (voir moins en cas de disparités HLA) [19]

- Les lymphocytes issus du sang placentaire sont immatures, à la fois d'un point de vue phénotypique mais aussi fonctionnel. Cette hypothèse semble plausible puisque ces cellules proviennent du fœtus (et n'ont donc jamais été exposées à une stimulation antigènique). Il a été démontré in vitro, que leur stimulation entraine une faible réponse à l'IL2, au PHA et aux allo-antigènes [20,21]. La maladie du greffon contre l'hôte résulte de l'activation, l'expansion clonale puis la prolifération des lymphocytes T du donneur lorsque ceux-ci reconnaissent les allo-antigènes présentés par les cellules présentatrices d'antigènes de l'hôte et du donneur. Un défaut au niveau de l'une de ces fonctions est donc probable pour expliquer le plus faible taux de GvHD dans les greffes de sang placentaire.

### 8. Un effet GVL (Graft versus Leukemia) conservé :

Après avoir constaté la diminution de l'incidence et de la sévérité de la maladie du greffon contre l'hôte dans greffes de sang placentaire, de nombreuses équipes se sont demandées si cette plus faible allo-réactivité se traduisait également par une diminution de l'effet GVL (Graft versus Leukemia = Effet du greffon contre la maladie). En effet, dans les pathologies malignes, l'intérêt de la greffe de cellules souches hématopoïétiques repose sur l'effet allogénique de celle-ci, le but étant que le système immunitaire du donneur élimine les cellules leucémiques résiduelles du receveur, permettant ainsi d'éviter la rechute.

Rocha et al. démontrent qu'après 100 jours, le risque de rechute dans les pathologies malignes est comparable entre greffe de sang placentaire et greffe de moelle osseuse[7] . Ces résultats seront confirmés par la suite par différentes équipes [6,8,9,22].

Gluckman et al.[23] retrouvent sur 550 greffes de sang placentaires réalisées dans le cadre de pathologies malignes, que non seulement cet effet GVL est bien présent dans les greffes de sang de cordon mais qu'il est (comme c'est aussi le cas dans les greffes de moelle osseuse) d'autant plus important que la disparité HLA entre donneur et receveur augmente. En effet, à 1 an post greffe, les patients ayant été greffé par une USP contenant 1, 2 ou 3 disparités HLA

ont rechuté dans 14,3% des cas versus 28,8% pour les patients greffés sans disparité HLA (p=0,05).

L'effet GVL est donc bien conservé dans les greffes de sang placentaire, bien que cette dissociation entre effet GvHD et effet GVL ne soit pas encore bien comprise.

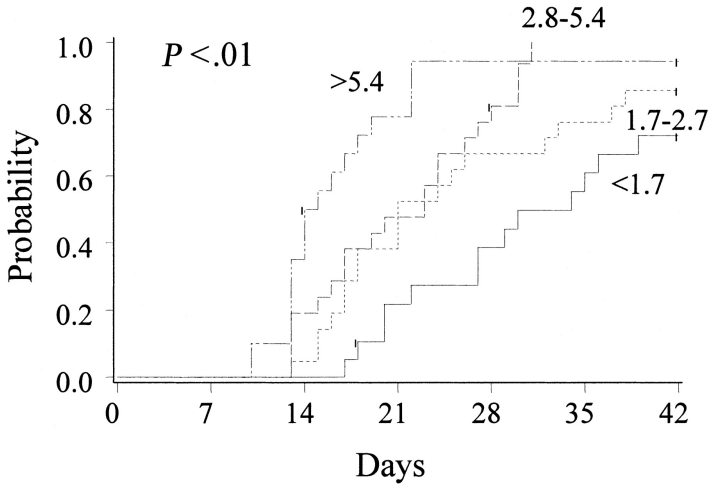
## II- LIMITES DES GREFFES DE SANG PLACENTAIRE :

### 1. Une reconstitution hématologique plus lente :

Plusieurs études ont démontré que la reconstitution hématologique après greffe de sang placentaire non apparentée était significativement plus lente qu'après greffe de moelle osseuse, à la fois sur la sortie des PNN mais aussi sur les plaquettes [6,7,9]. Le risque qui en résulte est bien sur au premier plan infectieux, mais aussi immunologique avec un risque d'allo-immunisation secondaire aux transfusions itératives.

Cependant, dès 1999, Locatelli et al.[24] rapportaient que la prise myéloïde était influencée par la quantité cellulaire du greffon. Sur les 102 enfants de leur étude greffés par une unité de sang placentaire pour leucémie aigue, ceux ayant reçu au moins $3,7.10^7$ CNT/kg de receveur avaient une prise myéloïde significativement supérieure (p=0,05).

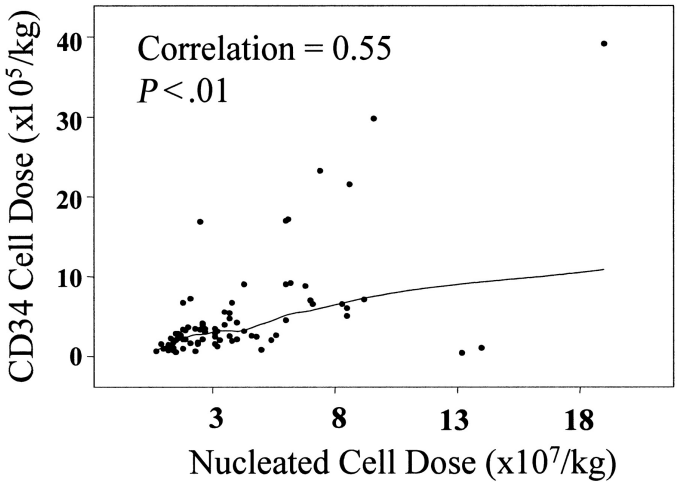
Ces résultats ont été confirmés en 2002 par Wagner et al.[25] qui précisent que plus que les CNT injectées, ce sont les $CD34^+$ injectées qui favorisent non seulement la prise de greffe mais aussi sa rapidité, et que ce nombre de cellules $CD34^+$ est corrélé au nombre de CNT injectées.




**Incidence cumulative de la prise myéloïde (PNN>500/mm$^3$) en fonction de la dose de $CD34^+$ injectées ($10^5$/kg de receveur)**

→ Chez 102 patients atteints de pathologies malignes et non malignes, greffés par 1 USP non apparentée.

*Wagner et al. Blood 2002*




**Corrélation entre CNT injectées ($10^7$/kg de receveur) et $CD34^+$ injectées ($10^5$/kg de receveur)**

→ Mise en évidence d'une corrélation linéaire positive

*Wagner et al. Blood 2002*

Gluckman et al.[23] retrouvent également ces résultats sur 550 patients greffés par une USP non apparentée pour pathologies malignes. Ils démontrent que la reconstitution hématologique (sur les PNN et les plaquettes) et sa rapidité est non seulement associée à une grande quantité de CNT congelées (au moins supérieure à $4.10^7$/kg) mais aussi à une faible disparité HLA entre donneur et receveur et à l'utilisation précoce de G-CSF.

La reconstitution hématologique est donc plus tardive dans les greffes de sang placentaire mais celle-ci peut être influencée à la fois par la quantité cellulaire injectée (CNT et $CD34^+$) mais aussi par la disparité HLA entre donneur et receveur.

2. Une reconstitution immunitaire retardée :

La reconstitution immunitaire post-greffe se fait en deux temps :

- La voie thymus-indépendante : la plus précoce. Elle correspond à l'expansion périphérique des lymphocytes T mémoires du donneur contenus dans le greffon. Elle permet une réponse rapide mais incomplète aux infections et a un répertoire restreint à celui du donneur.
- La voie thymus-dépendante : plus tardive. Elle correspond à la différenciation thymique des cellules souches et des précurseurs lymphoïdes du donneur dans le thymus du receveur. Elle génère des cellules T naïves capables de générer un répertoire complet et une réponse adaptée aux infections.

En 2000, Giraud et al.[26] ont décrit cette reconstitution immunitaire chez 12 enfants après greffe de sang placentaire non apparentée. Ils retrouvent une reconstitution B précoce, dès 6-9 mois post-greffe avec une normalisation des taux d'IgA et d'IgM dès 6 mois et des taux d'IgG dès 9 mois. La reconstitution NK est également rapide. Par contre, il persiste une lymphopénie T profonde jusqu'à un an post greffe, principalement sur les $CD8^+$ alors que les lymphocytes T $CD4^+$, moins touchés, sont supérieurs à 200/$mm^3$ dans la 1ère année pour tous les patients de l'étude (médiane à 5 mois).

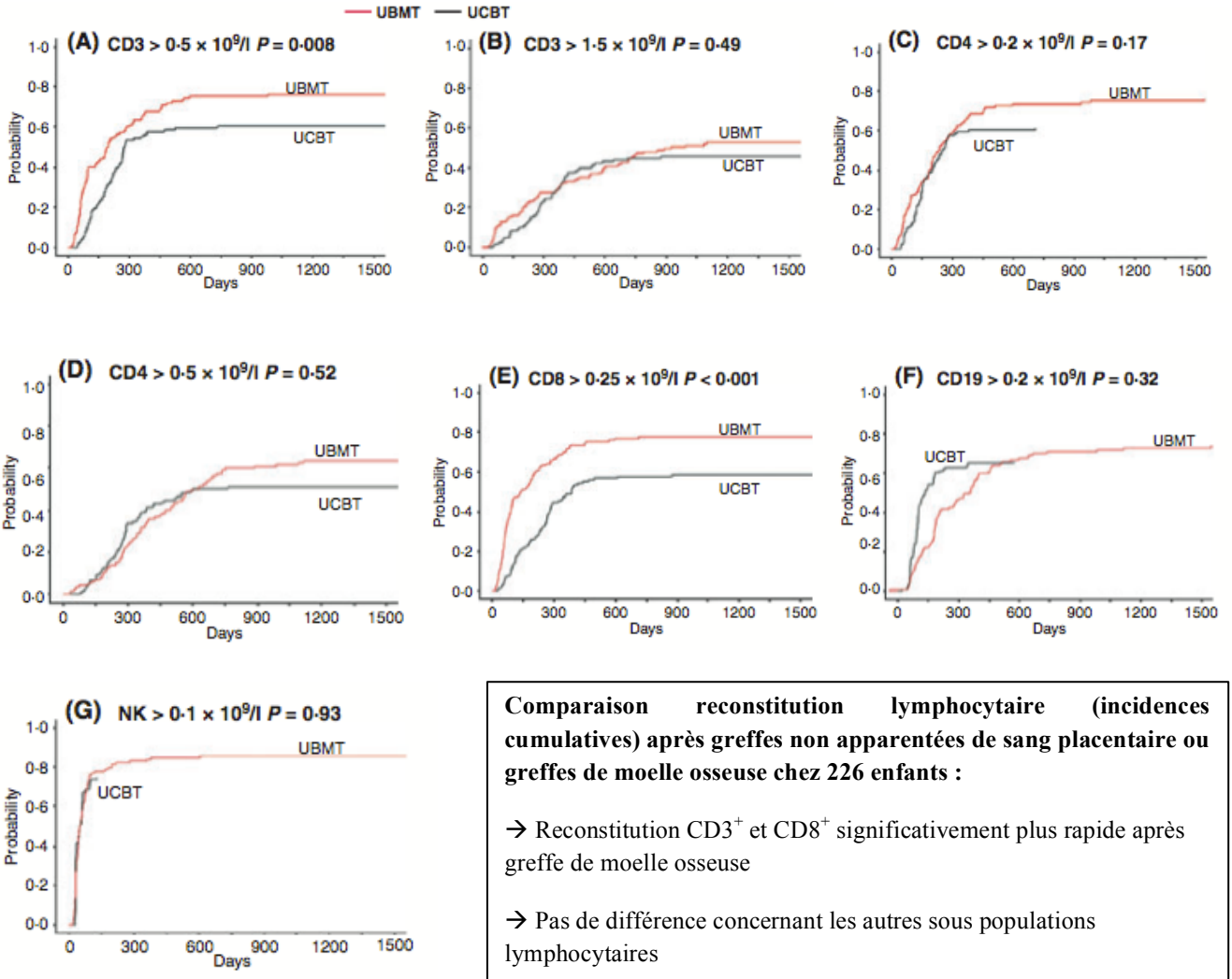
Plusieurs études rapportent une augmentation de la morbidité infectieuse dans les greffes de sang placentaire celle-ci étant attribuée à un retard de la reconstitution immunitaire par rapport aux greffes de moelle osseuse.

Dans une étude faite sur 57 patients adultes, Long et al.[27] retrouvent l'infection (qu'elle soit virale, bactérienne ou fongique) comme première cause de décès après greffe de cordon non apparentée. Toujours chez l'adulte, ces résultats sont confirmés par une étude prospective multicentrique[28] où sur 34 patients greffés par une unité de sang placentaire, 90% d'entre eux ont développé une infection parmi lesquels deux tiers ont présenté au moins trois infections dans les six premiers mois post greffe.

Ces résultats ne sont pas retrouvés chez l'enfant. Cette surmortalité infectieuse chez l'adulte pourrait être due à la dégénérescence thymique physiologique avec l'âge, retardant ainsi la reconstitution immunitaire après greffe et favorisant donc les complications infectieuses.

Chez l'enfant, plusieurs études ont comparé la reconstitution lymphocytaire après greffe de sang placentaire et greffe de moelle osseuse. En 2001, Moretta et al.[29] par comparaison de séries appariées, ne retrouvent pas de retard à la production des différents sous-types lymphocytaires après greffes de sang placentaire, ni de trouble de la fonction in vitro de ces lymphocytes. Cette reconstitution pourrait être, en partie influencée par la plus faible incidence (et sévérité) de GvHD chez les patients greffés par une unité de sang placentaire.

Renard et al.[30] comparent en 2011 la reconstitution des sous types lymphocytaires après greffe non apparentée de sang placentaire ou de moelle osseuse chez 226 enfants greffés pour pathologies malignes ou non malignes. Aucune différence significative n'est mise en évidence sauf pour la phase précoce de la reconstitution immunitaire avec une reconstitution T $CD8^+$ plus tardive.




**Comparaison reconstitution lymphocytaire (incidences cumulatives) après greffes non apparentées de sang placentaire ou greffes de moelle osseuse chez 226 enfants :**

→ Reconstitution $CD3^+$ et $CD8^+$ significativement plus rapide après greffe de moelle osseuse

→ Pas de différence concernant les autres sous populations lymphocytaires

*Renard et al. BJH 2011*

Cela pourrait être expliqué par le fait que le greffon étant d'origine placentaire, 90% des cellules qui le composent sont naïves (comparé aux greffons de moelle osseuse adulte qui contiennent des cellules mémoires)

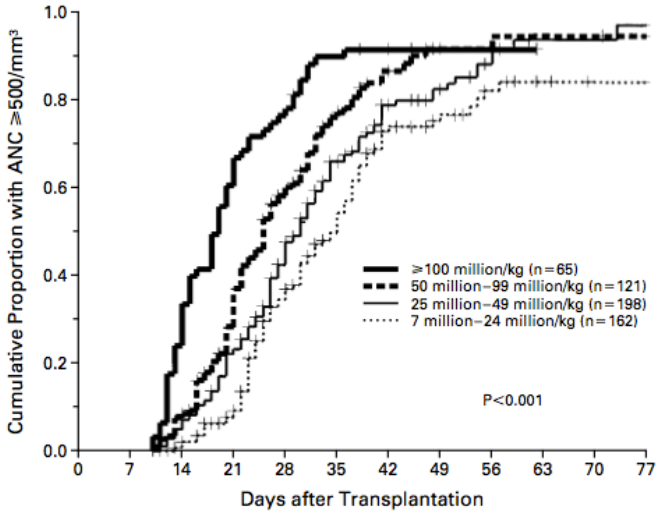
Il est intéressant de noter que bien que les infections soient plus fréquentes après greffes de sang placentaire (pas de transfert d'immunité par les lymphocytes T du greffon), la mortalité infectieuse est identique, chez l'enfant, entre les greffes de moelle osseuse et les greffes de sang placentaire[30,31] et la quantité cellulaire injectée et la durée de l'aplasie sont retrouvées comme facteur de risque de décès lié à l'infection[31].

Enfin, Niehues et al.[32] ont décrit trois facteurs favorisant la reconstitution T après greffe de sang placentaire chez l'enfant : les greffons apparentés, la quantité de CNT injectée, et la séropositivité CMV du receveur.

3. Une richesse cellulaire plus faible :

Dès 1997, Gluckman et al.[15] démontrent que la quantité cellulaire du greffon influence le devenir post greffe. En effet, les enfants ayant reçu plus de 3,7. $10^7$ CNT/kg (correspondant à la médiane de leur série) avaient une meilleure prise de greffe à J60 que les enfants ayant reçu un greffon moins riche. L'année d'après, Rubinstein et al.[18] confirment ces résultats sur 562 patients et constatent que les délais de reconstitution granuleuse sont plus courts lorsque la dose de CNT injectée/kg de receveur augmente. Il apparaît, dans leur étude, un effet seuil puisque l'incidence cumulée est la même à partir de 2,5. $10^7$ CNT injectées /kg.

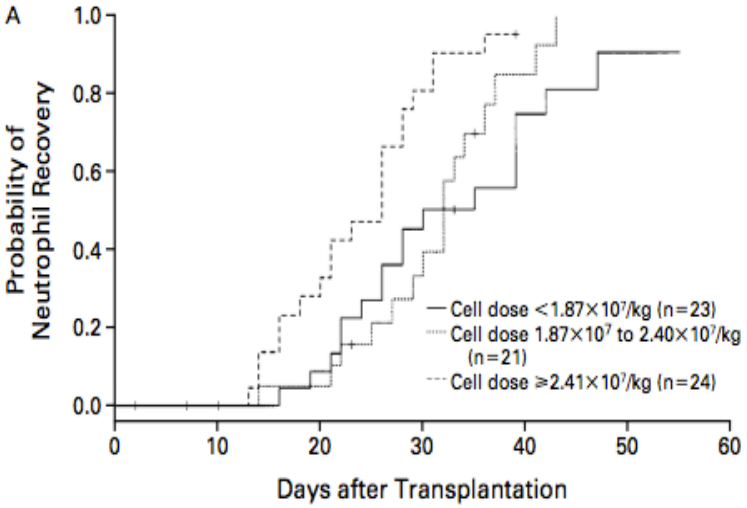
Ces résultats seront par la suite retrouvés par d'autres équipes[22] et dès 2001, Rocha et al.[7] recommandent dans le choix du greffon, une dose minimale de 3,7. $10^7$ CNT injectées/kg de receveur pour améliorer la probabilité de prise de greffe.




**Délai de reconstitution myéloïde (PNN>500/mm$^3$) par estimation de Kaplan-Meier en fonction de la dose de CNT injectée/kg de receveur dans greffes de sang placentaire chez 562 patients**

p< 0,001

*Rubinstein et al. NEJM 1998*




**Délai de reconstitution myéloïde en fonction de la dose de CNT congelées/kg de receveur**

Différence significative si CNT congelées < 1,87.$10^7$/kg

p= 0,003

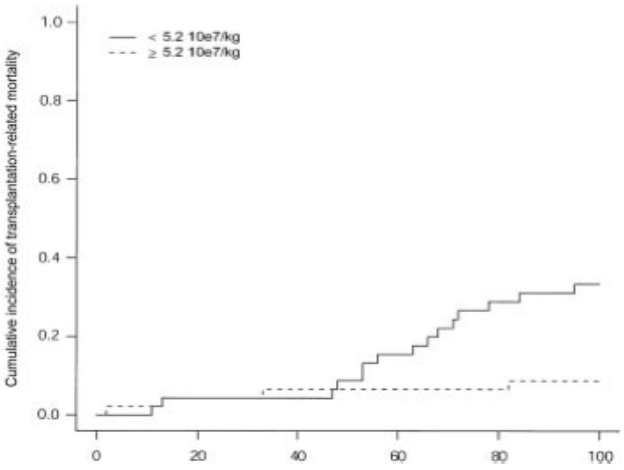
*Laughlin et al, NEJM 2001*

Au delà de la prise de greffe et de la reconstitution hématologique, la quantité cellulaire du greffon conditionne également la TRM et la survie globale. Sur 95 enfants greffés pour leucémie aigue myeloblastique, Michel et al.[16] démontrent que le seul facteur significativement associé à une augmentation de la TRM à J100 en multivarié, est la dose de CNT collectées/kg de receveur. En effet, la TRM qui était de 20% dans l'étude, chutait à 9% lorsque cette dose était supérieure à 5,2. $10^7$/kg (correspondant à la médiane de leur série). Enfin, comme cité précédemment, la richesse cellulaire du greffon influencerait aussi la reconstitution immunitaire post greffe.

Plus récemment, Wagner et al.[25] ont démontré sur 102 patients greffés pour pathologies malignes et non malignes que plus que les CNT injectées, c'était la dose de $CD34^+$ infusée/kg qui était le meilleur facteur pronostic. Dans leurs résultats, cette dernière apparaissait significativement liée à la fois à la prise de greffe, à la TRM et à la survie globale. Ils décrivent un seuil minimal de 1,7. $10^5$ $CD34^+$ injectées/kg et déconseillent l'utilisation des unités de sang placentaire plus pauvres car responsables d'une mortalité iatrogène plus élevée.

Autre fait intéressant (déjà suggéré par les études antérieures [18,25]) : l'impact de la quantité cellulaire est d'autant plus significatif que la disparité HLA entre donneur et receveur est élevée. Chaque mismatch HLA doit être compensé par une quantité cellulaire injectée plus importante afin qu'il n'impacte pas négativement la survie globale. La sélection du greffon doit donc être basée sur la dose de $CD34^+$ lorsque plusieurs unités sont disponibles avec une même disparité HLA de 2 mismatch entre donneur et receveur.

L'augmentation de la dose injectée de cellules $CD34^+$ peut donc compenser en partie la disparité HLA.

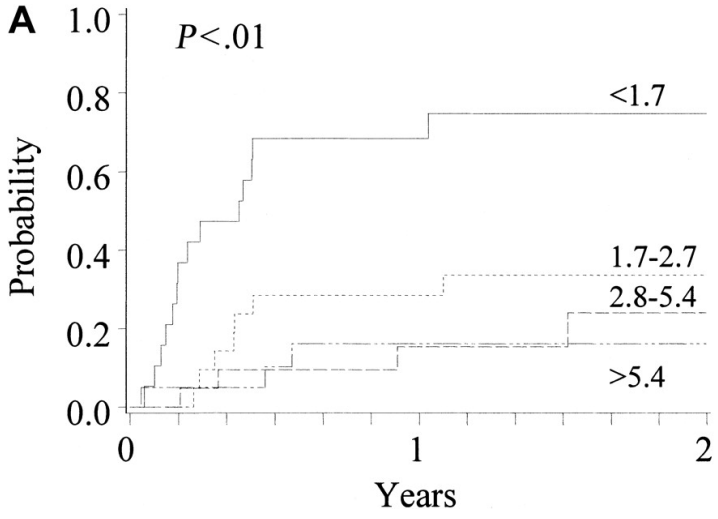



**Incidence cumulative de la TRM à J100 en fonction du nombre médian de CNT congelées/kg de receveur :**

→ Etude sur 95 enfants greffés par une USP pour LAM

→ p=0,01

*Michel et al. Blood 2003*




**Incidence cumulative de la TRM en fonction de la dose de $CD34^+$ injectée ($10^5$/kg de receveur) :**

→ Etude sur 102 patients greffés par 1 USP pour pathologies malignes et non malignes

→ p<0,01

*Wagner JE et al.* Blood 2002

La principale limite pour l'utilisation des unités de sang placentaire dans la greffe de cellules souches hématopoïétiques est donc la quantité cellulaire des greffons, puisque comme précédemment décrit, celle-ci influe directement la prise de greffe, la reconstitution hématologique et immunitaire post greffe, la TRM et la survie globale[11].

Pour cela, de nouvelles stratégies ont été mises en place parmi lesquelles la greffe de deux greffons de sang placentaire. Ce traitement à d'abord été réalisé sur 23 adultes et adolescents atteints d'hémopathies malignes en rechute[33] prouvant ainsi sa faisabilité. Puis en 2009, Verneris et al.[34] retrouvent dans une étude prospective randomisée multicentrique une influence du nombre de greffons sur la rechute à 5 ans en faveur des greffes doubles. Un essai prospectif multicentrique randomisé est actuellement en cours chez les enfants et jeunes adultes atteints de leucémie aigue en rémission complète afin de comparer la greffe d'une versus deux unités de sang placentaire (investigateur principal Pr G. Michel).

4. Pas de possibilité de réaliser une immunothérapie adoptive :

En cas de suspicion de rechute dans le cas de pathologies malignes, ou de mauvaise reconstitution immunitaire avec infection virale non contrôlée, il peut-être avantageux de réinjecter des lymphocytes du donneur (dit DLI pour « donor lymphocyte infusion ») afin de renforcer le pouvoir allogénique de la greffe ou d'améliorer la prise de greffe et donc la reconstitution immunitaire. Cette thérapie n'est pas possible en cas de greffe de sang placentaire car il n'y a plus aucun contact avec le donneur. Cependant d'autres solutions peuvent être mises en place (diminution immunosuppression, 2$^{nd}$ greffe…)

## CONCLUSION :

Les greffes de cellules souches de sang placentaire sont désormais une alternative reconnue pour le traitement de nombreuses pathologies malignes et non malignes. La greffe géno-identique reste recommandée en première intention lorsque que l'un des membres de la fratrie est HLA-identique. Lorsque cela n'est pas le cas, la recherche de donneur non apparenté doit se faire simultanément sur le fichier de donneurs volontaires de moelle osseuse et sur le registre de sang placentaire. En fonction du degré d'urgence, la greffe de moelle osseuse lorsqu'elle est HLA-identique $10/10^{ème}$ (c'est à dire identique sur les loci A-B-C-DQ-DR) reste préférentielle bien que certaines équipes commencent à recommander la greffe de sang placentaire comme source privilégiée de cellules souches hématopoïétiques pour les enfants atteints de leucémie aigue[12] .

Le choix du greffon se fait principalement sur la compatibilité HLA mais aussi sur la richesse cellulaire. En effet, la disparité HLA augmente le délai de prise de greffe, la TRM et la GvHD chronique alors même qu'elle diminue le risque de rechute. La quantité cellulaire injectée quant-à elle améliore la prise de greffe, la reconstitution hématologique et immunitaire post greffe, ainsi que la survie globale. Il est recommandé d'injecter au moins $3.10^7$ CNT/kg et $1.10^5$ $CD34^+$/kg.

Bien sur, la technique de greffe doit être adaptée aux cellules souches de sang placentaire (pas de méthotrexate pour la prévention de la GvHD etc…) et doit être gérée par des équipes spécialisées.

Les résultats obtenus chez l'enfant sont meilleurs que chez l'adulte. Ceux-ci pourraient être expliqués par l'importance de la quantité cellulaire injectée sur le devenir post greffe ainsi que par la fonction du thymus sur la reconstitution immunitaire.

Les greffes de sang placentaire présentent donc de nombreux avantages : les délais d'obtention du greffon sont plus courts, la disparité HLA entre donneur et receveur est mieux tolérée ce qui augmente les possibilités de greffon pour chaque patient, l'incidence et la sévérité de la maladie du greffon contre l'hôte est moindre bien que l'effet GVL soit conservé. Sa principale limite reste la faible quantité cellulaire injectée compte tenu de son impact sur pronostic post greffe. Les greffes doubles de sang placentaire ont pour but de palier à cet obstacle.

## BIBLIOGRAPHIE :


1. Gluckman, E. et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. N. Engl. J. Med. 321, 1174–1178 (1989).

2. Barker, J. N. et al. Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant. 8, 257–260 (2002).

3. Dalle, J. H. et al. Results of an unrelated transplant search strategy using partially HLA-mismatched cord blood as an immediate alternative to HLA-matched bone marrow. Bone Marrow Transplant. 33, 605–611 (2004).

4. Beatty, P. G., Mori, M. & Milford, E. Impact of racial genetic polymorphism on the probability of finding an HLA-matched donor. Transplantation 60, 778–783 (1995).

5. Brown, J., Poles, A., Brown, C. J., Contreras, M. & Navarrete, C. V. HLA-A, -B and -DR antigen frequencies of the London Cord Blood Bank units differ from those found in established bone marrow donor registries. Bone Marrow Transplant. 25, 475–481 (2000).

6. Barker, J. N. et al. Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. Blood 97, 2957–2961 (2001).

7. Rocha, V. et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. Blood 97, 2962–2971 (2001).

8. Rocha, V. et al. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. N. Engl. J. Med. 351, 2276–2285 (2004).

9. Laughlin, M. J. et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. N. Engl. J. Med. 351, 2265–2275 (2004).

10. Hwang, W. Y. K. et al. A meta-analysis of unrelated donor umbilical cord blood transplantation versus unrelated donor bone marrow transplantation in adult and pediatric patients. Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant. 13, 444–453 (2007).

11. Eapen, M. et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. Lancet 369, 1947–1954 (2007).
12. Gluckman, E., Rocha, V., EBMT Paediatric, Acute Leukemia Working Parties & Eurocord. Indications and results of cord blood transplant in children with leukemia. Bone Marrow Transplant. 41 Suppl 2, S80–82 (2008).

13. Kögler, G. et al. Hematopoietic transplant potential of unrelated cord blood: critical issues. J. Hematother. 5, 105–116 (1996).

14. Rocha, V. et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. N. Engl. J. Med. 342, 1846–1854 (2000).

15. Gluckman, E. et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. N. Engl. J. Med. 337, 373–381 (1997).

16. Michel, G. et al. Unrelated cord blood transplantation for childhood acute myeloid leukemia: a Eurocord Group analysis. Blood 102, 4290–4297 (2003).

17. Brown, J. A. & Boussiotis, V. A. Umbilical cord blood transplantation: basic biology and clinical challenges to immune reconstitution. Clin. Immunol. Orlando Fla 127, 286–297 (2008).

18. Rubinstein, P. et al. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. N. Engl. J. Med. 339, 1565–1577 (1998).

19. Gluckman, E. Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation. Exp. Hematol. 28, 1197–1205 (2000).

20. Harris, D. T. et al. Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89, 10006–10010 (1992).

21. Takahashi, N., Imanishi, K., Nishida, H. & Uchiyama, T. Evidence for immunologic immaturity of cord blood T cells. Cord blood T cells are susceptible to tolerance induction to in vitro stimulation with a superantigen. J. Immunol. Baltim. Md 1950 155, 5213–5219 (1995).

22. Laughlin, M. J. et al. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. N. Engl. J. Med. 344, 1815–1822 (2001).

23. Gluckman, E. et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. Exp. Hematol. 32, 397–407 (2004).
24. Locatelli, F. et al. Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord-Cord Blood Transplant Group. Blood 93, 3662–3671 (1999).

25. Wagner, J. E. et al. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. Blood 100, 1611–1618 (2002).

26. Giraud, P. et al. Immune reconstitution and outcome after unrelated cord blood transplantation: a single paediatric institution experience. Bone Marrow Transplant. 25, 53–57 (2000).

27. Long, G. D. et al. Unrelated umbilical cord blood transplantation in adult patients. Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant. 9, 772–780 (2003).

28. Cornetta, K. et al. Umbilical cord blood transplantation in adults: results of the prospective Cord Blood Transplantation (COBLT). Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant. 11, 149–160 (2005).

29. Moretta, A. et al. Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation. Exp. Hematol. 29, 371–379 (2001).

30. Rénard, C. et al. Lymphocyte subset reconstitution after unrelated cord blood or bone marrow transplantation in children. Br. J. Haematol. 152, 322–330 (2011).

31. Parody, R. et al. Severe infections after unrelated donor allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adults: comparison of cord blood transplantation with peripheral blood and bone marrow transplantation. Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant. 12, 734–748 (2006).

32. Niehues, T. et al. Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children -- a Eurocord analysis. Br. J. Haematol. 114, 42–48 (2001).

33. Barker, J. N. et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. Blood 105, 1343–1347 (2005).

34. Verneris, M. R. et al. Relapse risk after umbilical cord blood transplantation: enhanced graft-versus-leukemia effect in recipients of 2 units. Blood 114, 4293–4299 (2009).

# II- ARTICLE :

# Peripheral blood cells chimerism after unrelated cord blood tranplantation in children: kinetics, predictive factors and impact on post-tranplant outcome.

PARTIE II - ARTICLE :

Peripheral blood cells chimerism after unrelated cord blood tranplantation in children:
kinetics, predictive factors and impact on post-tranplant outcome

Summary ……..……..……31

Introduction ……...…….32

Patients and methods…….....……....33

1) Patients selection criteria
2) Blood chimerism
3) Cord blood transplant selection
4) Statistical methods

Results ……..……35

1) Patients characteristics and main post transplant outcomes
2) Cumulative incidence of donor chimerism occurrence, overall description
3) Predictive factors for donor chimerism
4) Predictive factors for hematologic recovery
5) Influence of complete donor chimerism (>99.9%) on the main clinical outcome after UCBT
6) Influence of first month chimerism on hematologic recovery

Discussion ……..……...……38

Tables and figures…….…….……41

Supplemental files…...……...……..…….……..47

Bibliography……..…….……...50

## SUMMARY :

The purpose of this study was to describe kinetics of complete donor chimerism occurrence (cDC, >99.9% donor) after unrelated cord blood transplantation (UCBT), to identify its predictive factors and its impact on post-transplant outcome. Ninety-four children who received single UCBT after myeloablative conditioning regimen had blood chimerism evaluation at predefined post-transplant dates, using a real-time PCR method with 0.1% sensitivity. Cumulative incidence of c-DC at 1 year post-transplantation was 61.8%. Three predictive factors were identified in multivariate analysis. History of malignant disease ($p=0.03$), older age (above 2.16 years, the first quartile of age, $p=5.5x10^{-3}$) and higher level of cord/recipient HLA mismatch (4/6 vs 5-6/6, $p=8.7x10^{-4}$) increased the probability of post-transplant c-DC. Although graft cell dose had a strong impact on haematological recovery, it did not apparently influence c-DC occurrence. Early c-DC (i.e. more than 99.9% donor chimerism on D15-D30 post transplant) appeared useful to predict engraftment ($p=3x10^{-3}$) as well as acute and chronic Graft-vs-Host Disease (GvHD). Severe acute or chronic GvHD never occurred in patients with a ≤99.9% DC, suggesting than even minimal residual host haematopoiesis is associated with a very low risk of GvHD after UCBT.

**KEYWORDS**: Chimerism, unrelated cord blood transplantation, childhood, HLA compatibilty, GvHD.

## INTRODUCTION:

Evaluation of peripheral blood cells chimerism is an important component of patients' follow-up after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). Real-time quantitative polymerase chain reaction currently allows post-transplant detection of donor and/or host genomic specific markers in the host nucleated blood cells with a 0.1% sensibility (Alizadeh et al., 2002). In the context of bone marrow or peripheral blood transplantation, many studies have highlighted that the level of blood cells donor chimerism influences the occurrence of graft versus host disease and, in the case of patients with malignant diseases, the risk of disease relapse (Bader et al., 2004a; Lamba et al., 2004; Rupa-Matysek et al., 2011; Saito et al., 2008; Svenberg et al., 2009). During the two last decades, the use of unrelated umbilical cord blood (UCB) as an alternative source of HSCT has increased substantially, especially for children (Barker et al., 2011; Eapen et al., 2007; Gluckman et al., 2004; Rocha et al., 2001). However, data on chimerism after UCB transplantation are very scarce (Berglund et al., 2012; Moscardó et al., 2009; Prasad et al., 2008) and the published studies did not uniformly use real-time quantitative polymerase chain reaction (PCR).

We present here a cohort of 94 children who received UCBT after myelo-ablative conditioning regimen and had longitudinal chimerism follow-up at predefined post-transplant date, using real-time quantitative PCR. This allows us to describe kinetics of complete donor chimerism occurrence after UCBT, its predictive factors and its impact on hematological recovery, GvHD, transplant-related mortality, relapse and overall survival.

## PATIENTS AND METHODS :

1. Patients selection criteria:

This study was prospectively conducted between 2001 and 2010 in a single french children transplant center. All children under 18 years of age who received a first single unrelated cord blood transplantation (UCBT) after myeloablative conditioning (MAC) for either a non-malignant disorder or a malignant disease in complete remission were eligible, except those transplanted for severe combined immunodeficiency. Ninety-four children met the inclusion criteria and all were included in the chimerism study. Informed consent was obtained from the parents.

2. Blood chimerism

- Definition:

The primary endpoint of our study was the occurrence of a complete donor chimerism (cDC) over time: cDC was reached when more than 99.9% of peripheral blood nucleated cells were from donor origin. Additionally, a secondary endpoint was defined which also included near-complete donor chimerisms (n-cDC). This secondary endpoint was achieved when more than 99% nucleated blood cells were from donor origin.

- Quantification:

Thirty one bi-allelic short deletions or insertions sequence polymorphisms were used as specific genetic markers for initial primer screening and quantitative chimerism, with a detection limit of 0.1% marker-specific cells (Alizadeh et al., 2002). Once informative assays were identified in the screening test, one or more of these assays were selected to quantify the percentage of DNA representative of a single genome of interest in a chimeric DNA sample, using an established relative quantification method for real-time PCR (Livak and Schmittgen, 2001). All samples were analyzed in duplicate by ABI 7500 Real Time PCR system.

- Evaluation time:

For each patient, we evaluated post-transplant blood chimerism at predefined dates: $D_{+15}$, $D_{+30}$, $D_{+60}$, $D_{+90}$, $D_{+120}$, $D_{+180}$, 1 year, 1 year and a half, 2 years, 2 years and a half, 3 years. The cumulative incidence of donor chimerism occurrence over time was then calculated.

Children without any blood reconstitution at a given date were considered to have a 0% donor chimerism. In addition, we defined the concept of early chimerism, which was the highest donor chimerism during the first month following the transplant.

3. Cord blood transplant selection:

HLA compatibility between recipient and cord blood transplant was established on 6 HLA antigens/alleles (HLA-A, -B, -DR). CB units were selected following HLA matching at antigen level (low or intermediate resolution) for HLA-A and -B and allele level matching for HLA-DRB1.

A cord blood unit was considered adequate for transplantation if it was 4 to 6/6 HLA identical with the patient and contained more than 3 x $10^7$ collected nucleated cells per Kg recipient. After thawing, the infused transplanted cell doses were evaluated by the total nucleated cell count as well as by CD34+ and CD3+ cells counts.

4. Statistical methods:

Occurrence of donor chimerism was analyzed through the use of cumulative incidence curves for estimating incidence over time (Gooley et al., 1999). We considered as competing events either relapse for malignant disease or death for malignant and non-malignant diseases. Fine and Gray model was used to assess prognostic factors (Fine, 2001). Covariates tested in the multivariate analysis as potential prognostic factors were the following: age at transplant (first included as a continuous variable and then grouped into quartiles), malignant *vs* non-malignant, total body irradiation (yes *vs* no), HLA compatibility between donor and recipient (4/6 *vs* 5-6/6) and graft cell dose per kg of recipient weight. Infused graft cell dose was described by 3 variables: total nucleated cell count, CD34+ and CD3+ cell dose. Therefore the influence of transplant cell dose was investigated by performing 3 different multivariate analyses, each of these analyses using one of the variables described above. We present the multivariate results with their levels of statistical significance (*p*), their hazard ratio (HR), and the 95% confidence interval of their hazard ratio (IC95%). Other post-transplant outcomes evaluated in this study were graft failure, autologous recovery (more than 80% blood cells

from recipient origin), GvHD, relapse risk, transplant-related mortality (TRM), overall survival, neutrophil recovery and platelet recovery.

## RESULTS:

1. Patients characteristics and main post transplant outcomes :

Patients characteristics and main post transplant outcomes are detailed in table 1. Median age of the 94 children was 6.3 years old (IQR: 2.16-9.85). Sixty-nine had a malignant disease in complete remission and 25 a non-malignant disease. The HLA donor/recipient compatibility was 4/6 for 42.6%, 5/6 for 44.7%, and 6/6 for 12.8% of the patients. 49 children received TBI during their conditioning as opposed to 45 who did not. Median infused cell dose was 5.78 x $10^7$/kg for total nucleated cells and 1.7 x $10^5$/kg for CD34+ cells. GvHD prophylaxis of all patients consisted of cyclosporine A, steroid and antithymocyte globulin, 2.5 mg/kg/day x 3 days pre-transplant (rabbit ATG, Thymoglobuline®, Genzyme, France)

Relapse risk, TRM at D100 and overall 5 years survival are 27.5%, 5% and 68%, respectively. For 11 patients (11.7%), we observed a graft failure or an autologous recovery. In 24 patients (25.5%), the evolution was complicated by an acute GvHD ≥2 and for 8 of them by a severe acute GvHD (≥3). Among the 86 children that could be evaluated at D100, 10 (11.6%) developed a chronic GvHD.

2. Cumulative incidence of donor chimerism occurrence, overall description:

Figure 1 shows the occurrence probabilities of cDC (>99.9% donor chimerism) and n-cDC (>99% donor chimerism) over time, with relapse and TRM considered as the two potential competing risks. The cumulative incidence one year after transplant was 61.8% (+/- 5,2%) for cDC, and 81.9% (+/- 4,5%) for n-cDC.

3. Predictive factors for donor chimerism:

Table 2 presents the results of the multivariate analysis. The significant predictive factors that increase the probability of post-transplant cDC (>99.9% donor chimerism) were a history of malignant disease (p=0.03), an older age at transplant ($p=2.9 \times 10^{-3}$) and a higher level of HLA mismatch between graft and recipient ($p=8.7 \times 10^{-4}$). As shown in figures 2A-C, cumulative incidences of cDC at 1 year post-transplant were 72.5% for malignant disease versus 31.2% for non malignant disease. It was 23.6% for children less than 2.16 year-old (first quartile of age) compared to 67.9%, 71.4% and 83.6% for the subsequent age quartiles and 83.6% for 4/6 HLA compatibility compared to 48.2% for 5/6 or 6/6 HLA compatibility. By contrast, TBI and infused CD34+ cells dose did not significantly influence the probability of post-transplant cDC in the multivariate analysis.

The same factors also proved significant in explaining the occurrence of a >99% donor chimerism. Replacing the CD34+ cell dose in the multivariate analysis by other cell dose evaluations such as total infused nucleated cell count and CD3+ cell dose per kg of recipient weight did not substantially change the results (see table 2bis and 2ter in the supplementary files). In these models, the transplanted cell dose was not a predictive factor and the same significant factors were found except that the influence of diagnosis on cDC and the influence of age at UCBT on a >99% donor chimerism did not reach the level of statistical significance.

4. Predictive factors for hematologic recovery:

We conducted the same multivariate analysis in order to identify the predictive factors for a hematopoietic recovery after transplant (PNN>0.5 giga/l and platelets>50 giga/l). Competing risk for haematological recovery were again TRM and relapse. The results are detailed in table 3. Predictive factors for hematological recovery were very different from those described above for donor chimerism. As expected, the most significant factor for haematological recovery was the infused CD34+ cell, total nucleated cell and CD3+ doses per kg of recipient weight (see also tables 3bis and 3ter in the supplemental files).

5. Influence of complete donor chimerism (>99.9%) on the main clinical outcome after UCBT:

We evaluated the association between cDC (>99.9% donor chimerism) and several post-transplant outcomes (Table 4). Patients who achieved cDC, any time after transplant, had a significantly higher risk of acute and chronic GvHD. On the other hand, none of the patients who never achieved post-transplant cDC developed severe acute GvHD or chronic GvHD. Achieving cDC during the first month post-UCBT was also a strong predictive criteria for acute and chronic GvHD. Among 57 children who had 99.9% or less donor chimerism during the first post-transplant month, only one experienced further grade 3-4 acute GvHD. Additionally, among children who achieved post-transplant cDC during the first post-UCBT month, none experienced graft failure or autologous reconstitution later on. At last, we were unable to detect any significant relationship between complete donor chimerism and relapse, TRM or overall survival.

6. Influence of first month chimerism on hematologic recovery:

Finally, we assessed whether there was a significant relationship between early chimerism (i.e. the higher donor chimerism observed during the first post-UCBT) and hematological recovery. Figure 3A shows the cumulative incidence of PNN recovery (PNN>0.5 giga/l) depending on whether or not a early cDC chimerism occurred. Figure 3B displays the same feature according to occurrence of early > 99% donor chimerism. We found that early cDC favourably was correlated to PNN recovery. However, no significant relationship was found between early chimerism and platelet recovery.

## DISCUSSION:

The aim of our study was to describe the kinetics of complete donor chimerism occurrence after UCBT, to identify its predictive factors, as well as its impact on major post-transplant outcomes. For this purpose, we constructed cumulative curves for estimating complete donor chimerism occurrence over time and multivariate models of potential predictive factors. Three predictive factors for complete chimerism were identified in this study: a history of malignant disease, an older age at transplant and a higher level of HLA mismatch between graft and recipient.

Children with a non-malignant disease achieve less frequently complete donor chimerism after UCBT than children with malignant disease. This feature has been already described after bone marrow or peripheral blood stem cell transplantation (Park et al., 2011; Svenberg et al., 2009) and can be in part explained by the lack of prior chemotherapy in non-malignant diseases. Indeed, in the context of malignant diseases, several studies have suggested that the amount of chemotherapy given before HSCT influences post-transplant donor chimerism (Berglund et al., 2012; Mohty et al., 2007; Saito et al., 2008). Berglund et al. also suggested that a history of malignant disease increases the probability of complete donor chimerism in their study of 50 UCBT, although this did not prove statistically significant in their multivariate analysis (Berglund et al., 2012). In addition to the absence of prior chemotherapy, other factors such as young age and conditioning regimen without TBI may also explain the low probability of complete donor chimerism in patients with non malignant disease (Stikvoort et al., 2013). In the largest study of transplantation for Hurler syndrome, median age at transplant was 16.7 months and near all children received a Busulfan-based myeloablative conditioning regimen (Boelens et al., 2013). In the 10/10 HLA matched sibling and unrelated donor setting, mixed chimerism (i.e. less than 95% donor) was seen in 30 to 50% of these young children. Interestingly in the same study, mixed chimerism was less frequent after UCBT and although the impact of HLA-mismatch level on chimerism was not reported, it is noteworthy that more than 80% of cord transplants were less than 6/6 HLA identical to recipient.

In our study, we found that the occurrence of complete donor chimerism was more frequent after 4/6 than after 5/6 or 6/6 HLA matched UCBT and was not apparently influenced by the transplanted cell dose. One could underline that this is quite inconsistent with a large burden

of scientific evidence demonstrating that better cord/recipient HLA compatibility and higher transplanted cell dose improve haematological recovery (Eapen et al., 2013; Gluckman et al., 2004; Locatelli et al., 1999; Wagner et al., 2002). Indeed, our results (table 3) also showed that the transplanted cell dose significantly improves neutrophil and platelet recovery and that HLA mismatch has an unfavourable impact, although this later relation did not reach the level of statistical significance. These findings suggest that haematological recovery and complete donor chimerism occurrence may be two different concepts with different sets of influencing factors. Haematological recovery depends on the capacity of transplanted cells to engraft in a given host whereas complete donor chimerism reflects the allogeneic reactivity of the transplanted immune system. In this context, a higher level of HLA mismatch may enhance alloreactivity against the host residual hematopoietic cells and may result in more complete donor chimerim. In their study of chimerism after bone marrow or peripheral blood transplantation for non-malignant diseases, Stikvoort et al. found that stable mixed chimerism was more frequent when the donor was sibling compared to unrelated volunteer. They argued that, because sibling donor cells are a closer HLA and minor histocompatibility antigen match than unrelated donor cells, they are less prone to induce immune-mediated killing of recipient cells. Another concordant argument is a study of chimerism after double cord blood transplantation (Verneris et al., 2012). After double cord blood transplantation one unit predominates by Day100 in around 90% of patients, due to graft versus graft interactions but in rare occasions, recipients can live with "dual chimerism", i.e. persistence of both units with a minimum hematopoietic contribution of 5% by each unit. In their paper, authors showed that recipients of two HLA 6/6 matched units (with each other and the recipient) were more likely to have dual chimerism, less aGvHD and more relapses, suggesting less alloreactivity of these well matched units.

A strong association between donor chimerism after bone marrow or peripheral blood allogeneic transplantation and the risk of relapse has been well documented. Children with leukemia who show increasing mixed chimerism are at increasing risk of relapse (Bader et al., 1998, 1997; Bader et al., 2004a; Bader et al., 2004b; Barrios et al., 2003). In our study as well as in another post-UCBT study (Berglund et al., 2012), we were unable to detect any association between donor chimerism and the relapse risk. This does not mean that UCBT differs from other stem cell sources in this setting. It could just reflect an insufficient power of our study, which included malignant and non-malignant diseases. Although analysis of the

potential relation between chimerism and relapse was restricted to children with haematological malignant diseases, this analysis was done in only 69 children who had different diseases and various haematological status at time of transplant. Consequently, we have to consider that description of the relations chimerism/relapse is not a reasonable objective of the study presented here.

On the contrary, we found a clear correlation between complete chimerism and the risk of GvHD. This relationship have been extensively described after bone marrow or peripheral blood transplant (Mohty et al., 2007; Nikolousis et al., 2013; Rupa-Matysek et al., 2011; Stikvoort et al., 2013; Svenberg et al., 2009). We demonstrate here that this correlation is particularly strong after UCBT. In our study, none of the children who never achieved complete donor chimerism developed severe acute GvHD or chronic GvHD. The sensibility threshold for detection of residual host cell being 0.1%, we suggest that even the presence of very few host cells can reflect a low risk of severe GvHD. Moreover, we show that very few patients who had 99.9% or less donor chimerism during the first month after UCBT further developed severe GvHD. Thus, we assume that the concept of early post-transplant chimerism, i.e. the highest donor chimerism during the first month after UCBT, can be a useful tool for predicting the occurrence of severe GvHD thereafter.

In conclusion, three predictive factors for complete donor chimerism were identified in this study: a history of malignant disease, an older age at transplant and a higher level of HLA mismatch between graft and recipient. Although graft cell dose had a strong impact on haematological recovery, it did not apparently influence c-DC occurrence. Moreover, early c-DC appeared useful to predict engraftment as well as acute and chronic Graft-vs-Host Disease.

## TABLES AND FIGURES:

**Table 1 :** Patients and transplants characteristics :

| Patients characteristics (n=94) | |
|---|---|
| Gender (Male/Female) | 53/41 |
| Age at UCBT (years):<br>Mean ± SEM<br>Median (IQR) | <br>6.64 ± 0.48<br>6.30 (2.16-9.85) |
| Diagnosis :<br>Malignant / Non malignant disease | <br>69/25 |
| Recipient CMV serology : +/- | 39/55 |
| Transplantation procedure (n=94) | |
| Conditioning regimen :<br>TBI versus no TBI | <br>49/45 |
| Graft/Recipient HLA compatibility:<br>- 0 mismatch (6/6)<br>- 1 mismatch (5/6)<br>- 2 mismatch (4/6) | <br>12 (12.8%)<br>42 (44.7%)<br>40 (42.6%) |
| Collected total nucleated cell dose ($x10^7$/kg)<br>Mean ± SEM<br>Median (IQR) | <br>9.49 ± 0.75<br>7.29 (5.11-11.21) |
| Infused total nucleated cell dose ($x10^7$/kg)<br>Mean ± SEM<br>Median (IQR) | <br>7.39 ± 0.58<br>5.78 (3.99-8.95) |
| Infused CD34+ cell dose ($x10^5$/kg)<br>Mean ± SEM<br>Median (IQR) | <br>2.4 ± 0.2<br>1.7 (1.0-2.9) |
| Infused CD45+ cell dose ($x10^7$/kg)<br>Mean ± SEM<br>Median (IQR) | <br>4.20 ± 0.34<br>3.36 (2.29-4.80) |
| Infused CD3+ cell dose ($x10^6$/kg)<br>Mean ± SEM<br>Median (IQR) | <br>11.33 ± 1.07<br>8.22 (6.08-13.10) |
| Main post transplant outcomes | |
| GvHDa grade ≥ 2 | 24/94 (25.5%) |
| GvHDa grade ≥3 | 8/94 (8.5%) |
| GvHDc * | 10/86 (11.6%) |
| Graft failure / Autologous recovery | 11/94 (11.7%) |
| Relapse (malignant disease) ** | 19/69 (27.5%) |
| TRM:<br>D100 cumulative incidence<br>5 years cumulative incidence | <br>5% ± 2%<br>15% ± 4% |
| Overall 5 year survival | 68% ± 5% |

TBI : total body irradiation

*: 86 patients alive at day 100 are assessable

**: 69 patients with malignant disease are assessable

**Table 2:** Multivariate analysis of predictive factors for complete donor chimerism

| PREDICTIVE FACTORS | ENDPOINT | | | |
|---|---|---|---|---|
| | More than 99.9% donor chimerism | | More than 99% donor chimerism | |
| | Hazard ratio (95%CI) | *p* value | Hazard ratio (95%CI) | *p* value |
| Diagnosis : malignant *vs* non malignant disease* | 2.41 (1.11-5.26) | 0.03 | 2.94 (1.67-5.17) | $1.8 \times 10^{-4}$ |
| Age at UCBT: First quartile* (less than 2.16 years) *vs* older | 4.29 (1.64-11.21) | $2.9 \times 10^{-3}$ | 2.34 (1.30-4.21) | $4.5 \times 10^{-3}$ |
| TBI *vs* no TBI* | 1.20 (0.69-2.07) | 0.52 | 0.73 (0.49-1.09) | 0.12 |
| Graft/recipient HLA compatibility : 4/6 *vs* 5-6/6 HLA identities* | 2.18 (1.38-3.44) | $8.7 \times 10^{-4}$ | 1.47 (1.04-2.07) | 0.03 |
| Infused CD34+ cell dose ** | 1.09 (0.97-1.24) | 0.15 | 1.05 (0.97-1.14) | 0.24 |

* : reference group for odd ratio estimation

** : odd ratio are given for each additional $1 \times 10^5$ CD34+ cell dose

TBI : total body irradiation

**Table 3:** Multivariate analysis of predictive factors for hematopoietic recovery

| PREDICTIVE FACTORS | ENDPOINT | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Neutrophils > 0.5 giga/l | | Platelets > 50 giga/l | |
| | Hazard ratio (95%CI) | *p* value | Hazard ratio (95%CI) | *p* value |
| Diagnosis : malignant *vs* non malignant disease* | 1.96 (1.01-3.80) | 0.05 | 1.25 (0.58-2.68) | 0.57 |
| Age at UCBT: First quartile* (less than 2.16 years) *vs* older | 0.74 (0.37-1.47) | 0.39 | 0.91 (0.42-1.98) | 0.81 |
| TBI *vs* no TBI* | 0.70 (0.40-1.21) | 0.20 | 1.16 (0.63-2.12) | 0.64 |
| Graft/recipient HLA compatibility : 4/6 *vs* 5-6/6 HLA identities* | 0.73 (0.50-1.06) | 0.10 | 0.66 (0.41-1.09) | 0.10 |
| Infused $CD34^+$ cell dose ** | 1.13 (1.02-1.25) | 0.02 | 1.12 (1-1.26) | 0.04 |

* : reference group for odd ratio estimation

** : odd ratio are given for each additional $1 \times 10^5$ $CD34^+$ cell dose

TBI : total body irradiation

**Table 4 :** Influence of complete donor chimerism (> 99.9% donor) on the main clinical outcome after UCBT

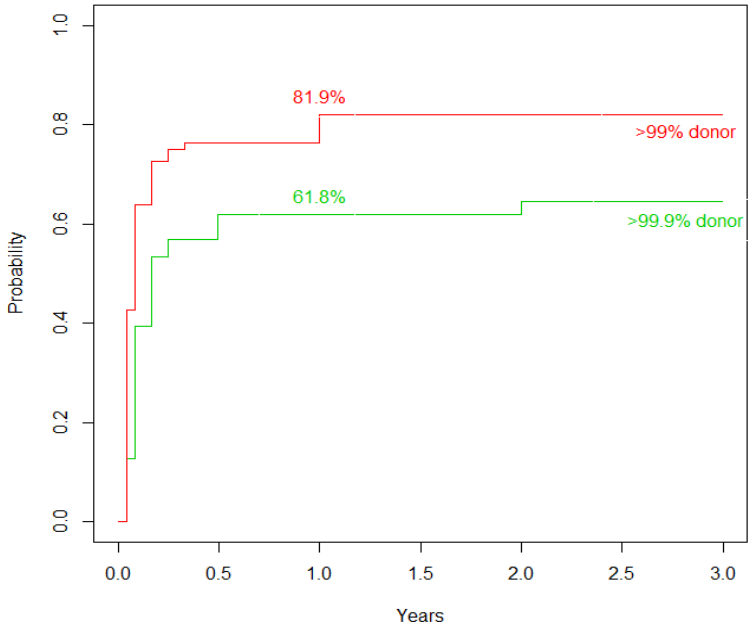
| OUTCOME AFTER UCBT | More than 99.9% donor, any time after UCBT | | More than 99.9% donor during first month post UCBT | |
|---|---|---|---|---|
| | yes (n=58) vs no(n=36) | *p* value | yes (n=37) vs no(n=57) | *p* value |
| Graft failure / autologous reconstitution | 0 (0%) / 11 (30.6%) | $<1x10^{-3}$ | 0 (0%) / 11 (19.3%) | $3 \times 10^{-3}$ |
| GvHDa grade ≥ 2 | 22 (37.9%) / 2 (5.6%) | $<1x10^{-3}$ | 17 (45.9%) / 7 (12.3%) | $<1 \times 10^{-3}$ |
| GvHDa grade ≥ 3 | 8 (13.8%) / 0 (0%) | 0.02 | 7 (18.9%) / 1 (1.8%) | $6 \times 10^{-3}$ |
| GvHDc* | 10 (64%) / 0 (0%) | 0.01 | 7 (20.6%) / 3 (5.8%) | 0.05 |
| Relapse** | 13 (26%) / 6 (31.6%) | 0.64 | 7 (20.6%) / 12 (34.3%) | 0.20 |
| TRM | 9 (15.5%) / 5 (13.9%) | 0.83 | 7 (18.9%) / 7 (12.3%) | 0.38 |
| Overall mortality | 19 (32.8%) / 11 (30.6%) | 0.82 | 12 (32.4%) / 18 (31.6%) | 0.93 |

*: 86 patients alive at day 100 are assessable

**: 69 patients with malignant disease are assessable

TRM : transplant related mortality

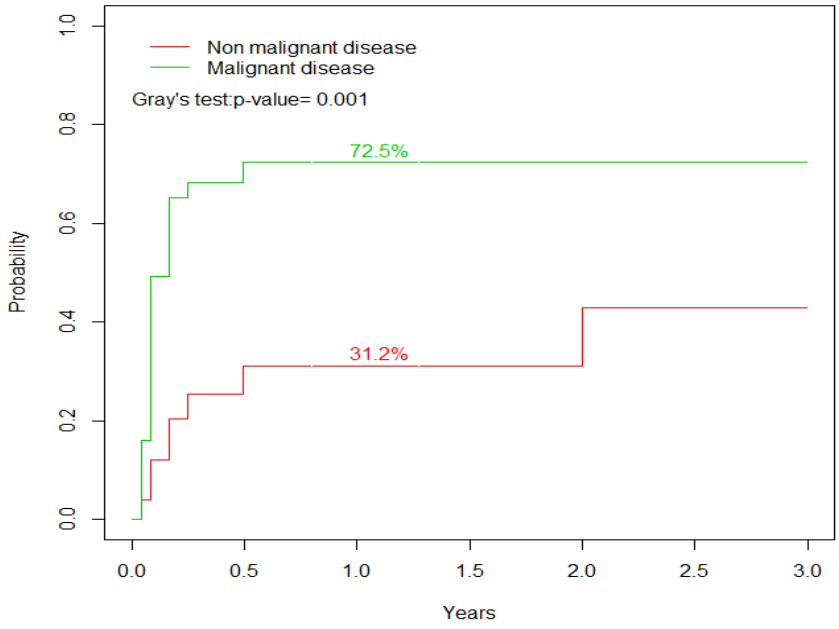
**Figure 1 :** Cumulative incidence of complete donor chimerism occurrence over time.



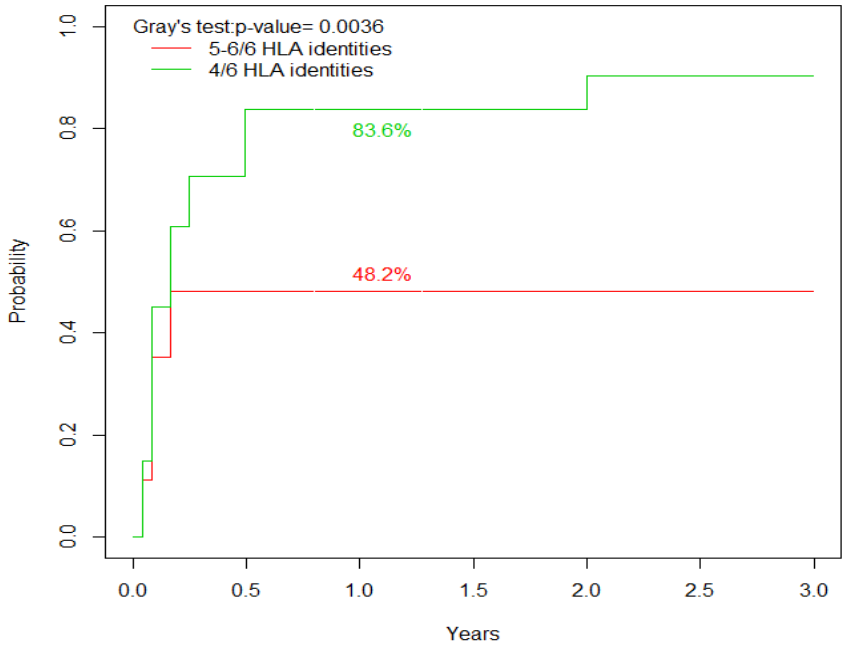

- Occurrence of > 99.9% donor blood chimerism
- Occurrence of > 99% donor blood chimerism

**Figure 2 :** Predictive factors for occurrence of a more than 99.9% donor chimerism.

A : Influence of initial disease (malignant *vs* non malignant disease) :



B : Influence of recipient / cord blood HLA compatibility (4/6 vs 5-6/6 HLA identities) :




C : Influence of age at UCBT (quartile distribution) :

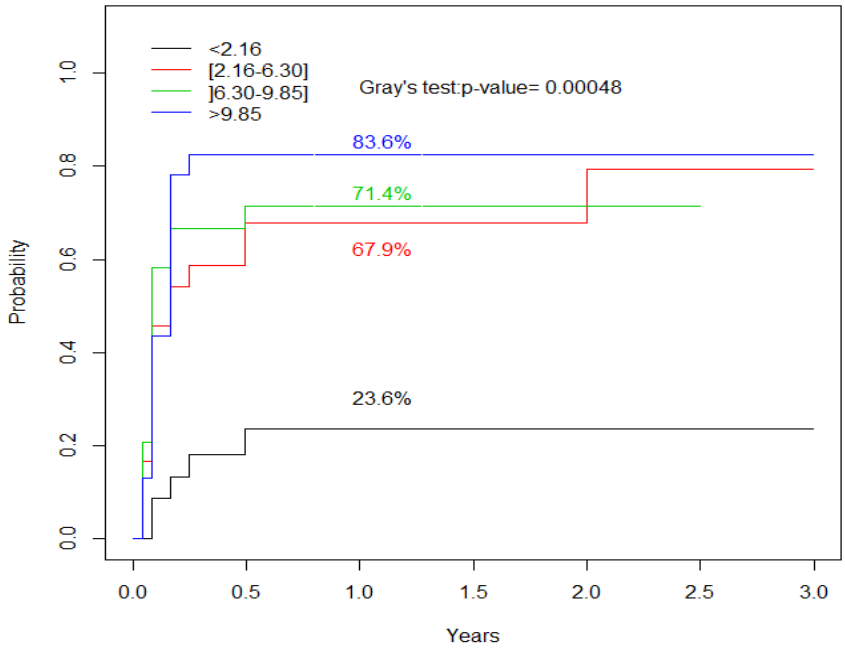
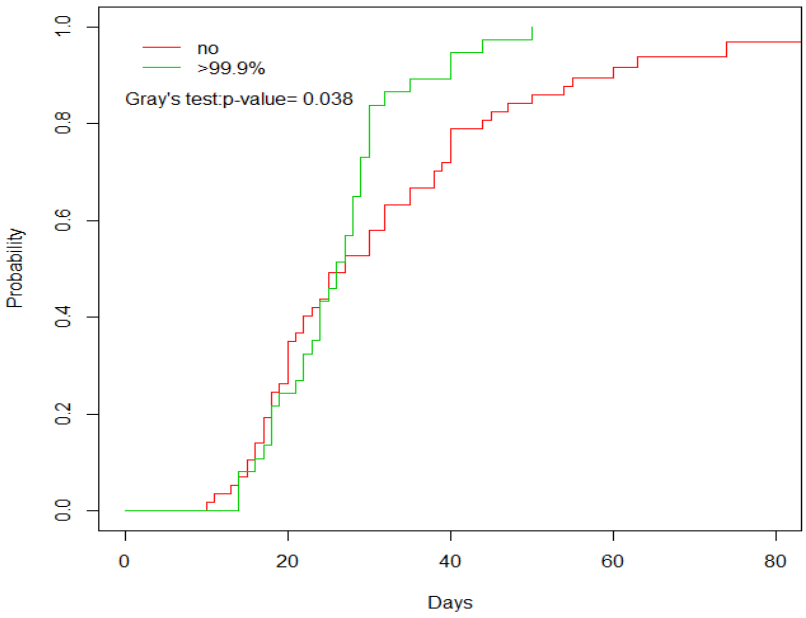
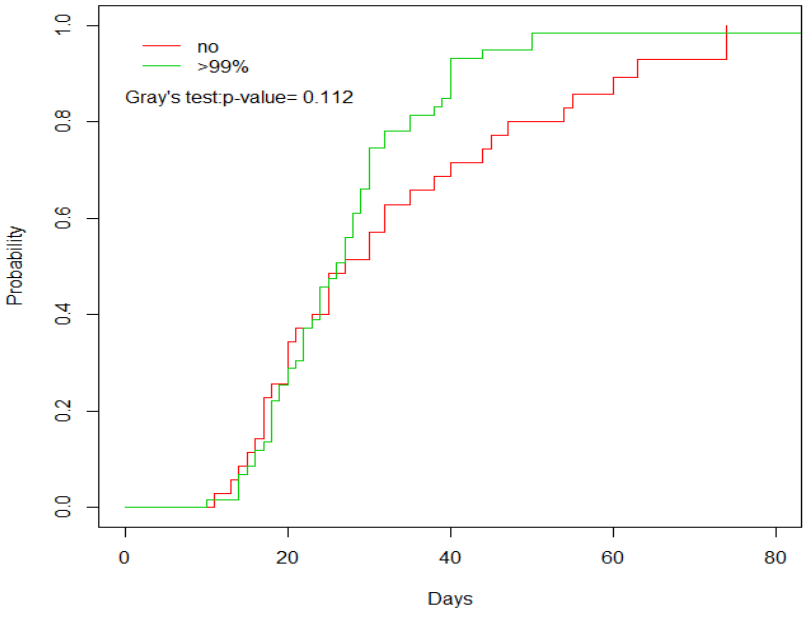


**Figure 3 :** Influence of first month chimerism on hematopoetic recovery :

A : Cumulative incidence of neutrophil recovery (> 0.5 giga/l) in patients who achieved or not a more than 99.9% donor chimerism during the first month after transplant.




B : cumulative incidence of neutrophil recovery (> 0.5 giga/l) in patients who achieved or not a more than 99% donor chimerism during the first month after transplant.



## SUPPLEMENTAL FILES

**Table 2 bis:** Multivariate analysis of predictive factors for complete donor chimerism

| PREDICTIVE FACTORS | ENDPOINT | | | |
|---|---|---|---|---|
| | More than 99.9% donor chimerism | | More than 99% donor chimerism | |
| | Hazard ratio (95%CI) | *p* value | Hazard ratio (95%CI) | *p* value |
| Diagnosis : malignant *vs* non malignant disease* | 2.31 (1.01-5.30) | 0.05 | 2.54 (1.50-4.30) | $5.1x10^{-4}$ |
| Age at UCBT: First quartile* (less than 2.16 years) *vs* older | 3.99 (1.50-10.6) | $5.5x10^{-3}$ | 1.64 (0.88-3.03) | 0.12 |
| TBI *vs* no TBI* | 1.18 (0.68-2.06) | 0.56 | 0.76 (0.51-1.13) | 0.17 |
| Graft/recipient HLA compatibility : 4/6 *vs* 5-6/6 HLA identities* | 2.17 (1.39-3.39) | $7.1x10^{-4}$ | 1.42 (1.01-2.00) | 0.05 |
| Infused total nucleated cell dose ** | 1.02 (0.96-1.08) | 0.57 | 0.97 (0.92-1.02) | 0.23 |

* : reference group for odd ratio estimation

** : odd ratio are given for each additional 1 x $10^7$ total nucleated cell dose

TBI : total body irradiation

**Table 2ter:** Multivariate analysis of predictive factors for complete donor chimerism

| PREDICTIVE FACTORS | ENDPOINT | | | |
|---|---|---|---|---|
| | More than 99.9% donor chimerism | | More than 99% donor chimerism | |
| | Hazard ratio (95%CI) | *p* value | Hazard ratio (95%CI) | *p* value |
| Diagnosis : malignant *vs* non malignant disease* | 2.20 (0.98-4.94) | 0.06 | 2.53 (1.50-4.26) | $5 \times 10^{-4}$ |
| Age at UCBT: First quartile* (less than 2.16 years) *vs* older | 3.53 (1.46-8.53) | $5 \times 10^{-3}$ | 1.61 (0.88-2.96) | 0.12 |
| TBI *vs* no TBI* | 1.19 (0.69-2.08) | 0.53 | 0.76 (0.52-1.12) | 0.17 |
| Graft/recipient HLA compatibility : 4/6 *vs* 5-6/6 HLA identities | 2.15 (1.37-3.36) | $8.7x10^{-4}$ | 1.47 (1.05-2.05) | 0.03 |
| Infused CD3+ T cell dose ** | 1 (0.97-1.03) | 0.93 | 0.98 (0.95-1.01) | 0.14 |

* : reference group for odd ratio estimation

** : odd ratio are given for each additional 1 x $10^6$ CD3+ T cell dose

TBI : total body irradiation

**Table 3 bis:** Multivariate analysis of predictive factors for hematopoietic recovery

| PREDICTIVE FACTORS | ENDPOINT | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Neutrophils > 0.5 giga/l | | Platelets > 50 giga/l | |
| | Hazard ratio (95%CI) | *p* value | Hazard ratio (95%CI) | *p* value |
| Diagnosis : malignant *vs* non malignant disease* | 1.71 (0.93-3.16) | 0.09 | 1.05 (0.50-2.20) | 0.90 |
| Age at UCBT: First quartile* (less than 2.16 years) *vs* older | 1.08 (0.56-2.08) | 0.82 | 1.02 (0.45-2.31) | 0.97 |
| TBI *vs* no TBI* | 0.78 (0.44-1.37) | 0.38 | 1.27 (0.66-2.45) | 0.48 |
| Graft/recipient HLA compatibility : 4/6 *vs* 5-6/6 HLA identities* | 0.83 (0.57-1.22) | 0.34 | 0.68 (0.42-1.10) | 0.12 |
| Infused total nucleated cell dose ** | 1.14 (1.09-1.18) | $2.8 \times 10^{-10}$ | 1.07 (0.99-1.14) | 0.09 |

* : reference group for odd ratio estimation

** : odd ratio are given for each additional $1 \times 10^7$ total nucleated cell dose

TBI : total body irradiation

**Table 3ter:** Multivariate analysis of predictive factors for hematopoietic recovery

| PREDICTIVE FACTORS | ENDPOINT | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Neutrophils > 0.5 giga/l | | Platelets > 50 giga/l | |
| | Hazard ratio (95%CI) | *p* value | Hazard ratio (95%CI) | *p* value |
| Diagnosis : malignant *vs* non malignant disease* | 1.69 (0.90-3.15) | 0.10 | 1.07 (0.50-2.29) | 0.86 |
| Age at UCBT: First quartile* (less than 2.16 years) *vs* older | 0.96 (0.46-2.01) | 0.91 | 1.04 (0.46-2.38) | 0.92 |
| TBI *vs* no TBI* | 0.75 (0.43-1.32) | 0.32 | 1.27 (0.66-2.45) | 0.47 |
| Graft/recipient HLA compatibility : 4/6 *vs* 5-6/6 HLA identities* | 0.69 (0.48-1.00) | 0.05 | 0.62 (0.39-0.99) | 0.05 |
| Infused CD3+ T cell dose ** | 1.05 (1.02-1.08) | $5.9 \times 10^{-4}$ | 1.04 (1.00-1.01) | 0.04 |

* : reference group for odd ratio estimation

** : odd ratio are given for each additional $1 \times 10^6$ CD3+ T cell dose

TBI : total body irradiation

**Table 4 bis :** Influence of donor chimerism (> 99% donor) on the main clinical outcome after UCBT

| OUTCOME AFTER UCBT | More than 99% donor, any time after UCBT | | More than 99% donor during first month post UCBT | |
|---|---|---|---|---|
| | yes (n=74) vs no(n=20) | *p* value | yes (n=59) vs no(n=35) | *p* value |
| Graft failure / autologous reconstitution | 1 (1.4%) / 10 (50%) | $<1 \times 10^{-3}$ | 1 (1.7%) / 10 (28.6%) | $<1 \times 10^{-3}$ |
| GvHDa grade ≥ 2 | 22 (29.7%) / 2 (10%) | 0.07 | 18 (30.5%) / 6 (17.1%) | 0.15 |
| GvHDa grade ≥ 3 | 8 (10.8%) / 0 (0%) | 0.20 | 7 (11.9%) / 1 (2.9%) | 0.25 |
| GvHDc* | 10 (14.1%) /0 (0%) | 0.20 | 8 (14.3%) / 2 (6.7%) | 0.48 |
| Relapse** | 17 (27.9%) / 2 (25%) | 1 | 14 (26.9%) / 5 (29.4%) | 1 |
| TRM | 10 (13.5%) / 4 (20%) | 0.49 | 10 (16.9%) / 4 (11.4%) | 0.47 |
| Overall mortality | 24 (32.4%) / 6 (30%) | 0.84 | 21 (35.6%) / 9 (25.7%) | 0.32 |

*: 86 patients alive at day 100 are assessable

**: 69 patients with malignant disease are assessable

TRM : transplant related mortality

## BIBLIOGRAPHY :


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

Bader, P., Beck, J., Frey, A., Schlegel, P.G., Hebarth, H., Handgretinger, R., Einsele, H., Niemeyer, C., Benda, N., Faul, C., Kanz, L., Niethammer, D., Klingebiel, T., 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., Hölle, W., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Benda, N., Schlegel, P.G., Niethammer, D., Beck, J., 1997. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. Bone Marrow Transplant. 19, 697–702.

Bader, P., Kreyenberg, H., Hoelle, W., Dueckers, G., Handgretinger, R., Lang, P., Kremens, B., Dilloo, D., Sykora, K.-W., Schrappe, M., Niemeyer, C., Von Stackelberg, A., Gruhn, B., Henze, G., Greil, J., Niethammer, D., Dietz, K., Beck, J.F., Klingebiel, T., 2004a. 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. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 22, 1696–1705.

Bader, P., Kreyenberg, H., Hoelle, W., Dueckers, G., Kremens, B., Dilloo, D., Sykora, K.-W., Niemeyer, C., Reinhardt, D., Vormoor, J., Gruhn, B., Lang, P., Greil, J., Handgretinger, R., Niethammer, D., Klingebiel, T., Beck, J.F., 2004b. Increasing mixed chimerism defines a high-risk group of childhood acute myelogenous leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation where pre-emptive immunotherapy may be effective. Bone Marrow Transplant. 33, 815–821.

Barker, J.N., Byam, C., Scaradavou, A., 2011. How I treat: the selection and acquisition of unrelated cord blood grafts. Blood 117, 2332–2339.

Barrios, M., Jiménez-Velasco, A., Román-Gómez, J., Madrigal, M.E., Castillejo, J.A., Torres, A., Heiniger, A., 2003. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. Haematologica 88, 801–810.

Berglund, S., Le Blanc, K., Remberger, M., Gertow, J., Uzunel, M., Svenberg, P., Winiarski, J., Ljungman, P., Ringdén, O., Uhlin, M., Mattsson, J., 2012. Factors with an impact on chimerism development and long-term survival after umbilical cord blood transplantation. Transplantation 94, 1066–1074.

Boelens, J.J., Aldenhoven, M., Purtill, D., Ruggeri, A., Defor, T., Wynn, R., Wraith, E., Cavazzana-Calvo, M., Rovelli, A., Fischer, A., Tolar, J., Prasad, V.K., Escolar, M., Gluckman, E., O'Meara, A., Orchard, P.J., Veys, P., Eapen, M., Kurtzberg, J., Rocha, V., Eurocord, Inborn Errors Working Party of European Blood and Marrow Transplant group, Duke University Blood and Marrow Transplantation Program, Centre for International Blood and Marrow Research, 2013. Outcomes of transplantation using various hematopoietic cell sources in children with Hurler syndrome after myeloablative conditioning. Blood 121, 3981–3987.

Eapen, M., Klein, J.P., Ruggeri, A., Spellman, S., Lee, S.J., Anasetti, C., Arcese, W., Barker, J.N., Baxter-Lowe, L.A., Brown, M., Fernandez-Vina, M.A., Freeman, J., He, W., Iori, A.P., Horowitz, M.M., Locatelli, F., Marino, S., Maiers, M., Michel, G., Sanz, G.F., Gluckman, E., Rocha, V., 2013. Impact of allele-level HLA matching on outcomes after myeloablative single unit umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancy. Blood.

Eapen, M., Rubinstein, P., Zhang, M.-J., Stevens, C., Kurtzberg, J., Scaradavou, A., Loberiza, F.R., Champlin, R.E., Klein, J.P., Horowitz, M.M., Wagner, J.E., 2007. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. Lancet 369, 1947–1954.

Fine, J.P., 2001. Regression modeling of competing crude failure probabilities. Biostat. Oxf. Engl. 2, 85–97.

Gluckman, E., Rocha, V., Arcese, W., Michel, G., Sanz, G., Chan, K.-W., Takahashi, T.A., Ortega, J., Filipovich, A., Locatelli, F., Asano, S., Fagioli, F., Vowels, M., Sirvent, A., Laporte, J.-P., Tiedemann, K., Amadori, S., Abecassis, M., Bordigoni, P., Diez, B., Shaw, P.J., Vora, A., Caniglia, M., Garnier, F., Ionescu, I., Garcia, J., Koegler, G., Rebulla, P., Chevret, S., Eurocord Group, 2004. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. Exp. Hematol. 32, 397–407.

Gooley, T.A., Leisenring, W., Crowley, J., Storer, B.E., 1999. Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: new representations of old estimators. Stat. Med. 18, 695–706.

Lamba, R., Abella, E., Kukuruga, D., Klein, J., Savasan, S., Abidi, M.H., Mohamed, A., Peres, E., 2004. Mixed hematopoietic chimerism at day 90 following allogenic myeloablative stem cell transplantation is a predictor of relapse and survival. Leukemia 18, 1681–1686.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods San Diego Calif 25, 402–408.

Locatelli, F., Rocha, V., Chastang, C., Arcese, W., Michel, G., Abecasis, M., Messina, C., Ortega, J., Badell-Serra, I., Plouvier, E., Souillet, G., Jouet, J.P., Pasquini, R., Ferreira, E., Garnier, F., Gluckman, E., 1999. Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord-Cord Blood Transplant Group. Blood 93, 3662–3671.

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

Moscardó, F., Sanz, J., Senent, L., Cantero, S., de la Rubia, J., Montesinos, P., Planelles, D., Lorenzo, I., Cervera, J., Palau, J., Sanz, M.A., Sanz, G.F., 2009. Impact of hematopoietic chimerism at day +14 on engraftment after unrelated donor umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancies. Haematologica 94, 827–832.

Nikolousis, E., Robinson, S., Nagra, S., Brookes, C., Kinsella, F., Tauro, S., Jeffries, S., Griffiths, M., Mahendra, P., Cook, M., Paneesha, S., Lovell, R., Kishore, B., Chaganti, S., Malladi, R., Raghavan, M., Moss, P., Milligan, D., Craddock, C., 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.

Park, M., Koh, K.N., Seo, J.J., Im, H.J., 2011. Clinical implications of chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with non-malignant diseases. Korean J. Hematol. 46, 258–264.

Prasad, V.K., Mendizabal, A., Parikh, S.H., Szabolcs, P., Driscoll, T.A., Page, K., Lakshminarayanan, S., Allison, J., Wood, S., Semmel, D., Escolar, M.L., Martin, P.L., Carter, S., Kurtzberg, J., 2008. Unrelated donor umbilical cord blood transplantation for inherited metabolic disorders in 159 pediatric patients from a single center: influence of cellular composition of the graft on transplantation outcomes. Blood 112, 2979–2989.

Rocha, V., Cornish, J., Sievers, E.L., Filipovich, A., Locatelli, F., Peters, C., Remberger, M., Michel, G., Arcese, W., Dallorso, S., Tiedemann, K., Busca, A., Chan, K.W., Kato, S., Ortega, J., Vowels, M., Zander, A., Souillet, G., Oakill, A., Woolfrey, A., Pay, A.L., Green, A., Garnier, F., Ionescu, I., Wernet, P., Sirchia, G., Rubinstein, P., Chevret, S., Gluckman, E., 2001. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. Blood 97, 2962–2971.

Rupa-Matysek, J., Lewandowski, K., Nowak, W., Sawiński, K., Gil, L., 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.

Saito, B., Fukuda, T., Yokoyama, H., Kurosawa, S., Takahashi, T., Fuji, S., Takahashi, N., Tajima, K., Kim, S.-W., Mori, S.-I., Tanosaki, R., Takaue, Y., Heike, Y., 2008. Impact of T cell chimerism on clinical outcome in 117 patients who underwent allogeneic stem cell transplantation with a busulfan-containing reduced-intensity conditioning regimen. Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant. 14, 1148–1155.

Stikvoort, A., Gertow, J., Sundin, M., Remberger, M., Mattsson, J., 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. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant. 19, 838–844.

Svenberg, P., Mattsson, J., Ringdén, O., Uzunel, M., 2009. Allogeneic hematopoietic SCT in patients with non-malignant diseases, and importance of chimerism. Bone Marrow Transplant. 44, 757–763.

Verneris, M., Turcotte, L., Cao, Q., MacMillan, M., Miller, J., Weisdorf, D., Brunstein, C., Wagner, J., 2012. Increased relapse associated with mixed donor-donor chimerism following double umbilical cord blood transplantation. Blood 2012,120, abstract 358.

Wagner, J.E., Barker, J.N., DeFor, T.E., Baker, K.S., Blazar, B.R., Eide, C., Goldman, A., Kersey, J., Krivit, W., MacMillan, M.L., Orchard, P.J., Peters, C., Weisdorf, D.J., Ramsay, N.K.C., Davies, S.M., 2002. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. Blood 100, 1611–1618.

;

# III- ARTICLE: (Traduction française)

## Etude du chimérisme après greffe non apparentée de cellules souches de sang placentaire chez l'enfant :

## Cinétique, facteurs prédictifs et impact sur le devenir post greffe

PARTIE III - ARTICLE: (Traduction française)

# Etude du chimérisme après greffe non apparentée de cellules souches de sang placentaire chez l'enfant :

# Cinétique, facteurs prédictifs et impact sur le devenir post greffe


Résumé ……..……56

Introduction ……...…….57

Patients et méthodes……...……....58

1) Critères d'inclusion et d'exclusion des patients
2) Evaluation du chimérisme
3) Sélection des greffons
4) Méthode statistique

Résultats ……..……61

1) Caractéristiques des patients et devenir global après greffe
2) Incidences cumulatives de la survenue d'un chimérisme donneur
3) Facteurs prédictifs du chimérisme après greffe de sang placentaire
4) Facteurs prédictifs de la reconstitution hématologique après greffe
5) Impact de la survenue d'un chimérisme complet sur le devenir post greffe
6) Influence du chimérisme précoce sur la reconstitution hématologique

Discussion ……..…….……...……66

Tableaux et figures…….……70

Fichiers supplementaires…...……...……..76

Bibliographie.……..……...79

## RESUME:

L'objectif de ce travail était de décrire la probabilité de survenue d'un chimérisme complet de type donneur (cDC, >99,9% donneur) après greffe non apparentée de cellules souches de sang placentaire chez l'enfant, d'en identifier les facteurs prédictifs ainsi que son impact sur le devenir post greffe.

94 enfants greffés par une unité de sang placentaire après préparation myeloablative, ont été inclus dans notre étude. Le chimérisme, quantifié sur sang périphérique selon la technique TAQMAN (sensibilité de 0,1%), a été recueilli de manière séquentielle une période de 3 ans post greffe. L'incidence cumulative de survenue d'un chimérisme >99,9% donneur à 1 an est de 61,8%. Lors de l'analyse multivariée, 3 facteurs prédictifs ont été mis en évidence : Le caractère malin de la pathologie initiale (p=0,03), l'âge avec comme facteur péjoratif un âge à la greffe inférieur à 2,16 ans (correspondant au 1$^{er}$ quartile de notre étude, p=2,9.10$^{-3}$) et la compatibilité HLA entre donneur et receveur (p=8,7.10$^{-4}$), qui lorsqu'elle est moindre est associée à une probabilité plus importante d'apparition d'un chimérisme complet au cours du temps. Bien que la quantité cellulaire injectée ait un fort impact sur la reconstitution hématologique, elle ne semble pas influencer le chimérisme après greffe.

Concernant le devenir post greffe, l'apparition d'un chimérisme complet précoce (c'est à dire un chimérisme >99,9% donneur dans le premier mois qui suit la greffe) apparaît prédictif de la prise de greffe (p=<1.10$^{-3}$) mais aussi de la survenue de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD pour Graft versus Host Disease) à la fois aigue et chronique. Aucune GvHD aigue sévère ou chronique n'a été retrouvée chez les patients n'ayant jamais développé de chimérisme complet ce qui suggère qu'une hématopoïèse résiduelle même minime de type « receveur » protègerait de la survenue de GvHD après greffe de sang placentaire.

## INTRODUCTION :

L'évaluation du chimérisme sur sang périphérique est un élément important du suivi des patients après greffe de cellules souches hématopoïétiques. La PCR quantitative en temps réel avec sondes Taqman permet la détection, parmi les cellules nucléées sanguines de l'hôte, des allèles spécifiques du couple donneur/receveur après greffe avec une sensibilité de 0,1% (Alizadeh et al., 2002). Plusieurs études concernant les greffes de moelle osseuse ou de cellules souches périphériques ont souligné l'influence du chimérisme sanguin sur la survenue de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD) et en cas de pathologie maligne, sur le risque de rechute (Bader et al., 2004a; Lamba et al., 2004; Rupa-Matysek et al., 2011; Saito et al., 2008; Svenberg et al., 2009). Dans les deux dernières décennies l'utilisation de sang placentaire non apparenté comme source alternative de cellules souches hématopoïétiques a considérablement augmenté, particulièrement chez l'enfant (Barker et al., 2011; Eapen et al., 2007; Gluckman et al., 2004; Rocha et al., 2001). Néanmoins, les données concernant le chimérisme après ce type de greffe sont très rares (Berglund et al., 2012; Moscardó et al., 2009; Prasad et al., 2008) et les études publiées n'utilisaient pas uniformément la RT-PCR comme technique de quantification du chimérisme.

Notre étude repose sur les données séquentielles de chimérisme après greffe de sang placentaire non apparentée chez 94 enfants. Elle a pour but principal d'évaluer la probabilité de survenue d'un chimérisme de type complet ou mixte au cours du temps, en tenant compte des risques compétitifs, d'en identifier les facteurs prédictifs ainsi que son impact sur la reconstitution hématologique, la survenue de GvHD, la mortalité iatrogène (TRM), la rechute et la survie globale.

# PATIENTS ET METHODES :

## 1. Critères d'inclusion et d'exclusion des patients :

Notre étude a été réalisée de manière prospective, entre 2001 et 2010, dans le service d'hématologie pédiatrique de l'hôpital Timone-Enfants, à Marseille (France). Tous les enfants âgés de moins de 18 ans, recevant une première greffe de sang placentaire non apparentée, après préparation myeloablative, et ce, pour une pathologie non maligne ou maligne en rémission complète, ont été inclus. Seuls les enfants greffés pour déficit immunitaire combiné sévère ou à partir de 2 unités de sang placentaire ont été exclus. 94 enfants étaient éligibles et tous ont été inclus après recueil du consentement éclairé des parents.

## 2. Evaluation du chimérisme :

- Définition :

Le critère de jugement principal de notre étude était la survenue d'un chimérisme complet de type donneur (cDC) au cours du temps défini par plus de 99,9% des cellules nucléées sanguines d'origine donneur.
Le critère de jugement accessoire consistait à évaluer la survenue d'un chimérisme quasi-complet (n-cDC pour « near-complete Donor Chimerism ») au cours du temps c'est à dire >99% donneur.

- Quantification du chimérisme :

Le chimérisme a été quantifié sur sang périphérique, selon la technique TAQMAN, sur une période de 3 ans post greffe.

→ Extraction de l'ADN :

L'ADN a été extrait à partir des cellules sanguines périphériques des patients selon la technique d'extraction « salting out » après lyse des globules rouges. La concentration et la

pureté de l'ADN ont été évaluées par la mesure de la DO à 260 nm et à 280 nm par un spectrophotomètre Nanodrop

→ Evaluation du chimérisme :

L'évaluation du chimérisme est basée sur l'étude du polymorphisme bi-allélique d'insertion/délétion. Les allèles spécifiques du couple donneur/receveur sont quantifiés par PCR quantitative en temps réel avec sondes Taqman, sur un ABI 7500 suivant le protocole de M. Alizadeh (Alizadeh et al., 2002). Brièvement, avant greffe, un profil allélique spécifique du donneur et du receveur pré-greffe est déterminé par un panel de 31 marqueurs présents sur l'ensemble des autosomes et du chromosome Y. Les marqueurs informatifs, c'est-à-dire pour lesquels au moins un allèle du receveur est différent de ceux du donneur et vice-versa, sont sélectionnés pour analyser le chimérisme. Au moins deux marqueurs informatifs pour le couple donneur/receveur et un marqueur contrôle non polymorphe sont amplifiés sur l'ADN à étudier mais aussi sur ceux avant greffe. Pour améliorer la fiabilité de l'évaluation cinétique, chaque nouveau prélèvement est analysé avec le prélèvement précédent du même patient. Si l'allèle spécifique du receveur est encore détecté après greffe, sa quantité relative est évaluée par la mesure du rapport de l'intensité du signal qui correspond à la différence entre le signal du marqueur spécifique et du marqueur controle obtenu pour le prélèvement étudié par rapport à celui obtenu avant greffe (Livak and Schmittgen, 2001). Le résultat est exprimé ainsi en % de receveur. La sensibilité de détection de l'ensemble des marqueurs est de 0.1%.

- Temps d'évaluation :

Pour chaque patient, le chimérisme a été successivement quantifié à J15 - J30 - J60 - J90 - J120 - J180 - 1 an - 1 an ½ - 2 ans - 2 ans ½ - 3 ans.

L'incidence cumulative de survenue d'un chimérisme complet au cours du temps a ainsi été calculée. Les enfants sans aucune reconstitution hématologique à un temps donné ont été considérés comme ayant un chimérisme 0% donneur.

Nous avons également défini la notion de chimérisme précoce : il s'agit du meilleur chimérisme donneur durant le premier mois post greffe.

3. Sélection des greffons :

L'évaluation de la compatibilité HLA entre donneur et receveur a été établie en fonction des 6 allèles correspondants aux 3 antigènes HLA suivants :

- HLA-A et HLA-B (molécules de classe I) : par PCR générique (biologie moléculaire de résolution intermédiaire)
- HLA-DRB1 (molécule de classe II) : par PCR allélique ou PRC SSP (Polymerase chain réaction sequence specific primer = biologie moléculaire de haute résolution).

La compatibilité HLA est donc exprimée sur 6, par le nombre de loci identiques entre donneur et receveur. Une unité de sang placentaire était éligible pour une greffe si elle était de 4 à $6/6^{ème}$ HLA-compatible et qu'elle contenait au moins $3.10^7$ CNT (cellules nucléées totales) congelées par kilogramme de receveur.

La quantité cellulaire injectée était évaluée à partir du compte de CNT après décongélation mais aussi à partir du nombre absolu des cellules $CD34^+$ et des cellules $CD3^+$.

4. Méthode statistique :

Les incidences cumulées de survenue des critères de jugement au cours du temps sont calculées selon le modèle des événements avec risques compétitifs (Gooley et al., 1999). Dans ce cas particulier, les évènements compétitifs sont soit la rechute pour les maladies malignes, soit le décès pour les maladies malignes ou non malignes. Les courbes d'incidence cumulée sont comparées entre elles selon le modèle de Fine et Gray (Fine, 2001). Les variables testées dans l'étude univariée sont les suivantes : « âge à la greffe », traitée en variable continue puis répartie en quartiles, « maladie maligne / non maligne », « irradiation corporelle totale » (oui *versus* non) « compatibilité HLA cordon/receveur » (4/6 *versus* 5/6 ou 6/6) et la quantité cellulaire injectée par kg de receveur. Cette dernière a été évaluée selon 3 paramètres : la quantité de cellules nucléées totales (CNT), de cellules $CD34^+$ ou de cellules $CD3^+$ injectées, toutes traitées en variable continue. Les variables pertinentes pour les modèles multivariés sont sélectionnées selon les résultats de l'étude univariée ($p<0,10$). L'influence de la richesse cellulaire du greffon a été analysée selon 3 modèles multivariés distincts, chacun utilisant une des trois variables décrites ci-dessus. Les modèles finaux

multivariés sont présentés avec leurs significations statistiques (*p*), leur hazard ratio (HR) et l'intervalle de confiance à 95% (IC95%) de ces hazard ratio.
Les définitions habituelles sont utilisées pour l'évolution après greffe : survie globale, rechute, risque de mortalité iatrogène (TRM), GvHD aiguë et chronique, reconstitution hématologique. La reconstitution autologue est définie par une reconstitution hématologique avec un chimérisme > 80% receveur. L'impact du chimérisme sur la survenue de GvHD, de rechute, de mortalité iatrogène et le risque de rejet/non prise est évalué par le test de $Chi^2$ ou le test de Fisher.

## RESULTATS :

1. Caractéristiques des patients et devenir global après greffe :

94 patients greffés par une unité de sang placentaire non apparentée après préparation myeloablative, ont été inclus dans notre étude. L'ensemble des caractéristiques de ces patients, de leur traitement ainsi que le devenir post greffe est détaillé dans le Tableau 1. Il s'agit d'enfants dont l'âge médian est de 6,3 ans (IQR : 2,16-9,85) présentant soit une hémopathie maligne en rémission complète (69 patients) soit une pathologie non maligne (25 patients).
La compatibilité HLA donneur/receveur était de $4/6^{ème}$ pour 42,6%, $5/6^{ème}$ pour 44,7% et $6/6^{ème}$ pour 12,8% des patients. 49 enfants ont reçu une irradiation corporelle totale (ICT) durant leur conditionnement pré-greffe, versus 45 qui n'en n'ont pas reçu. La quantité cellulaire injectée médiane par kg de receveur était de $5,78.10^7$ pour les CNT et $1,7.10^5$ pour les cellules $CD34^+$. Tous les patients ont bénéficié d'une prophylaxie de la GvHD par ciclosporine A, corticoïdes et sérum anti-lymphocytaire à 2,5 mg/kg/j pendant 3 jour en pré-greffe (SAL de lapin, Thymoglobuline®, Genzyme, France)

Le taux de rechute, la mortalité iatrogène (TRM) à J100, et la survie globale à 5 ans sont de 27,5%, 5% et 68% respectivement. Pour 11 patients (11,7%), on constate l'absence de prise de greffe ou une reconstitution autologue.

Le suivi s'est compliqué, chez 24 patients (25,5%) d'une GvHD aigue ≥ 2 dont pour 8 d'entre eux une GvHD aigue sévère (≥ 3). Dix enfants parmi les 86 évaluables à J100 (11,6%) ont développé une GvHD chronique.

2. Incidences cumulatives de la survenue d'un chimérisme donneur :

Les probabilités d'apparition au cours du temps, d'un chimérisme > 99,9% donneur (cDC) ou > 99% (n-cDC) sont représentés sur la figure 1.
Elles tiennent compte des 2 risques compétitifs évoqués précédemment qui sont la mortalité iatrogène et la rechute. L'incidence cumulative à 1 an post greffe pour la survenue d'un chimérisme >99,9% donneur est de 61,8% (+/- 5,2%) et de 81,9% (+/- 4,5%) pour la survenue d'un chimérisme >99% donneur.

3. Facteurs prédictifs du chimérisme après greffe de sang placentaire :

Pour la mise en place des modèles multivariés, les variables ont été sélectionnées du fait de leur signification statistique au cours de l'analyse univariée. Les résultats sont décrits dans le tableau 2. Les facteurs prédictifs significatifs de la survenue d'un chimérisme >99,9% au cours du temps sont :

- Le caractère malin de la pathologie initiale (p=0,03):

Comme le montrait également l'analyse univariée (figure 2A), les patients greffés pour une pathologie maligne ont une probabilité significativement supérieure de développer un chimérisme complet de type donneur au cours du temps (incidence cumulative à 1 an post greffe de 72,5% versus 31,2%)

- L'âge à la greffe ($p=2,9.10^{-3}$) :

Les enfants de moins de 2,16 ans ($1^{er}$ quartile d'âge dans notre étude), ont une probabilité de survenue d'un cDC au cours du temps significativement moindre que les enfants plus âgés. L'analyse univariée démontre bien que plus l'âge du patient augmente, plus la probabilité d'apparition d'un chimérisme complet est élevée avec lorsque l'âge est traité en quartile un cut off très significatif entre le premier quartile (< 2,16 ans) et les 3 autres (incidences

cumulatives d'un cDC à 1 an post greffe de 23,6% versus 67.9%, 71.4% et 83.6% respectivement). Ces résultats sont illustrés par la figure 2C.

- La compatibilité HLA donneur/receveur ($p=8,7.10^{-4}$) :

Une compatibilité HLA 4/6$^{ème}$ entre donneur et receveur est associée à une probabilité supérieure de survenue d'un chimérisme complet par rapport aux greffes réalisées avec une compatibilité HLA de 5 ou 6/6$^{ème}$. Ces résultats étaient également retrouvés lors de l'analyse univariée comme le montre la figure 2B.

Par contre, on constate que la présence d'une irradiation corporelle totale (ICT) dans le conditionnement pré-greffe ainsi que la richesse du greffon (quantité de cellules $CD34^+$ injectée par kg de receveur) n'influencent pas le chimérisme post greffe.

Les mêmes facteurs prédictifs sont retrouvés pour la survenue d'un chimérisme >99% (n-cDC).

Nous avons refait cette analyse multivariée en remplaçant les $CD34^+$ injectées /kg, par les CNT injectées/kg puis par les cellules $CD3^+$ injectées/kg (analyses jointes en fichiers supplémentaires : Tableaux 2bis et 2ter). Dans les 3 modèles, la richesse cellulaire n'a aucune influence sur le chimérisme post greffe. Par contre les mêmes facteurs prédictifs sont retrouvés chaque fois (exceptés l'influence de la pathologie initiale sur l'apparition d'un cDC et de l'âge à la greffe sur le n-cDC qui n'atteignent pas le seuil de significativité)

4. Facteurs prédictifs de la reconstitution hématologique après greffe :

Nous avons refait les mêmes analyses multivariées, pour identifier cette fois les facteurs prédictifs de la reconstitution hématologique après greffe (PNN>0,5 giga/l et plaquettes> 50 giga/l). Les mêmes facteurs compétitifs ont été pris en compte. Les résultats sont détaillés dans le Tableau 3.

Les facteurs prédictifs de la reconstitution hématologique post greffe sont très différents de ceux du chimérisme décrits plus haut. En effet, comme attendu, on retrouve un impact majeur de la richesse cellulaire du greffon, à la fois sur la reconstitution myeloïde (p=0,02) mais

aussi sur les plaquettes (p=0,04) et ce, que l'évaluation soit faite à partir des cellules $CD34^+$ mais également des CNT ou des cellules $CD3^+$ (analyses complémentaires jointes : Tableaux 3bis et 3ter).

5. Impact de la survenue d'un chimérisme complet (>99,9% donneur) sur le devenir post greffe :

L'étude de tableaux croisés a pour but de rechercher des associations entre l'apparition d'un chimérisme complet (cDC) au cours du temps et divers paramètres du devenir post greffe (résultats détaillés dans le Tableau 4).

Les patients qui présentent un chimérisme complet au cours du temps, ont un risque significativement plus élevé de survenue de GvHD aigue ou chronique. D'un autre coté, parmi les patients qui n'ont jamais présenté de cDC au cours du temps, aucun n'a développé ni de GvHD aigue sévère (p=0,02), ni de GvHD chronique (p=0,01). De plus, le fait de développer un c-DC au cours du $1^{er}$ mois post greffe est un fort critère prédictif de GvHD à la fois aigue et chronique. En effet, parmi les 57 enfants n'ayant pas présenté de cDC précoce, un seul a développé une GvHD aigue de grade 3-4.

Toujours en s'intéressant au chimérisme précoce, on constate que parmi les patients qui ont développé un chimérisme complet au cours du premier mois post greffe, aucun n'a rejeté sa greffe ($p=3.10^{-3}$).

Enfin, aucune association significative n'est mise en évidence entre l'apparition d'un cDC et la rechute, la TRM, ni les décès totaux post greffe.

6. Influence du chimérisme précoce sur la reconstitution hématologique :

Nous avons ensuite regardé s'il existait une correlation entre le chimérisme précoce et la rapidité de reconstitution hématologique. La figure 3A représente l'incidence cumulative de la reconstitution myéloïde (PNN>0,5giga/l) en fonction de la présence ou pas d'un c-DC au cours du premier mois. Les patients qui vont développer un chimérisme >99,9% donneur

dans le premier mois post greffe vont sortir d'aplasie significativement plus vite que les autres (p=0,04).

Cette relation n'est plus significative avec un chimérisme précoce >99% donneur (n-cDC) comme le montre la figure 3B. Aucune association n'est retrouvée entre le chimérisme du premier mois et la rapidité de reconstitution plaquettaire.

## DISCUSSION :

Nous présentons ici une étude prospective réalisée dans le service d'hématologie pédiatrique de l'hôpital de la Timone-Enfants à Marseille. Sur une cohorte de 94 enfants greffés par une unité de sang placentaire non apparentée, pour des pathologies malignes ou non malignes, les données séquentielles de chimérisme ont été analysée selon la technique Taqman. L'objectif était d'évaluer la probabilité de survenue d'un chimérisme complet ou mixte au cours du temps en tenant compte des risques compétitifs, d'en identifier les facteurs prédictifs par la mise en place de modèles multivariés, et d'évaluer son impact sur le devenir après greffe. Trois facteurs prédictifs du chimérisme ont été identifiés: Le caractère malin de la pathologie initiale, l'âge avec comme facteur péjoratif un âge à la greffe inferieur à 2 ans et la compatibilité HLA qui lorsqu'elle est moindre est associée à une probabilité d'apparition d'un chimérisme complet au cours du temps plus importante.

Les enfants greffés dans le cadre de pathologies non malignes développent un chimérisme complet de type donneur moins fréquemment que ceux greffés pour pathologies malignes. Cette particularité a déjà été décrite dans les greffes de moelle osseuse ou de cellules souches périphériques (CSP) (Park et al., 2011; Svenberg et al., 2009) et pourrait en partie être expliquée par l'absence de chimiothérapie antérieure en cas de pathologies non malignes. Plusieurs études ont en effet, déjà suggéré que le chimérisme après greffe pour pathologie maligne était influencé par la quantité de chimiothérapie totale reçue (Berglund et al., 2012; Mohty et al., 2007; Saito et al., 2008). Dans leur étude sur 50 greffes de sang placentaire non apparentées, Berglund et al suggèrent également que le caractère malin de la maladie initiale augmente la probabilité de survenue d'un chimérisme complet bien que le seuil de significativité n'ait pas été atteint dans leur analyse multivariée (Berglund et al., 2012). D'autres facteurs tels que le jeune âge et/ou le type de conditionnement pré-greffe (et notamment l'absence d'irradiation corporelle totale) pourraient également expliquer cette plus faible survenue d'un cDC chez les patients greffés pour pathologie non maligne (Stikvoort et al., 2013). La plus grande étude sur la greffe dans le cadre de la maladie de Hurler (Boelens et al., 2013) a été faite sur des enfants dont l'âge médian à la greffe était de 16,7 mois et presque tous ont reçus un conditionnement myeloablatif à base de Busulfan. Dans cette étude, un chimérisme mixte (<95% donneur) est retrouvé chez 30 à 50% des enfants greffés en génoidentique ou en phénoidentique 10/10. De manière intéressante, l'apparition d'un chimérisme mixte était moins fréquente après greffe de sang placentaire et

bien que l'impact de la compatibilité HLA sur le chimérisme post greffe n'ait pas été rapporté, on remarque que plus de 80% des cordons transplantés avaient une compatibilité HLA <6/6$^{ème}$ avec le receveur.

La compatibilité HLA apparaît elle aussi comme facteur prédictif du chimérisme post greffe de sang placentaire. En effet, une compatibilité de type 4/6$^{ème}$ est associée à une probabilité supérieure de survenue d'un cDC par rapport aux greffes réalisées avec une compatibilité HLA de type 5 ou 6/6$^{ème}$. De plus, ces résultats ne semblent pas influencés par la quantité cellulaire injectée. Ces données peuvent paraître contradictoires avec le raisonnement scientifique habituellement admit qui voudrait que la reconstitution hématologique soit d'autant meilleure que la compatibilité HLA est élevée et que la quantité cellulaire injectée est importante (Eapen et al., 2013; Gluckman et al., 2004; Locatelli et al., 1999; Wagner et al., 2002). En fait, nos résultats retrouvent également que la quantité cellulaire injectée améliore significativement la reconstitution myéloïde et ainsi que celle des plaquettes et qu'une compatibilité plus faible entre donneur et receveur a un impact défavorable bien que cette relation, plus tardive, n'atteigne pas le seuil de significativité (tableau 3). Ces résultats suggèrent que la reconstitution hématologique et le chimérisme post greffe sont deux concepts distincts et sont influencés par des facteurs différents. La reconstitution hématologique dépend de la capacité de prise de greffe des cellules injectées chez un hôte donné, alors que le chimérisme reflète l'alloréactivité du système immunitaire du donneur. Dans ce contexte, une plus grande disparité HLA entre donneur et receveur pourrait augmenter l'alloreactivité du greffon contre les cellules hématopoïétiques résiduelles de l'hôte ce qui se traduirait par une capacité plus forte pour le greffon à maintenir parmi les cellules circulantes, un chimérisme en sa faveur (ce qui est à différencier de la prise de greffe). Stikvoort et al. retrouvent, dans leur étude sur le chimérisme après greffe de moelle osseuse ou de cellules souches périphériques pour pathologies non malignes, que la persistance d'un chimérisme mixte est plus fréquente lorsque donneur et receveur sont apparentés par comparaison aux volontaires non apparentés. Ils expliquent ces résultats par la plus grande similarité des Ag HLA mais aussi des Ag mineurs d'histocompatibilité entre donneur/receveur qui pourrait se traduire par une moindre capacité des cellules transplantées à induire une réaction immunitaire contre les cellules de l'hôte.

Une autre étude, sur le chimérisme après double greffe de sang placentaire cette fois (Verneris et al., 2012), permet également d'appuyer notre hypothèse. En effet, chez ces

patients, une seule unité prédomine à J100 chez presque 90% d'entre eux, conséquence de l'effet appelé « graft versus graft » (effet allogénique d'un greffon contre l'autre) mais dans de rares cas, les patients présentent un chimérisme double c'est à dire la persistance des 2 unités placentaires avec une contribution hématopoïétique minimum de 5% pour chacune des unités. Les auteurs précisent de plus, que les patients ayant reçus 2 unités de sang placentaire 6/6ème (entre elles et avec le receveur) avaient plus souvent un chimérisme double, moins de GvHD aigue et plus de rechutes suggérant une plus faible alloreactivité de ces greffons compatibles.

Dans les greffes de moelle osseuse ou de CSP, l'association très forte entre le chimérisme et le risque de rechute été bien documenté. Les enfants greffés pour leucémies aigues qui présentent un chimérisme de plus en plus mixte avec le temps sont à haut risque de rechute (Bader et al., 1998, 1997; Bader et al., 2004a; Bader et al.,2004b; Barrios et al., 2003). Dans notre étude, comme dans une autre étude après greffe de sang placentaire (Berglund et al., 2012), nous ne mettons pas en évidence d'association significative entre le chimérisme et le risque de rechute. Cela ne doit pas être interprété comme une différence entre les greffes de sang placentaire et les autres sources de cellules souches hématopoïétiques mais probablement comme un manque de puissance de notre étude qui inclut à la fois des pathologies malignes et non malignes. Bien que l'analyse de l'association entre chimérisme et rechute était restreinte aux enfants atteints de pathologies malignes, elle n'a été réalisée que sur 69 enfants qui présentaient des pathologies différentes et un statut hématologique variable au moment de la greffe. Par conséquence, il est raisonnable de considérer que la relation entre chimérisme et rechute n'est pas interprétable dans cette étude.

En ce qui concerne l'impact du chimérisme sur le devenir post greffe notre étude retrouve une forte association avec la prise de greffe et la survenue de GvHD. Cette très nette corrélation entre la présence d'un chimérisme complet de type donneur et la survenue de GvHD a déjà été décrite de multiples fois, après greffe de moelle osseuse ou de CSP (Mohty et al., 2007; Nikolousis et al., 2013; Rupa-Matysek et al., 2011; Stikvoort et al., 2013; Svenberg et al., 2009). Notre étude démontre que cette association est particulièrement forte après greffe de sang placentaire. En effet, aucun des enfants n'ayant jamais présenté de cDC ne vont developper de GvHD aigue sévère ou chronique. Notre technique de quantification du chimérisme ayant un seuil de sensibilité de 0,1%, nous en déduisons qu'une hématopoïèse résiduelle bien que minime de type « receveur » protègerait de la survenue de GvHD. De

plus, très peu de patients ne présentant pas de cDC durant le premier mois post greffe ne développent de GvHD sévère par la suite. Le chimérisme précoce pourrait donc être un outil clinique précieux pour prédire la survenue ou pas de GvHD sévère.

En conclusion, notre étude a permis d'identifier 3 facteurs prédictifs du chimérisme post greffe de cellules souches de sang placentaire non apparentée chez l'enfant : Le caractère malin de la pathologie initiale, l'âge avec comme facteur péjoratif un âge à la greffe inferieur à 2 ans et la compatibilité HLA qui lorsqu'elle est moindre est associée à une probabilité d'apparition d'un chimérisme complet au cours du temps plus importante. Bien que la quantité cellulaire injectée ait un fort impact sur la reconstitution hématologique après greffe, elle n'a aucune influence sur le chimérisme. Par contre, un chimérisme complet précoce de type donneur s'avère très utile pour prédire à la fois la prise de greffe mais aussi la survenue de GvHD aigue et chronique.

## TABLEAUX ET FIGURES :

**Tableau 1 :** Caractéristiques des patients et des traitements :

| Caractéristiques des patients (n=94) | |
|---|---|
| Genre (Garçons/Filles) | 53/41 |
| Age à la greffe (années):<br>Moyenne ± SEM<br>Médiane (IQR) | <br>6.64 ± 0.48<br>6.30 (2.16-9.85) |
| Diagnostic :<br>Pathologies Malignes / Non malignes | <br>69/25 |
| Sérologie CMV pré-greffe : +/- | 39/55 |
| Greffe de sang placentaire (n=94) | |
| Conditionnement de greffe :<br>ICT versus no ICT | <br>49/45 |
| Compatibilité HLA donneur/receveur :<br>- 0 disparité (6/6)<br>- 1 disparité (5/6)<br>- 2 disparités (4/6) | <br>12 (12.8%)<br>42 (44.7%)<br>40 (42.6%) |
| Cellules nucléées totales congelées ($x10^7$/kg)<br>Moyenne ± SEM<br>Médiane (IQR) | <br>9.49 ± 0.75<br>7.29 (5.11-11.21) |
| Cellules nucléées totales injectées ($x10^7$/kg)<br>Moyenne ± SEM<br>Médiane (IQR) | <br>7.39 ± 0.58<br>5.78 (3.99-8.95) |
| CD34+ injectées ($x10^5$/kg)<br>Moyenne ± SEM<br>Médiane (IQR) | <br>2.4 ± 0.2<br>1.7 (1.0-2.9) |
| CD45+ injectées ($x10^7$/kg)<br>Moyenne ± SEM<br>Médiane (IQR) | <br>4.20 ± 0.34<br>3.36 (2.29-4.80) |
| CD3+ injectées ($x10^6$/kg)<br>Moyenne ± SEM<br>Médiane (IQR) | <br>11.33 ± 1.07<br>8.22 (6.08-13.10) |
| Devenir post greffe | |
| GvHDa grade ≥ 2 | 24/94 (25.5%) |
| GvHDa grade ≥3 | 8/94 (8.5%) |
| GvHDc * | 10/86 (11.6%) |
| Rejet de greffe / Reconstitution autologue | 11/94 (11.7%) |
| Rechutes (pathologies malignes) ** | 19/69 (27.5%) |
| Décès iatrogènes :<br>Incidence cumulée à J100<br>Incidence cumulée à 5 ans | <br>5% ± 2%<br>15% ± 4% |
| Survie globale à 5 ans | 68% ± 5% |

ICT : Irradiation Corporelle Totale
GvHD : Graft versus Host Disease (maladie du greffon contre l'hôte)
*: Sur les 86 patients vivants évaluables à J100
**: Sur 69 patients greffés pour pathologie maligne

**Tableau 2:** Facteurs prédictifs de la survenue d'un chimérisme complet : analyse multivariée

| FACTEURS PREDICTIFS | Chimérisme atteint | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Chimérisme >99,9% donneur (cDC) | | Chimérisme >99% donneur (n-cDC) | |
| | Hazard ratio (95%CI) | *p* value | Hazard ratio (95%CI) | *p* value |
| Diagnostic :<br>Pathologie Malignes vs Non malignes* | 2.41 (1.11-5.26) | 0.03 | 2.94 (1.67-5.17) | $1.8 \times 10^{-4}$ |
| Age à la greffe :<br>1er quartile* (age < 2.16 ans) *vs* les autres | 4.29 (1.64-11.21) | $2.9 \times 10^{-3}$ | 2.34 (1.30-4.21) | $4.5 \times 10^{-3}$ |
| ICT *vs* pas ICT* | 1.20 (0.69-2.07) | 0.52 | 0.73 (0.49-1.09) | 0.12 |
| Compatibilité HLA donneur/receveur :<br>Compatibilité 4/6 *vs* 5-6/6 * | 2.18 (1.38-3.44) | $8.7 \times 10^{-4}$ | 1.47 (1.04-2.07) | 0.03 |
| CD34+ injectées ** | 1.09 (0.97-1.24) | 0.15 | 1.05 (0.97-1.14) | 0.24 |

* : reference group for odd ratio estimation
** : odd ratio are given for each additional 1 x $10^5$ CD34+ cell dose
ICT : Irradiation Corporelle Totale

**Tableau 3:** Facteurs prédictifs de la reconstitution hématologique post greffe : analyse multivariée

| FACTEURS PREDICTIFS | Type de reconstitution | | | |
|---|---|---|---|---|
| | PNN > 0.5 giga/l | | Plaquettes > 50 giga/l | |
| | Hazard ratio (95%CI) | *p* value | Hazard ratio (95%CI) | *p* value |
| Diagnostic :<br>Pathologie Malignes vs Non malignes* | 1.96 (1.01-3.80) | 0.05 | 1.25 (0.58-2.68) | 0.57 |
| Age à la greffe :<br>1er quartile* (age < 2.16 ans) *vs* les autres | 0.74 (0.37-1.47) | 0.39 | 0.91 (0.42-1.98) | 0.81 |
| ICT *vs* pas ICT* | 0.70 (0.40-1.21) | 0.20 | 1.16 (0.63-2.12) | 0.64 |
| Compatibilité HLA donneur/receveur :<br>Compatibilité 4/6 *vs* 5-6/6 * | 0.73 (0.50-1.06) | 0.10 | 0.66 (0.41-1.09) | 0.10 |
| CD34+ injectées ** | 1.13 (1.02-1.25) | 0.02 | 1.12 (1-1.26) | 0.04 |

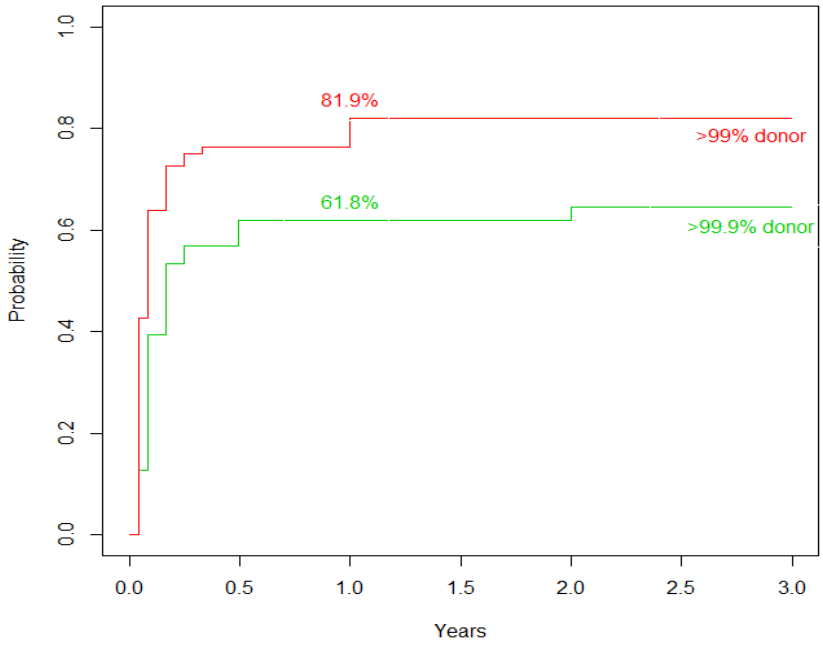
* : reference group for odd ratio estimation
** : odd ratio are given for each additional 1 x $10^5$ $CD34^+$ cell dose
ICT : Irradiation Corporelle Totale

**Tableau 4 :** Influence de la survenue d'un chimérisme complet de type donneur ( > 99.9% donneur) sur le devenir post greffe :

| DEVENIR POST GREFFE | Survenue d'un chimérisme >99.9% donneur au cours du temps | | Survenue d'un chimérisme >99.9% donneur dans le 1er mois post greffe | |
|---|---|---|---|---|
| | Oui (n=58) vs non (n=36) | *p* value | Oui (n=37) vs non (n=57) | *p* value |
| Rejet de greffe/ Reconstitution autologue | 0 (0%) / 11 (30.6%) | $<1x10^{-3}$ | 0 (0%) / 11 (19.3%) | $3 \times 10^{-3}$ |
| GvHD aigue grade ≥ 2 | 22 (37.9%) / 2 (5.6%) | $<1x10^{-3}$ | 17 (45.9%) / 7 (12.3%) | $<1 \times 10^{-3}$ |
| GvHD aigue grade ≥ 3 | 8 (13.8%) / 0 (0%) | 0.02 | 7 (18.9%) / 1 (1.8%) | $6 \times 10^{-3}$ |
| GvHD chronique* | 10 (64%) / 0 (0%) | 0.01 | 7 (20.6%) / 3 (5.8%) | 0.05 |
| Rechute** | 13 (26%) / 6 (31.6%) | 0.64 | 7 (20.6%) / 12 (34.3%) | 0.20 |
| Décès iatrogènes | 9 (15.5%) / 5 (13.9%) | 0.83 | 7 (18.9%) / 7 (12.3%) | 0.38 |
| Mortalité globale | 19 (32.8%) / 11 (30.6%) | 0.82 | 12 (32.4%) / 18 (31.6%) | 0.93 |

*: Sur les 86 patients vivants à J100 évaluables
**: Sur 69 patients greffés pour pathologie maligne

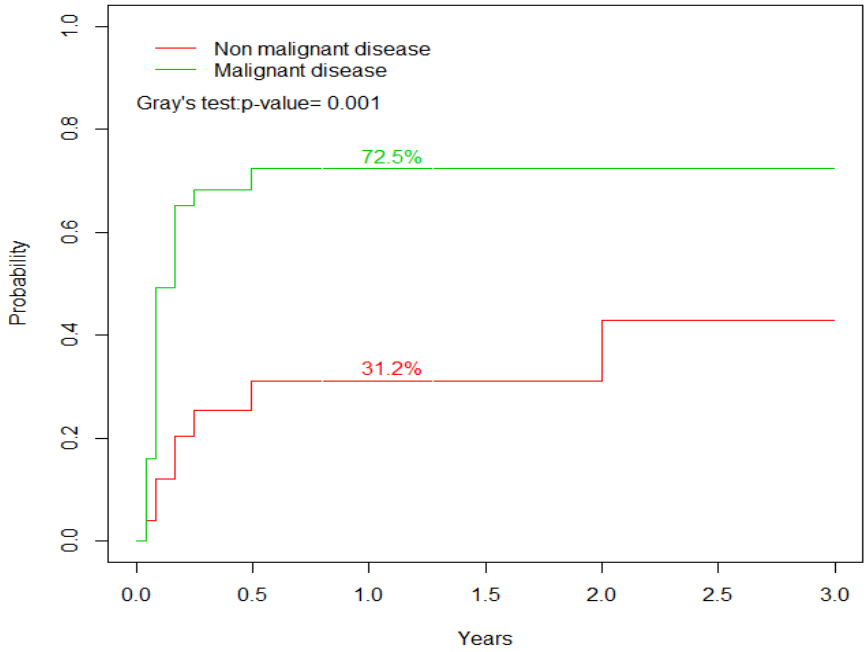
**Figure 1 :** Incidence cumulative pour la survenue d'un chimérisme complet de type donneur au cours du temps, en tenant compte des 2 risques compétitifs (Décès iatrogène et rechute):



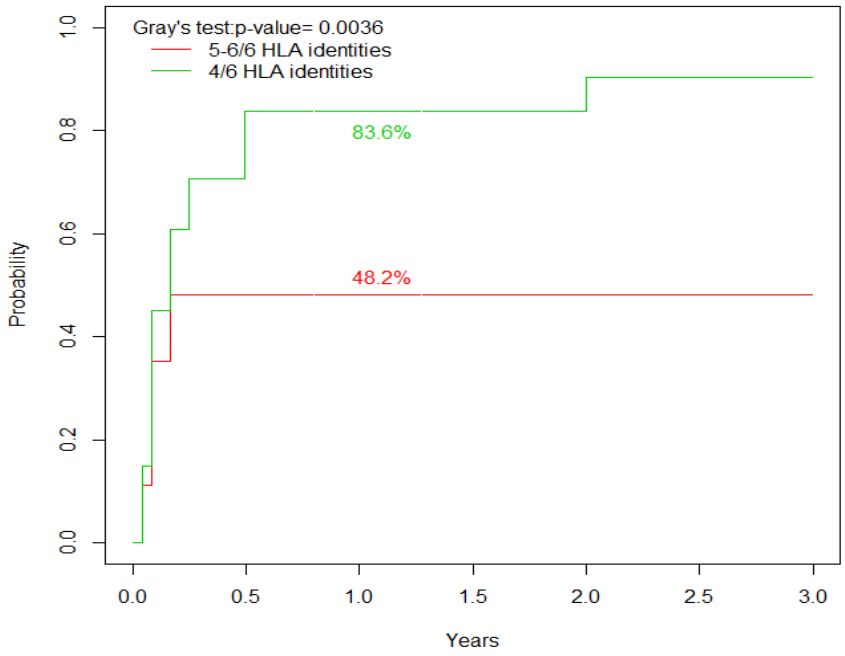

- Chimérisme > 99.9% donneur (cDC)
- Chimérisme > 99 % donneur (n-cDC)

**Figure 2 :** Facteurs prédictifs pour la survenue d'un chimérisme > 99.9% donneur (cDC)

A : Influence du caractère malin ou non malin de la pathologie initiale



B : Influence de la compatibilité HLA donneur/receveur (4/6ème vs 5-6/6ème )




C : Influence de l'âge à la greffe (reparti en quartile)

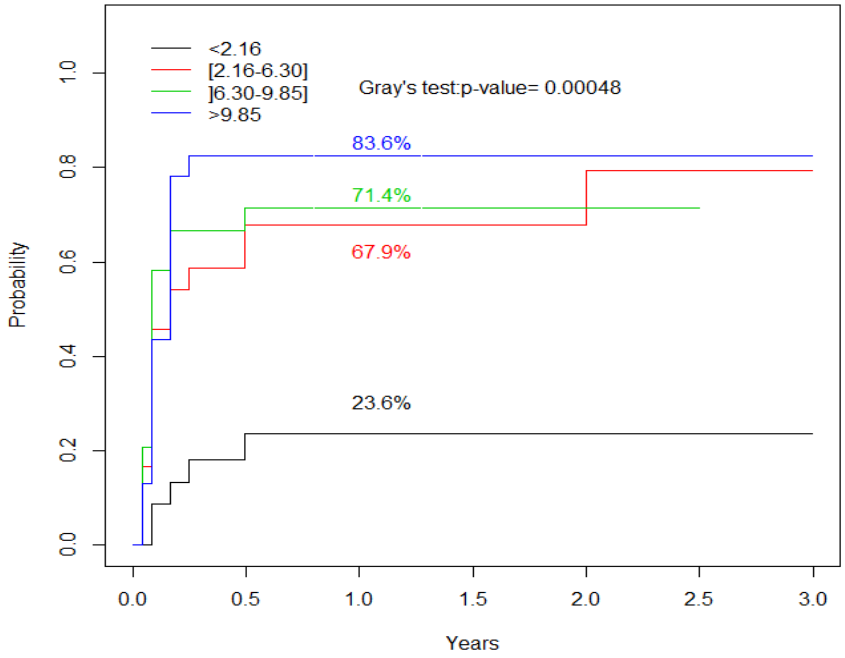
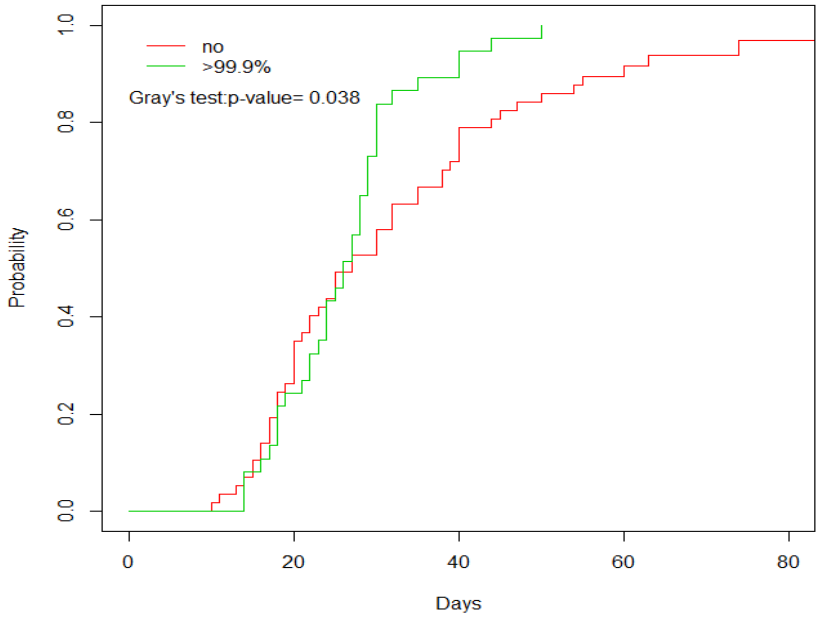
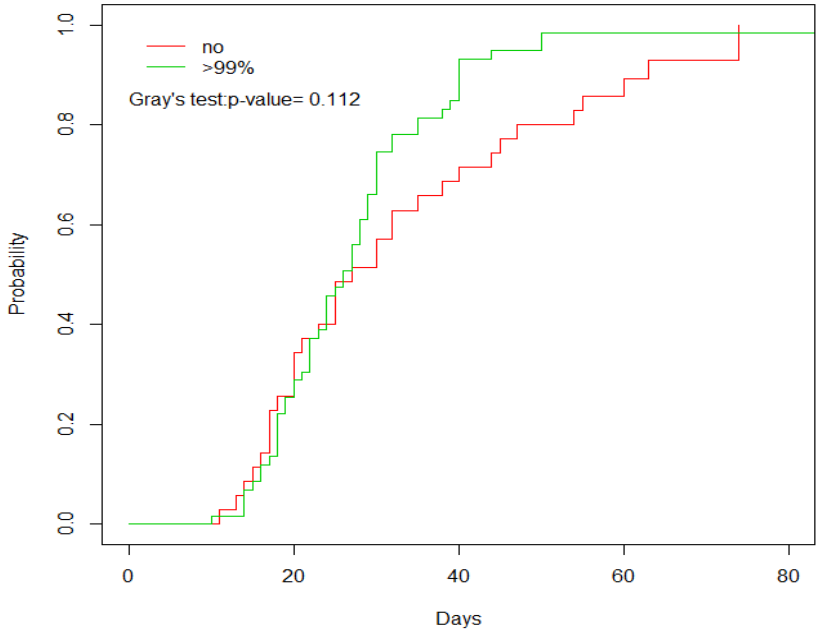


**Figure 3 :** Influence du chimérisme précoce sur la reconstitution hématologique :

A : Incidence cumulative de la reconstitution myéloïde (PNN> 0.5 giga/l) en fonction de la survenue ou pas d'un chimérisme > 99.9% donneur au cours du 1er mois post greffe




B : Incidence cumulative de la reconstitution myéloïde (PNN> 0.5 giga/l) en fonction de la survenue ou pas d'un chimérisme > 99% donneur au cours du 1er mois post greffe



## FICHIERS SUPPLEMENTAIRES

**Tableaux 2 bis:** Facteurs prédictifs de la survenue d'un chimérisme complet : analyse multivariée

| FACTEURS PREDICTIFS | Chimérisme atteint | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Chimérisme >99,9% donneur (cDC) | | Chimérisme >99% donneur (n-cDC) | |
| | Hazard ratio (95%CI) | *p* value | Hazard ratio (95%CI) | *p* value |
| Diagnostic :<br>Pathologie Malignes vs Non malignes* | 2.31 (1.01-5.30) | 0.05 | 2.54 (1.50-4.30) | $5.1x10^{-4}$ |
| Age à la greffe :<br>1er quartile* (age < 2.16 ans) *vs* les autres | 3.99 (1.50-10.6) | $5.5x10^{-3}$ | 1.64 (0.88-3.03) | 0.12 |
| ICT *vs* pas ICT* | 1.18 (0.68-2.06) | 0.56 | 0.76 (0.51-1.13) | 0.17 |
| Compatibilité HLA donneur/receveur :<br>Compatibilité 4/6 *vs* 5-6/6 * | 2.17 (1.39-3.39) | $7.1x10^{-4}$ | 1.42 (1.01-2.00) | 0.05 |
| Cellules nucléées totales injectées ** | 1.02 (0.96-1.08) | 0.57 | 0.97 (0.92-1.02) | 0.23 |

* : reference group for odd ratio estimation
** : odd ratio are given for each additional 1 x $10^7$ total nucleated cell dose
ICT : Irradiation Corporelle Totale

**Tableau 2ter:** Facteurs prédictifs de la survenue d'un chimérisme complet : analyse multivariée

| FACTEURS PREDICTIFS | Chimérisme atteint | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Chimérisme >99,9% donneur (cDC) | | Chimérisme >99% donneur (n-cDC) | |
| | Hazard ratio (95%CI) | *p* value | Hazard ratio (95%CI) | *p* value |
| Diagnostic :<br>Pathologie Malignes vs Non malignes* | 2.20 (0.98-4.94) | 0.06 | 2.53 (1.50-4.26) | $5 \times 10^{-4}$ |
| Age à la greffe :<br>1er quartile* (age < 2.16 ans) *vs* les autres | 3.53 (1.46-8.53) | $5 \times 10^{-3}$ | 1.61 (0.88-2.96) | 0.12 |
| ICT *vs* pas ICT* | 1.19 (0.69-2.08) | 0.53 | 0.76 (0.52-1.12) | 0.17 |
| Compatibilité HLA donneur/receveur :<br>Compatibilité 4/6 *vs* 5-6/6 * | 2.15 (1.37-3.36) | $8.7x10^{-4}$ | 1.47 (1.05-2.05) | 0.03 |
| Cellules CD3+ injectées ** | 1 (0.97-1.03) | 0.93 | 0.98 (0.95-1.01) | 0.14 |

* : reference group for odd ratio estimation
** : odd ratio are given for each additional 1 x $10^6$ CD3+ T cell dose
ICT : Irradiation Corporelle Totale

**Table 3 bis:** Facteurs prédictifs de la reconstitution hématologique post greffe : analyse multivariée

| FACTEURS PREDICTIFS | Type de reconstitution | | | |
|---|---|---|---|---|
| | PNN > 0.5 giga/l | | Plaquettes > 50 giga/l | |
| | Hazard ratio (95%CI) | *p* value | Hazard ratio (95%CI) | *p* value |
| Diagnostic :<br>Pathologie Malignes vs Non malignes* | 1.71 (0.93-3.16) | 0.09 | 1.05 (0.50-2.20) | 0.90 |
| Age à la greffe :<br>1er quartile* (age < 2.16 ans) *vs* les autres | 1.08 (0.56-2.08) | 0.82 | 1.02 (0.45-2.31) | 0.97 |
| ICT *vs* pas ICT* | 0.78 (0.44-1.37) | 0.38 | 1.27 (0.66-2.45) | 0.48 |
| Compatibilité HLA donneur/receveur :<br>Compatibilité 4/6 *vs* 5-6/6 * | 0.83 (0.57-1.22) | 0.34 | 0.68 (0.42-1.10) | 0.12 |
| CNT injectées ** | 1.14 (1.09-1.18) | $2.8 \times 10^{-10}$ | 1.07 (0.99-1.14) | 0.09 |

* : reference group for odd ratio estimation
** : odd ratio are given for each additional $1 \times 10^7$ total nucleated cell dose
ICT : Irradiation Corporelle Totale
CNT : Cellules Nucléés Totales

**Table 3ter:** Facteurs prédictifs de la reconstitution hématologique post greffe : analyse multivariée

| FACTEURS PREDICTIFS | Type de reconstitution | | | |
|---|---|---|---|---|
| | PNN > 0.5 giga/l | | Plaquettes > 50 giga/l | |
| | Hazard ratio (95%CI) | *p* value | Hazard ratio (95%CI) | *p* value |
| Diagnostic :<br>Pathologie Malignes vs Non malignes* | 1.69 (0.90-3.15) | 0.10 | 1.07 (0.50-2.29) | 0.86 |
| Age à la greffe :<br>1er quartile* (age < 2.16 ans) *vs* les autres | 0.96 (0.46-2.01) | 0.91 | 1.04 (0.46-2.38) | 0.92 |
| ICT *vs* pas ICT* | 0.75 (0.43-1.32) | 0.32 | 1.27 (0.66-2.45) | 0.47 |
| Compatibilité HLA donneur/receveur :<br>Compatibilité 4/6 *vs* 5-6/6 * | 0.69 (0.48-1.00) | 0.05 | 0.62 (0.39-0.99) | 0.05 |
| CD3+ injectées ** | 1.05 (1.02-1.08) | $5.9 \times 10^{-4}$ | 1.04 (1.00-1.01) | 0.04 |

* : reference group for odd ratio estimation
** : odd ratio are given for each additional $1 \times 10^6$ CD3+ T cell dose
ICT : Irradiation Corporelle Totale

**Table 4 bis :** Influence de la survenue d'un chimérisme quasi-complet de type donneur (> 99% donneur) sur le devenir post greffe :

| DEVENIR POST GREFFE | Survenue d'un chimérisme >99% donneur au cours du temps | | Survenue d'un chimérisme >99% donneur dans le 1er mois post greffe | |
|---|---|---|---|---|
| | Oui (n=74) vs non (n=20) | *p* value | Oui (n=59) vs non (n=35) | *p* value |
| Rejet de greffe/ Reconstitution autologue | 1 (1.4%) / 10 (50%) | $<1 \times 10^{-3}$ | 1 (1.7%) / 10 (28.6%) | $<1 \times 10^{-3}$ |
| GvHD aigue grade ≥ 2 | 22 (29.7%) / 2 (10%) | 0.07 | 18 (30.5%) / 6 (17.1%) | 0.15 |
| GvHD aigue grade ≥ 3 | 8 (10.8%) / 0 (0%) | 0.20 | 7 (11.9%) / 1 (2.9%) | 0.25 |
| GvHD chronique* | 10 (14.1%) /0 (0%) | 0.20 | 8 (14.3%) / 2 (6.7%) | 0.48 |
| Rechute** | 17 (27.9%) / 2 (25%) | 1 | 14 (26.9%) / 5 (29.4%) | 1 |
| Décès iatrogène | 10 (13.5%) / 4 (20%) | 0.49 | 10 (16.9%) / 4 (11.4%) | 0.47 |
| Mortalité globale | 24 (32.4%) / 6 (30%) | 0.84 | 21 (35.6%) / 9 (25.7%) | 0.32 |

*: Sur les 86 patients vivants à J100 évaluables

**: Sur 69 patients greffés pour pathologie maligne

## BIBLIOGRAPHIE :


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

Bader, P., Beck, J., Frey, A., Schlegel, P.G., Hebarth, H., Handgretinger, R., Einsele, H., Niemeyer, C., Benda, N., Faul, C., Kanz, L., Niethammer, D., Klingebiel, T., 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., Hölle, W., Klingebiel, T., Handgretinger, R., Benda, N., Schlegel, P.G., Niethammer, D., Beck, J., 1997. Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic bone marrow transplantation: the impact of quantitative PCR analysis for prediction of relapse and graft rejection in children. Bone Marrow Transplant. 19, 697–702.

Bader, P., Kreyenberg, H., Hoelle, W., Dueckers, G., Handgretinger, R., Lang, P., Kremens, B., Dilloo, D., Sykora, K.-W., Schrappe, M., Niemeyer, C., Von Stackelberg, A., Gruhn, B., Henze, G., Greil, J., Niethammer, D., Dietz, K., Beck, J.F., Klingebiel, T., 2004a. 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. J. Am. Soc. Clin. Oncol. 22, 1696–1705.

Bader, P., Kreyenberg, H., Hoelle, W., Dueckers, G., Kremens, B., Dilloo, D., Sykora, K.-W., Niemeyer, C., Reinhardt, D., Vormoor, J., Gruhn, B., Lang, P., Greil, J., Handgretinger, R., Niethammer, D., Klingebiel, T., Beck, J.F., 2004b. Increasing mixed chimerism defines a high-risk group of childhood acute myelogenous leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation where pre-emptive immunotherapy may be effective. Bone Marrow Transplant. 33, 815–821.

Barker, J.N., Byam, C., Scaradavou, A., 2011. How I treat: the selection and acquisition of unrelated cord blood grafts. Blood 117, 2332–2339.

Barrios, M., Jiménez-Velasco, A., Román-Gómez, J., Madrigal, M.E., Castillejo, J.A., Torres, A., Heiniger, A., 2003. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. Haematologica 88, 801–810.

Berglund, S., Le Blanc, K., Remberger, M., Gertow, J., Uzunel, M., Svenberg, P., Winiarski, J., Ljungman, P., Ringdén, O., Uhlin, M., Mattsson, J., 2012. Factors with an impact

on chimerism development and long-term survival after umbilical cord blood transplantation. Transplantation 94, 1066–1074.

Boelens, J.J., Aldenhoven, M., Purtill, D., Ruggeri, A., Defor, T., Wynn, R., Wraith, E., Cavazzana-Calvo, M., Rovelli, A., Fischer, A., Tolar, J., Prasad, V.K., Escolar, M., Gluckman, E., O'Meara, A., Orchard, P.J., Veys, P., Eapen, M., Kurtzberg, J., Rocha, V., Eurocord, Inborn Errors Working Party of European Blood and Marrow Transplant group, Duke University Blood and Marrow Transplantation Program, Centre for International Blood and Marrow Research, 2013. Outcomes of transplantation using various hematopoietic cell sources in children with Hurler syndrome after myeloablative conditioning. Blood 121, 3981–3987.

Eapen, M., Klein, J.P., Ruggeri, A., Spellman, S., Lee, S.J., Anasetti, C., Arcese, W., Barker, J.N., Baxter-Lowe, L.A., Brown, M., Fernandez-Vina, M.A., Freeman, J., He, W., Iori, A.P., Horowitz, M.M., Locatelli, F., Marino, S., Maiers, M., Michel, G., Sanz, G.F., Gluckman, E., Rocha, V., 2013. Impact of allele-level HLA matching on outcomes after myeloablative single unit umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancy. Blood.

Eapen, M., Rubinstein, P., Zhang, M.-J., Stevens, C., Kurtzberg, J., Scaradavou, A., Loberiza, F.R., Champlin, R.E., Klein, J.P., Horowitz, M.M., Wagner, J.E., 2007. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. Lancet 369, 1947–1954.

Fine, J.P., 2001. Regression modeling of competing crude failure probabilities. Biostat. Oxf. Engl. 2, 85–97.

Gluckman, E., Rocha, V., Arcese, W., Michel, G., Sanz, G., Chan, K.-W., Takahashi, T.A., Ortega, J., Filipovich, A., Locatelli, F., Asano, S., Fagioli, F., Vowels, M., Sirvent, A., Laporte, J.-P., Tiedemann, K., Amadori, S., Abecassis, M., Bordigoni, P., Diez, B., Shaw, P.J., Vora, A., Caniglia, M., Garnier, F., Ionescu, I., Garcia, J., Koegler, G., Rebulla, P., Chevret, S., Eurocord Group, 2004. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. Exp. Hematol. 32, 397–407.

Gooley, T.A., Leisenring, W., Crowley, J., Storer, B.E., 1999. Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: new representations of old estimators. Stat. Med. 18, 695–706.

Lamba, R., Abella, E., Kukuruga, D., Klein, J., Savasan, S., Abidi, M.H., Mohamed, A., Peres, E., 2004. Mixed hematopoietic chimerism at day 90 following allogenic

myeloablative stem cell transplantation is a predictor of relapse and survival. Leukemia 18, 1681–1686.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods San Diego Calif 25, 402–408.

Locatelli, F., Rocha, V., Chastang, C., Arcese, W., Michel, G., Abecasis, M., Messina, C., Ortega, J., Badell-Serra, I., Plouvier, E., Souillet, G., Jouet, J.P., Pasquini, R., Ferreira, E., Garnier, F., Gluckman, E., 1999. Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord-Cord Blood Transplant Group. Blood 93, 3662–3671.

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

Moscardó, F., Sanz, J., Senent, L., Cantero, S., de la Rubia, J., Montesinos, P., Planelles, D., Lorenzo, I., Cervera, J., Palau, J., Sanz, M.A., Sanz, G.F., 2009. Impact of hematopoietic chimerism at day +14 on engraftment after unrelated donor umbilical cord blood transplantation for hematologic malignancies. Haematologica 94, 827–832.

Nikolousis, E., Robinson, S., Nagra, S., Brookes, C., Kinsella, F., Tauro, S., Jeffries, S., Griffiths, M., Mahendra, P., Cook, M., Paneesha, S., Lovell, R., Kishore, B., Chaganti, S., Malladi, R., Raghavan, M., Moss, P., Milligan, D., Craddock, C., 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.

Park, M., Koh, K.N., Seo, J.J., Im, H.J., 2011. Clinical implications of chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children with non-malignant diseases. Korean J. Hematol. 46, 258–264.

Prasad, V.K., Mendizabal, A., Parikh, S.H., Szabolcs, P., Driscoll, T.A., Page, K., Lakshminarayanan, S., Allison, J., Wood, S., Semmel, D., Escolar, M.L., Martin, P.L., Carter, S., Kurtzberg, J., 2008. Unrelated donor umbilical cord blood transplantation for inherited metabolic disorders in 159 pediatric patients from a single center: influence of cellular composition of the graft on transplantation outcomes. Blood 112, 2979–2989.

Rocha, V., Cornish, J., Sievers, E.L., Filipovich, A., Locatelli, F., Peters, C., Remberger, M., Michel, G., Arcese, W., Dallorso, S., Tiedemann, K., Busca, A., Chan, K.W., Kato, S., Ortega, J., Vowels, M., Zander, A., Souillet, G., Oakill, A., Woolfrey, A., Pay, A.L., Green, A., Garnier, F., Ionescu, I., Wernet, P., Sirchia, G., Rubinstein, P., Chevret, S., Gluckman, E., 2001. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. Blood 97, 2962–2971.

Rupa-Matysek, J., Lewandowski, K., Nowak, W., Sawiński, K., Gil, L., 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.

Saito, B., Fukuda, T., Yokoyama, H., Kurosawa, S., Takahashi, T., Fuji, S., Takahashi, N., Tajima, K., Kim, S.-W., Mori, S.-I., Tanosaki, R., Takaue, Y., Heike, Y., 2008. Impact of T cell chimerism on clinical outcome in 117 patients who underwent allogeneic stem cell transplantation with a busulfan-containing reduced-intensity conditioning regimen. Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant. 14, 1148–1155.

Stikvoort, A., Gertow, J., Sundin, M., Remberger, M., Mattsson, J., 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. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant. 19, 838–844.

Svenberg, P., Mattsson, J., Ringdén, O., Uzunel, M., 2009. Allogeneic hematopoietic SCT in patients with non-malignant diseases, and importance of chimerism. Bone Marrow Transplant. 44, 757–763.

Verneris, M., Turcotte, L., Cao, Q., MacMillan, M., Miller, J., Weisdorf, D., Brunstein, C., Wagner, J., 2012. Increased relapse associated with mixed donor-donor chimerism following double umbilical cord blood transplantation. Blood 2012120abstract 358.

Wagner, J.E., Barker, J.N., DeFor, T.E., Baker, K.S., Blazar, B.R., Eide, C., Goldman, A., Kersey, J., Krivit, W., MacMillan, M.L., Orchard, P.J., Peters, C., Weisdorf, D.J., Ramsay, N.K.C., Davies, S.M., 2002. Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. Blood 100, 1611–1618.

## ABREVIATIONS:

BM : Bone marrow (moelle osseuse)

CB : Cord Blood (sang de cordon)

CGD : Granulomatose septique chronique

CMV : Cytomégalovirus

CNT : Cellules Nucléées Totales

CSA : Ciclosporine

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CTC : Corticoides

DFS : Disease Free Survival = Survie sans maladie

EBV : Epstein Barr Virus

EFS : Event Free Survival = Survie globale

GVL : Graft versus Leukemia

HLA : Human Leucocyte Antigen

MO : Moelle osseuse

MTX : Methotrexate

SCID : Déficit immunitaire combiné sévère

TRM : Transplant related mortality = Mortalité liée à la greffe

USP : unité de sang placentaire

UCB : unrelated cord blood (sans de cordon non apparenté)

UBMT : Unrelated Bone Marrow Transplantation

UCBT : Unrelated Cord Blood Transplantation

USP : Unité de Sang Placentaire

WAS : Wiscott Aldrich Syndrome

# Serment d''Hippocrate

En présence des Maîtres de cette école, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'Hippocrate, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent, et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe. Ma langue taira les secrets qui me seront confiés, et mon état ne servira pas à corrompre les moeurs, ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leur père.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses, que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

## RESUME:

L'objectif de ce travail était de décrire la probabilité de survenue d'un chimérisme complet de type donneur (cDC, >99,9% donneur) après greffe non apparentée de cellules souches de sang placentaire chez l'enfant, d'en identifier les facteurs prédictifs ainsi que son impact sur le devenir post greffe.

94 enfants greffés par une unité de sang placentaire après préparation myeloablative, ont été inclus dans notre étude. Le chimérisme, quantifié sur sang périphérique selon la technique TAQMAN (sensibilité de 0,1%), a été recueilli de manière séquentielle une période de 3 ans post greffe. L'incidence cumulative de survenue d'un chimérisme >99,9% donneur à 1 an est de 61,8%. Lors de l'analyse multivariée, 3 facteurs prédictifs ont été mis en évidence : Le caractère malin de la pathologie initiale (p=0,03), l'âge avec comme facteur péjoratif un âge à la greffe inférieur à 2,16 ans (correspondant au $1^{er}$ quartile de notre étude, $p=2{,}9.10^{-3}$) et la compatibilité HLA entre donneur et receveur ($p=8{,}7.10^{-4}$), qui lorsqu'elle est moindre est associée à une probabilité plus importante d'apparition d'un chimérisme complet au cours du temps. Bien que la quantité cellulaire injectée ait un fort impact sur la reconstitution hématologique, elle ne semble pas influencer le chimérisme après greffe.

Concernant le devenir post greffe, l'apparition d'un chimérisme complet précoce (c'est à dire un chimérisme >99,9% donneur dans le premier mois qui suit la greffe) apparaît prédictif de la prise de greffe ($p=<1.10^{-3}$) mais aussi de la survenue de la maladie du greffon contre l'hôte (GvHD pour Graft versus Host Disease) à la fois aigue et chronique. Aucune GvHD aigue sévère ou chronique n'a été retrouvée chez les patients n'ayant jamais développé de chimérisme complet ce qui suggère qu'une hématopoïèse résiduelle même minime de type « receveur » protègerait de la survenue de GvHD après greffe de sang placentaire.