



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

THÈSE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR EN MÉDECINE

Présentée et soutenue publiquement dans le cadre du troisième cycle de
Médecine Spécialisée

par

Gabrielle ROTH GUEPIN

le 28 Octobre 2013

**IMPACT DE LA COMPOSITION DU GREFFON
SUR LA RECONSTITUTION HEMATOPOÏETIQUE ET LA SURVENUE
DE COMPLICATIONS EN ALLOGREFFE DE MOËLLE OSSEUSE**

Examineurs de la thèse :

M. Le Professeur Feugier	Président
M. Le Professeur Deconinck	Juge
M. Le Professeur Larghero	Juge
Mme. Le Professeur Bensoussan	Juge
Mme. Le Docteur Clément	Juge

**Président de l'Université de Lorraine :
Professeur PierreMUTZENHARDT**

**Doyen de la Faculté de Médecine:
Professeur Henry COUDANE**

Vice-Doyen « Pédagogie » : Mme la Professeure Karine ANGIOI

Vice-Doyen Mission « Sillon lorrain » : Mme la Professeure Annick BARBAUD

Vice-Doyen Mission « Finances » : Professeur Marc BRAUN

Assesseurs

- 1 ^{er} Cycle :	Professeur Bruno CHENUÉL
- 2 ^{ème} Cycle :	Professeur Marc DEBOUVERIE
- 3 ^{ème} Cycle :	Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI
• « DES Spécialités Médicales, Chirurgicales et Biologiques »	
• « DES Spécialité Médecine Générale »	Professeur Paolo DI PATRIZIO
- Commission de Prospective Universitaire :	Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT
- Développement Professionnel Continu :	Professeur Jean-Dominique DE KORWIN
- Filières professionnalisées :	M. Walter BLONDEL
- Formation Continue :	Professeur Hervé VESPIGNANI
- Recherche :	Professeur Didier MAINARD
- Relations Internationales :	Professeur Jacques HUBERT
- Universitarisation des études paramédicales et gestion des mono-appartenants :	M. Christophe NEMOS
- Vie Étudiante :	Docteur Stéphane ZUILY
- Vie Facultaire :	Mme la Docteure Frédérique CLAUDOT
- Étudiants :	M. Xavier LEMARIE

DOYENS HONORAIRES

Professeur Adrien DUPREZ - Professeur Jean-Bernard DUREUX - Professeur Jacques ROLAND - Professeur Patrick NETTER

PROFESSEURS HONORAIRES

Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain AUBREGE - Gérard BARROCHE - Alain BERTRAND - Pierre BEY

Marc-André BIGARD - Patrick BOISSEL – Pierre BORDIGONI - Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE
Jean-Louis BOUTROY - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL - Claude CHARDOT -
François CHERRIER Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY - Jean-Pierre DELAGOUTTE - Emile de
LAVERGNE - Jean-Pierre DESCHAMPS

Jean DUHEILLE - Adrien DUPREZ - Jean-Bernard DUREUX - Gérard FIEVE - Jean FLOQUET - Robert FRISCH
Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Hubert GERARD - Jean-Marie GILGENKRANTZ - Simone
GILGENKRANTZ

Oliéro GUERCI - Pierre HARTEMANN - Claude HURIET - Christian JANOT - Michèle KESSLER - Jacques
LACOSTE

Henri LAMBERT - Pierre LANDES - Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE - Jacques LECLERE - Pierre
LEDERLIN Bernard LEGRAS - Jean-Pierre MALLIÉ - Michel MANCIAUX - Philippe MANGIN - Pierre MATHIEU -
Michel MERLE

Denise MONERET-VAUTRIN - Pierre MONIN - Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT -
Francis PENIN Gilbert PERCEBOIS - Claude PERRIN - Guy PETIET - Luc PICARD - Michel PIERSON - Jean-
Marie POLU - Jacques POUREL Jean PREVOT - Francis RAPHAEL - Antoine RASPILLER – Denis REGENT -
Michel RENARD - Jacques ROLAND
René-Jean ROYER - Daniel SCHMITT - Michel SCHMITT - Michel SCHWEITZER - Claude SIMON - Danièle
SOMMELET

Jean-François STOLTZ - Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT- Augusta TREHEUX - Hubert UFFHOLTZ -
Gérard VAILLANT Paul VERT - Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET - Michel WAYOFF - Michel WEBER

=====

PROFESSEURS ÉMÉRITES

Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Gérard BARROCHE Professeur Pierre BEY - Professeur Patrick BOISSEL

Professeur Michel BOULANGE – Professeur Jean-Louis BOUTROY - Professeur Jean-Pierre CRANCE
Professeur Jean-Pierre DELAGOUTTE - Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ - Professeure Simone GILGENKRANTZ Professeure Michèle KESSLER - Professeur Pierre MONIN - Professeur Jean-Pierre NICOLAS - Professeur Luc PICARD Professeur Michel PIERSON - Professeur Michel SCHMITT - Professeur Jean-François STOLTZ - Professeur Michel STRICKER Professeur Hubert UFFHOLTZ - Professeur Paul VERT - Professeure Colette VIDAILHET - Professeur Michel VIDAILHET Professeur Michel WAYOFF

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

(Disciplines du Conseil National des Universités)

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (*Anatomie*)

Professeur Gilles GROSDIDIER - Professeur Marc BRAUN

2^{ème} sous-section : (*Cytologie et histologie*)

Professeur Bernard FOLIGUET – Professeur Christo CHRISTOV

3^{ème} sous-section : (*Anatomie et cytologie pathologiques*)

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDECINE

1^{ère} sous-section : (*Biophysique et médecine nucléaire*)

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

2^{ème} sous-section : (*Radiologie et imagerie médecine*)

Professeur Michel CLAUDON – Professeure Valérie CROISÉ-LAURENT

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER - Professeur René ANXIONNAT

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (*Biochimie et biologie moléculaire*)

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

2^{ème} sous-section : (*Physiologie*)

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUÉL – Professeur Christian BEYAERT

3^{ème} sous-section : (*Biologie Cellulaire*)

Professeur Ali DALLOUL

4^{ème} sous-section : (*Nutrition*)

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT - Professeure Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (*Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière*)

Professeur Alain LE FAOU - Professeur Alain LOZNIEWSKI – Professeure Evelyne SCHVOERER

2^{ème} sous-section : (*Parasitologie et Mycologie*)

Professeure Marie MACHOUART

3^{ème} sous-section : (*Maladies infectieuses ; maladies tropicales*)

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (*Épidémiologie, économie de la santé et prévention*)

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON - Professeur Francis GUILLEMIN

Professeur Denis ZMIROU-NAVIER – Professeur François ALLA

2^{ème} sous-section : (*Médecine et santé au travail*)

Professeur Christophe PARIS

3^{ème} sous-section : (*Médecine légale et droit de la santé*)

Professeur Henry COUDANE

4^{ème} sous-section : (*Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication*)

Professeur François KOHLER – Professeure Eliane ALBUISSON

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

1^{ère} sous-section : (*Hématologie ; transfusion*)

Professeur Pierre FEUGIER

2^{ème} sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY - Professeur Didier PEIFFERT
Professeur Frédéric MARCHAL

3^{ème} sous-section : (Immunologie)

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marcelo DE CARVALHO-BITTENCOURT

4^{ème} sous-section : (Génétique)

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

1^{ère} sous-section : (Anesthésiologie - réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ - Professeur Gérard AUDIBERT
Professeur Thomas FUCHS-BUDER – Professeure Marie-Reine LOSSER

2^{ème} sous-section : (Réanimation ; médecine d'urgence)

Professeur Alain GERARD - Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT - Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT

3^{ème} sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

4^{ème} sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)

Professeur François PAILLE – Professeur Faiez ZANNAD - Professeur Patrick ROSSIGNOL

49^{ème} Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP ET RÉÉDUCATION

1^{ère} sous-section : (Neurologie)

Professeur Hervé VESPIGNANI - Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE
Professeur Luc TAILLANDIER - Professeur Louis MAILLARD

2^{ème} sous-section : (Neurochirurgie)

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE – Professeur Olivier KLEIN
Professeur Thierry CIVIT - Professeure Sophie COLNAT-COULBOIS

3^{ème} sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN

4^{ème} sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)

Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC – Professeur Bernard KABUTH

5^{ème} sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)

Professeur Jean PAYSANT

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (Rhumatologie)

Professeure Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE

2^{ème} sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)

Professeur Daniel MOLE - Professeur Didier MAINARD - Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS

3^{ème} sous-section : (Dermato-vénéréologie)

Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeure Annick BARBAUD

4^{ème} sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)

Professeur François DAP - Professeur Gilles DAUTEL - Professeur Etienne SIMON

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

1^{ère} sous-section : (Pneumologie ; addictologie)

Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT

2^{ème} sous-section : (Cardiologie)

Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE

Professeur Nicolas SADOUL - Professeur Christian de CHILLOU DE CHURET

3^{ème} sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)

Professeur Jean-Pierre VILLEMOT – Professeur Thierry FOLLIGUET

4^{ème} sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)

Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

52^{ème} Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF ET URINAIRE

1^{ère} sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)

Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRIN-BIROULET

3^{ème} sous-section : (Néphrologie)

Professeure Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT

4^{ème} sous-section : (Urologie)

Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE ET CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)

Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY - Professeur Athanase BENETOS
Professeure Gisèle KANNY – Professeure Christine PERRET-GUILLAUME

2^{ème} sous-section : (Chirurgie générale)

Professeur Laurent BRESLER - Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

1^{ère} sous-section : (Pédiatrie)

Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER - Professeur François FEILLET
Professeur Cyril SCHWEITZER – Professeur Emmanuel RAFFO – Professeure Rachel VIEUX

2^{ème} sous-section : (Chirurgie infantile)

Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE

3^{ème} sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)

Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Olivier MOREL

4^{ème} sous-section : (Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale)

Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

55^{ème} Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU

1^{ère} sous-section : (Oto-rhino-laryngologie)

Professeur Roger JANKOWSKI – Professeure Cécile PARIETTI-WINKLER

2^{ème} sous-section : (Ophtalmologie)

Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeure Karine ANGIOI

3^{ème} sous-section : (Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie)

Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeure Muriel BRIX

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS

61^{ème} Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Professeur Walter BLONDEL

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Professeure Sandrine BOSCHI-MULLER

=====

PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur Jean-Marc BOIVIN

PROFESSEUR ASSOCIÉ DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Professeur associé Paolo DI PATRIZIO

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

42^{ème} Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE

1^{ère} sous-section : (Anatomie)

Docteur Bruno GRIGNON – Docteure Manuela PEREZ

2^{ème} sous-section : (Cytologie et histologie)

Docteur Edouard BARRAT - Docteure Françoise TOUATI – Docteure Chantal KOHLER

3^{ème} sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)

Docteure Aude MARCHAL – Docteur Guillaume GAUCHOTTE

43^{ème} Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDECINE

1^{ère} sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)

Docteur Jean-Claude MAYER - Docteur Jean-Marie ESCANYE

2^{ème} sous-section : (Radiologie et imagerie médecine)

Docteur Damien MANDRY

44^{ème} Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION

1^{ère} sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)

Docteure Sophie FREMONT - Docteure Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN

Docteure Catherine MALAPLATE-ARMAND - Docteure Shyue-Fang BATTAGLIA

2^{ème} sous-section : (Physiologie)

Docteur Mathias POUSSEL – Docteure Silvia VARECHOVA

3^{ème} sous-section : (Biologie Cellulaire)

Docteure Véronique DECOT-MAILLERET

45^{ème} Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE

1^{ère} sous-section : (*Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière*)

Docteure Véronique VENARD – Docteure Hélène JEULIN – Docteure Corentine ALAUZET

3^{ème} sous-section : (*Maladies Infectieuses ; Maladies Tropicales*)

Docteure Sandrine HENARD

46^{ème} Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ

1^{ère} sous-section : (*Epidémiologie, économie de la santé et prévention*)

Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE – Docteure Frédérique CLAUDOT – Docteur Cédric BAUMANN

2^{ème} sous-section (*Médecine et Santé au Travail*)

Docteure Isabelle THAON

3^{ème} sous-section (*Médecine légale et droit de la santé*)

Docteur Laurent MARTRILLE

4^{ère} sous-section : (*Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication*)

Docteur Nicolas JAY

47^{ème} Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE

2^{ème} sous-section : (*Cancérologie ; radiothérapie : cancérologie (type mixte : biologique)*)

Docteure Lina BOLOTINE

4^{ème} sous-section : (*Génétique*)

Docteur Christophe PHILIPPE – Docteure Céline BONNET

48^{ème} Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE

3^{ème} sous-section : (*Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique*)

Docteure Françoise LAPICQUE – Docteur Nicolas GAMBIER – Docteur Julien SCALA-BERTOLA

50^{ème} Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE ET CHIRURGIE PLASTIQUE

1^{ère} sous-section : (*Rhumatologie*)

Docteure Anne-Christine RAT

3^{ème} sous-section : (*Dermato-vénéréologie*)

Docteure Anne-Claire BURSZEJN

4^{ème} sous-section : (*Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie*)

Docteure Laetitia GOFFINET-PLEUTRET

51^{ème} Section : PATHOLOGIE CARDIO-RESPIRATOIRE ET VASCULAIRE

3^{ème} sous-section : (*Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire*)

Docteur Fabrice VANHUYSE

4^{ème} sous-section : (*Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire*)

Docteur Stéphane ZUILY

53^{ème} Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE

1^{ère} sous-section : (*Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie*)

Docteure Laure JOLY

54^{ème} Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION

5^{ème} sous-section : (*Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale*)

Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

MAÎTRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS DE MÉDECINE GÉNÉRALE

Docteure Elisabeth STEYER

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES

5^{ème} Section : SCIENCES ÉCONOMIQUES

Monsieur Vincent LHUILLIER

19^{ème} Section : SOCIOLOGIE, DÉMOGRAPHIE

Madame Joëlle KIVITS

60^{ème} Section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE, GÉNIE CIVIL

Monsieur Alain DURAND

61^{ème} Section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL

Monsieur Jean REBSTOCK

64^{ème} Section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE

Madame Marie-Claire LANHERS – Monsieur Pascal REBOUL – Monsieur Nick RAMALANJAONA

65^{ème} Section : BIOLOGIE CELLULAIRE

Monsieur Jean-Louis GELLY - Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE
Monsieur Christophe NEMOS - Madame Natalia DE ISLA - Madame Nathalie MERCIER – Madame Céline
HUSELSTEIN

66^{ème} Section : PHYSIOLOGIE

Monsieur Nguyen TRAN

=====

MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Médecine Générale

Docteure Sophie SIEGRIST - Docteur Arnaud MASSON - Docteur Pascal BOUCHE

=====

DOCTEURS HONORIS CAUSA

Professeur Charles A. BERRY (1982)
Centre de Médecine Préventive, Houston
(U.S.A)
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)
Brown University, Providence (U.S.A)
Professeure Mildred T. STAHLMAN (1982)
Vanderbilt University, Nashville (U.S.A)
Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)
Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)
Université de Pennsylvanie (U.S.A)
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)
Research Institute for Mathematical Sciences de
Kyoto (JAPON)

Professeure Maria DELIVORIA-
PAPADOPOULOS (1996)
Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)
Université d'Helsinki (FINLANDE)
Professeur James STEICHEN (1997)
Université d'Indianapolis (U.S.A)
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)
Université d'Hô Chi Minh-Ville (VIÊTNAM)
Professeur Daniel G. BICHET (2001)
Université de Montréal (Canada)
Professeur Marc LEVENSTON (2005)
Institute of Technology, Atlanta (USA)

Professeur Brian BURCHELL (2007)
Université de Dundee (Royaume-Uni)
Professeur Yunfeng ZHOU (2009)
Université de Wuhan (CHINE)
Professeur David ALPERS (2011)
Université de Washington (U.S.A)
Professeur Martin EXNER (2012)
Université de Bonn (ALLEMAGNE)

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Pierre Feugier, président du jury,

Professeur d'hématologie

Vous me faites l'honneur de présider le jury de ma thèse

Que ce travail soit l'expression de mon profond respect et de ma reconnaissance

Que ce travail vous rappelle vos années de thérapies cellulaires.

A Monsieur le Professeur E. Deconinck

Professeur d'hématologie

Vous me faites l'honneur de participer au jury de ma thèse

Que ce travail soit l'expression de mon profond respect

A Monsieur le Professeur J. Larghero

Professeur de Biologie Cellulaire

Vous me faites l'honneur de participer au jury de ma thèse

Je vous remercie pour votre accueil lors de mon master et ainsi m'avoir permis de découvrir le monde de la recherche

Je vous remercie également de m'avoir fait découvrir la thérapie cellulaire et notamment ce monde mystérieux des cellules souches embryonnaires ou IPS

Que ce travail soit l'expression de mon profond respect

A Madame le Professeur D. Bensoussan

Professeur de Pharmacie

Vous me faites l'honneur de participer au jury de ma thèse

Je vous remercie pour m'avoir donnée l'idée de ce sujet au cours de mon stage dans votre service

Je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée lors de mon stage dans votre service

Je vous remercie pour l'enthousiasme et l'innovation que vous apportez à la greffe à Nancy (de la production de CTL à l'ouverture semée d'embûches de la banque de sangs placentaires)

Que ce travail soit l'expression de mon profond respect

A Madame le Docteur L. Clément

Docteur en Hématologie

Je te remercie d'avoir accepté de participer au jury de ma thèse

Je te remercie pour la transmission de tes connaissances de greffeuses

J'espère pouvoir continuer à travailler à tes côtés

Que ce travail soit l'expression de ma sincère reconnaissance et de ma considération

A Monsieur et Mme les Docteurs Witz

Vous m'avez fait découvrir le monde des leucémies aigues

Je vous remercie avec un profond respect de m'avoir pris sous votre aile lors de mon premier stage en hématologie

A Mr le Professeur Bordigoni

Je vous remercie avec un profond respect pour vos transmissions de connaissances

Je vous remercie pour vos conseils d'orientation

J'espère quand je serai grande maîtriser aussi bien que vous ce monde de l'allogreffe

A Mr le Professeur Lederlin

Je vous remercie avec un profond respect pour les enseignements au lit du malade

A Mr le Professeur Lecompte

Je vous remercie avec un profond respect pour vos enseignements d'hémostasien et du sens de la précision

A Mme le Docteur Claudine Schmitt

Vous m'avez fait découvrir le monde des leucémies aigues chez l'enfant

Je vous remercie avec un profond respect pour m'avoir enseigné le « BEABA » du sens clinique.

A Mr le Professeur Bollaert et l'ensemble de l'équipe de réanimation de l'hôpital Central

Je vous remercie pour votre accueil, les premiers pas furent difficiles mais j'ai appris beaucoup

A Mr le Docteur Billaud

Je vous remercie pour votre accueil lors de mon premier stage d'interne

A Mme le Docteur Marie Toussaint Hacquard

Tu m'as fait découvrir ce monde de l'hémostase et de la thrombinographie

Tu m'as accompagnée dans mes premiers managements de pipettes

Je te remercie pour ta patience et ton aide pour mon mémoire de DIU immuno hémato pédiatrie.

A Mmes les Docteurs Julie Soudant et Alexandra Salmon

Vous avez accompagné mes premiers pas au secteur de greffe

Je vous remercie pour l'apprentissage de la rigueur pédiatrique

A Mme le Docteur Audrey Contet

Tu m'as également enseignée la rigueur pédiatrique et l'art d'être consciencieuse

A Mr le Docteur Ludovic Mansuy, Mme Le Docteur Fanny Fouyssac

Je vous remercie pour la transmission de connaissances et pour ses astreintes en médecines infantiles II, parfois tristes, mais toujours sympathiques.

A Mrs les Docteurs Cyrille Hulin et Serge Bologna

Je vous remercie pour votre disponibilité, toujours prêt à partager de votre expérience clinique

A Mme le Docteur Ranta et Mme le Docteur Bonmati

Je vous remercie pour votre patience face à mon pessimiste chronique

Je vous remercie pour le compagnonnage de début d'internat

A Mme le Docteur Guerci

Je vous remercie pour votre disponibilité concernant les LMC et les SMD

Je vous remercie également pour la petite surprise après mon mariage...

A Mme le Docteur Aurore Perrot

Je te remercie d'avoir supervisée les plus jeunes pendant ton internat

Je te remercie pour ton écoute et ton soutien

J'espère que la montagne ne te gagnera pas trop et ainsi pouvoir travailler à tes côtés

A Mmes les Docteurs Caroline Serrier et Stéphanie Tardy

Je vous remercie pour votre bonne humeur, votre disponibilité et vos précieux conseils

Je suis ravie que l'on soit bientôt collègues

A Mr le Docteur Nicolas Daguidaoud

Je te remercie pour ta bonne humeur et le compagnonnage

A Mme le Docteur Frotcher, Mme le Docteur Latger-Cannard, Mr le Docteur Salignac, Mr le Docteur Lesesve

Je vous remercie pour l'accueil au laboratoire d'hématologie et votre enseignement de la cytologie

A Mr le Docteur Julien Perrin

Je te remercie pour ton aide en thrombinographie et ton enseignement du globule rouge

A Mr le Docteur Devignes

Je vous remercie pour votre accueil et votre apprentissage de l'hémostase

A Mme Le Docteur Sima Mathieu et Mme le Docteur Donze

Je vous remercie pour votre accueil et m'avoir permis de découvrir l'autre côté de la greffe...

Je remercie l'ensemble de l'EFS pour leur accueil et m'avoir permis de découvrir le circuit du sang

A Mesdames les Docteurs Valérie Eswhege, Stéphanie Bultel et Véronique Decot

Je vous remercie pour votre accueil à l'UTCT

A Monsieur VIRION du service d'Epidémiologie et Evaluation Cliniques pour l'apport de son expertise statistique dans ce travail.

A Messieurs les Professeurs Facon et Jouet

Mon tout premier stage à l'hôpital en hématologie à Lille m'aura permis de choisir ma voie

A Mme le Docteur Valérie Vanneaux

Je te remercie de ton soutien au cours de mon Master

Je te remercie de m'avoir fait connaître ce monde de la culture cellulaire et de la cytométrie

A Mme le Docteur Jessica Michel

Je te remercie pour ton amitié et ton soutien

A Mme le Docteur Cécile Pochon

Je me souviens de nos premiers pas en allogreffe

Je te remercie pour ton infaillible bonne humeur

A ma collègue Godelieve

Je te remercie pour ta bonne humeur, pour ton soutien

A mes collègues d'hémato : Maud, Arnaud, Lauriane, Lucianne, Aurélien

A tous mes co internes, au fils de stages, et tout particulièrement,

Les Docteurs Emilie Maciejwski, Amélie Gatin, Elodie Grein, Ouana Balasanu

A mes co-internes actuels

Je vous remercie pour votre compréhension et votre patience

A l'ensemble des équipes paramédicales du pool hématologie

A l'équipe paramédicale de médecine infantile II

A l'équipe paramédicale de réanimation-soins continues de Central

Aux infirmières d'hémaphérèse

Aux techniciens du labo d'hémato biologie

Aux techniciens de l'UTCT

Je vous remercie vivement pour votre accueil, votre soutien quotidien,
la transmission des connaissances pratiques et le travail d'équipe

A mes Parents

Que vous trouviez ici l'expression de ma profonde reconnaissance
Je vous remercie pour tout votre soutien moral, matériel et organisationnel
Je vous remercie de toujours répondre présent même quand j'ai joué au « Tanguy »
Sans vous je n'aurai pu accomplir de telles études

A mes Sœurs, Karine et Virginie

Je vous remercie pour votre soutien tout au long de ces années
Je vous remercie pour votre patience quand nous vivions tous ensemble

A ma sœur, Charlotte

Je te remercie encore de m'avoir permis d'emprunter ta salle de jeux pendant une année
Je te remercie de trouver le courage de ne pas jouer à la « DS » pendant ma soutenance
J'espère que tu trouveras une voie professionnelle qui te donnera autant de plaisir que j'en éprouve pour la médecine

A mon Neveu et Filleul Paolo

A mes Nièces Alice et Manon

A ma Tante et Marraine Marie-France,

Je te remercie de m'avoir donné ce virus de la médecine
Je réalise à peine que moi aussi je passe ma thèse...

A mes Grands-parents maternels et ma grand-mère paternelle,
Je vous remercie pour votre soutien

A mon Grand-père paternel,

Que cette étude sur les greffons médullaires te rende hommage
Mon intérêt pour la greffe a sans doute trouvé source dans ta maladie....

A mes Tantes Edith et Jocelyne

A mes oncles Pascal

Je vous remercie pour votre soutien

A mon Oncle Guy, Daniel et Gilbert et mes Tantes Evelyne, Patricia et Carole

Je vous remercie pour votre soutien

A mes Cousins Sébastien, Jérôme, Michael, Thomas, Guillaume, Mathieu, Jonathan, Timothé, Loïc, Robin

A mes Cousines Marie-Paule, Adeline, Eileen, Chloé, Lilou

A ma Belle-famille,

Jean-Yves et Micheline

Sophie et Loïc

A mes amis,
Les Nantais, Anne-Sophie, Antoine, Alexandre, Bertrand, Cédric, Delphine, Anne-
Lise...

A toi Thibaud,
Ma moitié et mon soutien de toujours
Je te remercie de tout mon cœur de m'avoir accompagné le long de cette route
difficile
Je te remercie pour ton soutien quotidien
Trouve ici la marque de tout mon amour

A ma Lily-Rose
Je te remercie pour tes éclats de rire qui ont rythmé la rédaction de cette thèse
Trouve ici la marque de tout mon amour

A tous les patients au fil des stages

Je dédie cette thèse.

SERMENT D'HIPPOCRATE

« Au moment d'être admise à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité. Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux. Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité. J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admise dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçue à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonorée et méprisée si j'y manque ».

TABLE DES MATIERES

TABLE DES ABBRÉVIATIONS	24
TABLE DES ILLUSTRATIONS	25
TABLE DES TABLEAUX	26
 INTRODUCTION	 27
Généralités sur l'allogreffe.....	27
I) Historique de la greffe de cellules souches hématopoïétiques	27
II) Déroulement de l'allogreffe	28
A) Le greffon	28
A.1 Les sources cellulaires	28
A.2 Les donneurs.....	29
A.3 Compatibilité HLA.....	29
B) Le conditionnement	29
C) La prise du greffon.....	31
IV) Résultats de l'allogreffe	31
A) Effet allogénique	31
A.1) Les antigènes mineurs d'histocompatibilités	32
A.2) H-Y.....	32
A.3) Les lymphocytes Natural Killer	32
B) La survie	33
C) La rechute	34
D) Le rejet du greffon	35
E) Les complications principales	36
E.1) GVH	36
GVHa.....	36
GVHc.....	40
E.2) Autres complications de la greffe :	42
Les Maladies veino-occlusives (MVO)	43
La Microangiopathie thrombotique (MAT)	44
Le syndrome de fuite capillaire.....	45
Le syndrome de prise de greffe.....	46
F) Immunité en post allogreffe	47
F.1) Reconstitution immunitaire	47
F.2) Les infections en post allogreffe	48
Le greffon	50
I) Composition du greffon.....	50
A) Cellules nucléées totales	50
B) Cellules souches hématopoïétiques.....	50
B.1) Généralités sur les cellules souches.....	50
B.2) Les cellules souches hématopoïétiques	51
L'hématopoïèse	52
Les différents tests d'évaluation indirects des CSH	53
Isolement de la CSH directement.....	55
B.3) CD34+(49)	56
Structure	56
Fonctions	56
Applications cliniques du CD34.....	57
Evaluation CD34+ en cytométrie.....	57
Contenu en CD34+ des greffons.....	58

II) La prise de la greffe	59
A) La niche hématopoïétique.....	59
B) Les étapes de la reprise de l'hématopoïèse après la greffe	60
C) Les manipulations du greffon	60
C.1) Greffon médullaire.....	60
Réduction de volume	60
Notion d'incompatibilité ABO.....	61
Sélection CD34	61
C.2) Greffon de CSP.....	62
D) Influence de la composition du greffon sur l'évolution clinique en autogreffe	62
E) Influence de la composition du greffon sur l'évolution clinique en allogreffe, à l'exception des sangs placentaires	63
E.1) Impact des CNT	63
Greffon de CSP.....	63
Greffon médullaire	63
E.2) Impact des CD34+	63
Greffon de CSP.....	63
Greffon médullaire	64
Objectifs de l'étude	67
Matériels et méthodes	68
I) Population étudiée	68
II) Choix du donneur	68
A) Compatibilité HLA	68
B) Choix du donneur.....	68
C) Choix du type de greffon : moelle versus CSP	68
II) Conditionnement, prévention de la GVH et traitements de support.....	68
A) Conditionnement.....	68
B) Prophylaxie de la GVH.....	69
C) Les prophylaxies anti-infectieuses	69
III) Recueil du greffon, manipulation du greffon et contrôle qualité	69
A) Prélèvement médullaire au bloc opératoire	69
B) Manipulation sur le greffon.....	69
B.1 Réduction de volume	69
B.2 Déplasmatisation	70
B.3 Désérythrocytation.....	70
C) Contrôle qualité	70
C.1 Quantification des CNT	70
C.2 Quantification des CD34+	70
C.3 Quantification des colonies formant unité –granulocyte-macrophage, CFU-GM	72
C.4 Contrôle disparition des anticorps anti-A et/ou anti-B	73
IV) Réinjection du greffon	73
V) Définition des points clefs post greffe	73
A) Reconstitution hématopoïétique.....	73
B) Infections	73
C)GVHa	Erreur ! Signet non défini.
D)GVHc.....	Erreur ! Signet non défini.
E) MVO, MAT, syndrome de fuite capillaire et syndrome de prise de greffe.	74
F) La survie	74
G) La mortalité liée à la greffe, TRM.....	74
VI) L'analyse statistique	74

Résultats	76
I) Description de la population.....	76
II) Description du greffon.....	79
A) Composition.....	79
B) Impact des caractéristiques pré-greffe sur la composition du greffon.....	79
C) Manipulations	80
D) Lien entre les différents types de cellules	83
II) Devenir de la population	84
A) Rejet.....	84
B) Reconstitution hématopoïétique.....	84
B.1) Globules blancs.....	84
B.2) Polynucléaires neutrophiles.....	86
B.3) Plaquettes	88
B.4) Patients avec la reconstitution en PNN et en plaquettes la plus lente.....	90
C) Complications.....	91
C.1 Infections.....	91
Bactériennes.....	91
Infections virales	93
Infections fongiques.....	95
Infection parasitaire.....	96
C.2 GVH	97
GVHa.....	97
GVHc	98
C.3 MVO.....	99
C.4 MAT	101
C.5 Syndrome de prise de greffe	102
C.6 Syndrome de fuite capillaire	103
D) TRM	103
E) Rechute	104
F) Survie	106
F.1) Survie globale.....	106
F.2) Survie sans maladie	108
Discussion.....	113
I) Impact de la composition cellulaire du greffon	113
A) Composition du greffon.....	113
B) CNT	114
C) CD34+	114
D) CFU-GM.....	117
E) CD3+	117
II) Impact des manipulations	118
III) Impact du conditionnement.....	118
IV) Impact des caractéristiques du receveur et du donneur.....	119
V) Proposition d'un logigramme de prescription	119
Conclusion	121
Perspectives	123
Annexes	124
Bibliographie.....	130

TABLE DES ABBRÉVIATIONS

7AAD : 7-Amino-Actinomycine d	LAM : Leucémie Aigüe Myéloïde
AGM : Aorte Gonade Mesonephros	LAL : Leucémie Aigüe Lymphoïde
CFU : Colonies Formant Unité	LTC-IC : <i>Long Terme Culture-Initiating Cell</i>
CFU-GM : Colonies Formant Unité – Granulocyte-Macrophage	LT-RC : <i>Long Terme Repopulating Cell</i>
CMV : CytoMégaloVirus	MAC : Conditionnement MyéloAblatif
CNT : Cellules Nucléées Totales	MAT : Microangio Angiopathie Thrombotique
CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques	MO : Moelle Osseuse
CSP : Cellules Souches Périphériques	MiHAs : Antigènes Mineurs d’Histocompatibilité
CTL : <i>Cytotoxic T Lymphocyte</i>	MVO : Maladie Veino Occlusive
DLI : <i>Donor Leukocyte Infusion</i>	MSC : Cellules Souches Mésenchymateuses
EBMT : European society for Blood and Marrow Transplantation	NK : <i>Natural Killer</i>
EBV : Epstein Barr Virus	OS : <i>Overall Survival</i>
EFS : Etablissement Français du Sang	PCR : <i>Polymerase Chain Reaction</i>
GCSF : <i>Granulocyte Clony-Simulating Factor</i>	PNN : PolyNucléaires Neutrophiles
GVH : <i>Graft Versus Host</i>	RIC : Conditionnement d’Intensité Réduite
GVHa : <i>acute Graft Versus Host</i>	SAL : Serum Anti Lymphocytaire
GVHc : <i>chronic Graft Versus Host</i>	SPAo : splanopleure paraortique
GVL : <i>Graft Versus Leukemia</i>	TRM : <i>Toxicite related mortality</i>
GVT : <i>Graft Versus Tumor</i>	TREC : T cell receptor Rearrangement Excision DNA Circles
JACIE : <i>Joint Accreditation Committee –ISCT & EBMT</i>	UTMA : Unité de Transplantation Médullaire Allogénique
HLA : <i>Human Leukocyte Antigen</i>	
IL : Interleukine	
ISHAGE : International Society of Hematotherapy and Graft Engineering	
KIR : <i>Killer cell Immunoglobulin-like Receptors</i>	

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure 1 : Déroulement allogreffe	28
Figure 2 : Conditionnement en fonction de l'immunosuppression et de l'immunoablation d'après Kassim, BMT 2005 (9).	30
Figure 3: Effet recherché du conditionnement selon le type de pathologie sous-jacente.....	30
Figure 4 : Probabilité de survenue de rechute en fonction de la survenue de GVH, de la déplétion en lymphocytes T d'après Horowitz Blood 1990(10).....	31
Figure 5 : Activation des NK en fonction de la balance des signaux activateurs et inhibiteurs.	33
Figure 6 : Probabilité de survie, de mortalité liée à la transplantation (TRM) et de rechute à j100 selon le score de risque EBMT. D'après EBMT handbook : Haematopoietic Stem Cell Transplantation édition 2012(12).....	34
Figure 7 : Probabilité de survie, de TRM et de rechute à 3 ans après la greffe selon le score de risque EBMT. D'après EBMT handbook édition 2012(12).	35
Figure 8 : Classification du type de GVH : GVHa ou GVHc d'après Filipovich BBMT 2005(13).	36
Figure 9 : Physiopathologie de la GVHa d'après Ferrara Seminars in Hematology 2006(15).	37
Figure 10 : Score de Glucksberg(17).	39
Figure 11: Ancienne classification de la GVHc d'après Shulman Am J Med (22).	41
Figure 12: Tableau classification grade de sévérité de la GVH chronique D'après Filipovich BBMT 2005(13)	41
Figure 13 : Survie en cas de GVH chronique en fonction du grade de sévérité d'après Perez-Simon BBMT 2008(25)	42
Figure 14 : Différentes phases infectieuses en post allogreffe d'après Tomblyn BBMT 2009(32).	49
Figure 15 : Division cellulaire symétrique et asymétrique	50
Figure 16 : Localisation de l'hématopoïèse au cours de l'embryogenèse.	51
Figure 17 : Schéma de l'hématopoïèse.....	52
Figure 18 : Schéma de l'hématopoïèse avec les différents tests d'évaluation des CSH.....	53
Figure 19 : Les progéniteurs clonogéniques hématopoïétiques. Colonies formant unité, CFU-GM ; colonies formant unité érythroïde, CFU-E.....	54
Figure 20 : Structure CD34 D'après Krause Blood 1996(49).	56
Figure 21 : Un modèle de la niche hématopoïétique dans les os long d'après Shiozawa Leukemia 2008(52)	59
Figure 22 : Quantification des CD34+ : analyse en cytométrie.....	71
Figure 23 : Types de pathologies.	77
Figure 24 : Compatibilité ABO.....	78
Figure 25 : Type de conditionnement.....	78
Figure 26 : Répartition des différents types de manipulation	80
Figure 27 : Comparaison des moyennes de rendement de CNT en fonction des manipulations.....	82
Figure 28 : Comparaison des moyennes de rendement de CD34 en fonction des manipulations.....	82
Figure 29 : Survie globale de l'ensemble de la population.....	106
Figure 30 : Survie globale selon les différents types de manipulations du greffon.....	107
Figure 31 : Survie sans maladie de l'ensemble de la population	108
Figure 32: Survie sans maladie selon les différents types de manipulations du greffon	109
Figure 33 : Proposition prescription quantité cellulaire médullaire en allogreffe	122

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Gradation des MAT.	44
Tableau 2 : Production quotidienne et durée de vie des cellules du sang	52
Tableau 3 : Etude de l'impact de la dose de CD34+ en allogreffe de moelle osseuse.....	66
Tableau 4 : Caractéristiques de la population incluse.....	76
Tableau 5 : Impact de l'âge du donneur sur la composition cellulaire.	80
Tableau 6 : Moyenne des quantités de CNT et CD34+ avant manipulations et après manipulations..	81
Tableau 7 : Impact de différents seuils cellulaires sur la reconstitution des globules blancs à j30	85
Tableau 8 : Comparaison de la composition du greffon entre les patients ayant reconstitué le plus lentement leurs globules blancs et le reste de la cohorte.	85
Tableau 9: Impact de différents seuils cellulaires sur la reconstitution des PNN à j30.....	87
Tableau 10 : Comparaison de la composition du greffon entre les patients ayant reconstitué le plus lentement leurs polynucléaires neutrophiles et le reste de la cohorte.	87
Tableau 11: Impact de différents seuils cellulaires sur la reconstitution des plaquettes à j180.....	89
Tableau 12: Comparaison de la composition du greffon entre les patients ayant reconstitué le plus lentement leurs plaquettes et le reste de la cohorte.	89
Tableau 13: comparaison de la composition du greffon entre les patients ayant reconstitué le plus lentement leurs PNN et leurs plaquettes et le reste de la cohorte.	90
Tableau 14 : Impact de différents seuils cellulaires sur la survenue d'infections bactériennes.....	92
Tableau 15: Facteurs de risque de survenue d'infections bactériennes	93
Tableau 16: Impact de différents seuils cellulaires sur la survenue d'infections virales.	94
Tableau 17 : Facteurs de risque de survenue d'infections virales	94
Tableau 18 : Impact de différents seuils cellulaires sur la survenue d'infection fongique.....	96
Tableau 19 : Facteurs de risque de survenue d'infections fongiques	96
Tableau 20 : Impact de différents seuils cellulaires sur la survenue de GVHa.	98
Tableau 21 : Impact de différents seuils cellulaires sur la survenue de GVHc.	99
Tableau 22: Impact de différents seuils cellulaires sur la survenue de MVO.	100
Tableau 23: Impact de différents seuils cellulaires sur la survenue de MAT	101
Tableau 24: Impact de différents seuils cellulaires sur la survenue d'un syndrome de prise de greffe.	102
Tableau 25 : Impact de différents seuils cellulaires sur la TRM.	103
Tableau 26: Impact de différents seuils cellulaires du greffon sur la rechute.	105
Tableau 27 : Impact de différents seuils cellulaires sur la survie globale à 5 ans	108
Tableau 28 : Impact de différents seuils cellulaires sur la survie sans rechute à 5 ans	110
Tableau 29 : Facteurs de risque de l'évolution post greffe.	111

INTRODUCTION

Généralités sur l'allogreffe

1) Historique de la greffe de cellules souches hématopoïétiques

Initialement destinée à pallier l'hématopoïèse détruite par une irradiation, la greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est aujourd'hui utilisée pour supplémenter une hématopoïèse défaillante, exercer un effet allogénique contre des hémopathies malignes, apporter un enzyme manquant ou supplémenter un système immunitaire défaillant.

Après les explosions atomiques au Japon, à la fin de la seconde guerre mondiale, de nombreux scientifiques ont étudié comment protéger les humains contre les irradiations. Les premières expériences d'allogreffe sont réalisées chez la souris et le chien par E.D Thomas. Dès 1956, émerge l'idée que la greffe de moelle osseuse pourrait exercer un effet thérapeutique contre les pathologies malignes(1).

Chez l'homme, la première allogreffe est réalisée en 1957 par E.D Thomas(2) chez 2 patients atteints de leucémie aigüe lymphoïde en phase avancée, qui ont reçu une irradiation corporelle à dose létale puis, une greffe d'un jumeau (greffe syngénique). Les patients ont reconstitué une hématopoïèse mais sont décédés de rechute. En 1965 G.Mathé(3) est le premier à décrire une prise de greffe à long terme et démontre le chimérisme et l'effet anti-leucémique de l'allogreffe.

Cependant, devant les décès liés à l'effet du greffon contre l'hôte (GVH), qui correspond à une attaque des cellules et tissus du receveur par les cellules du donneur, le nombre de greffe allogénique diminue. Puis, grâce à la description des groupes HLA par Dausset(4), l'intérêt pour l'allogreffe de CSH est relancé en utilisant des donneurs géno-identiques issus de la fratrie.

Ensuite, les modalités de greffes ont changé, avec une augmentation des allogreffes avec donneur non apparenté, rendues possible grâce à l'amélioration de la résolution des typages HLA. La découverte de la ciclosporine a permis de prévenir la réaction de GVH.

La mise en évidence de l'antigène CD34+ a permis d'améliorer les contrôles qualités sur les greffons. De nouvelles sources de cellules souches hématopoïétiques sont mises en évidence dans le sang périphérique et dans le sang placentaire. En 1988, est réalisée la première greffe de sang placentaire par E Gluckman(5). Actuellement, la majorité des allogreffes sont réalisées avec des cellules souches périphériques. Les conditionnements de la greffe ont également évolué afin, de rendre possible l'allogreffe pour des patients plus âgés, c'est l'avènement des conditionnements non myéloablatifs(6).

Les soins de supports anti infectieux ont également progressé avec les flux laminaires, la surveillance de l'antigénémie aspergillaire, les nouvelles drogues antifongiques, la mise en place de traitements antiviraux contre les herpès virus, dès la détection d'ADN viral, avant même l'infection (traitement préemptif)...

13401 allogreffes ont été rapportées par l'« European Bone Marrow Transplantation » (EBMT) en 2011. En France en 2012, 1721 allogreffes ont été réalisées dont 1011 non apparentées et 710 apparentées.

II) Déroulement de l'allogreffe

Le patient reçoit un conditionnement par chimiothérapie, plus ou moins une irradiation corporelle, puis il reçoit une transfusion d'un greffon contenant les cellules souches hématopoïétiques du donneur. (Figure 1)

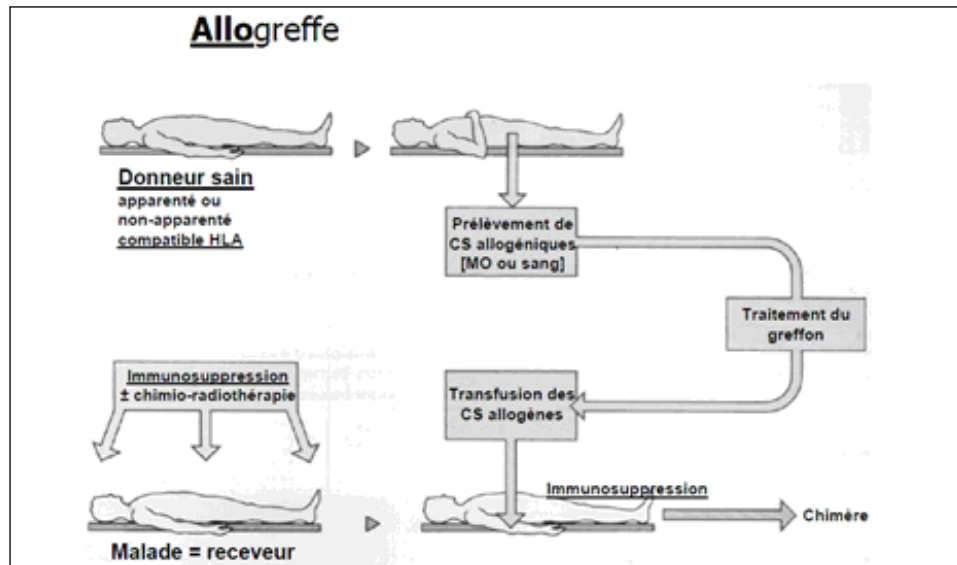


Figure 1 : Déroulement allogreffe

A) Le greffon

A.1 Les sources cellulaires

On dispose de 3 sources de greffon :

La moelle est la source historique de CSH. Elle est prélevée chez le donneur sous anesthésie générale au niveau des crêtes iliaques. On peut prélever entre 10 et 20ml/kg de volume de moelle de donneur. Elle permet une sortie d'aplasie en environ 20 jours.

Les cellules souches périphériques (CSP) sont obtenues par aphérèse après mobilisation des CSH chez le donneur par injection de facteur de croissance granulocytaire (G-CSF). Elles permettent une sortie d'aplasie en environ 15 jours. De part la mobilisation par GCSF, les cellules injectées sont plus matures et on observe plus de GVH avec ce type de greffon.

Récemment, Anasetti et al(7) ont montré en situation de greffe non apparentée, qu'il n'y a pas de différence en termes de survie après allogreffe de moelle ou de CSP. Cependant, on observe plus de non prise avec les greffes de moelle et plus de GVH survenant à plus de 100 jours post greffe avec les CSP.

Le sang placentaire est collecté à la naissance des bébés dans des maternités habilitées, puis cryoconservé dans des banques. Ces banques sont développées, afin d'une part d'augmenter la diversité des typages HLA et d'autre part d'assurer une disponibilité rapide des greffons. Cette source de greffon présente plusieurs inconvénients tels qu'une moindre richesse en CSH, avec une sortie d'aplasie plus tardive, en environ 30 jours et un retard de reconstitution immunitaire, du fait de

l'immaturité des cellules injectées. De plus, on ne pourra pas réaliser de réinjection de lymphocytes de donneur à distance.

A.2 Les donneurs

En première intention, on recherche toujours un donneur familial. Dans 30%, des cas, on trouve un donneur compatible en intrafamilial. En l'absence de donneur familial compatible et selon l'indication de greffe, on recherchera dans le fichier des donneurs volontaires et dans les banques de sangs placentaires. En effet, par exemple, pour les allogreffes en situation de 1^{ère} rémission, dans la plupart des protocoles, on n'acceptera que des donneurs 10/10 alors qu'en situation de rechute on acceptera des donneurs 9/10 ou des sangs placentaires. Dans certaines indications, telles que les leucémies à caryotype défavorable, en l'absence de donneur 10/10, on acceptera d'emblée un donneur 9/10 ou un sang placentaire. Dans 40% des cas, on dispose d'un donneur de fichier 10/10.

Actuellement, on observe un engouement pour les greffes haplo-identiques correspondant à des greffes réalisées avec la mère, le père ou un enfant. Ce type de greffe était jusqu'alors plutôt réservé à certaines indications telles que les déficits immunitaires, mais, grâce à une modification de l'immunosuppression en post allogreffe (injection de cyclophosphamide), ces greffes sont maintenant réalisées par certaine équipe, dans le cadre de pathologies malignes (8).

A.3 Compatibilité HLA

En France, il est réalisé un typage de 12 antigènes HLA. La compatibilité HLA est évaluée au niveau allélique pour les antigènes de classe I HLA-A, -B, -Cw et de classe II DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA, DQB, DPB. Une compatibilité 10/10 correspond à une identité donneur/receveur HLA-A, -B, -C, DQ et DR.

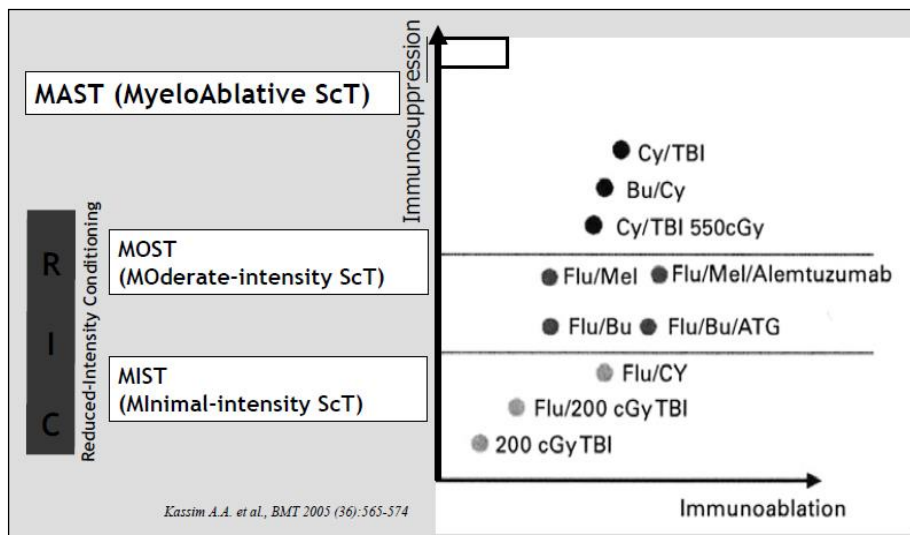
Le greffon doit être au moins 8/10 HLA compatible et au mieux 10/10 pour la moelle et les CSP. Pour le sang placentaire, l'immaturité du système HLA du nouveau-né exige une moindre compatibilité HLA, avec au mieux une compatibilité 6/6 correspondant à une compatibilité générique HLA-A, HLA-B et allélique HLA-DR.

B) Le conditionnement

Le conditionnement réalisé avant la greffe a 3 objectifs :

- un effet anti tumoral, permettant d'éradiquer des cellules tumorales résiduelles.
- un effet myélosuppresseur, permettant de « faire de la place » dans la niche hématopoïétique.
- un effet immunosuppresseur, pour lutter contre la réaction de rejet du receveur contre le greffon.

Ce conditionnement peut être plus ou moins de type myéloablatif et plus ou moins immunosuppresseur (figure 2) en fonction des comorbidités du receveur, du type de pathologies sous-jacentes (Figure 3) ...
L'utilisation des conditionnements d'intensité réduite (RIC) a permis de greffer des patients plus âgés, autrefois réfutés à la greffe(6).



Cyclophosphamide, Cy ; Busulfan, Bu ; Total Body Irradiation, TBI; Melphalan, Mel;
Antithymoglobuline, ATG; Fludarabine, Flu

Figure 2 : Conditionnement en fonction de l'immunosuppression et de l'immunoablation d'après Kassim, BMT 2005 (9).

	Leucémies	Aplasies	Déficits immunitaires
Myélo-ablatif	+++	-	++
Immunosuppresseur	+	+++	-
Antitumoral	+++	-	-

Figure 3: Effet recherché du conditionnement selon le type de pathologie sous-jacente.

Le conditionnement comporte une association de chimiothérapies ou bien une association chimiothérapie et irradiation corporelle. Pour les leucémies aigües myéloïdes (LAM), le plus souvent il s'agit de l'association busulfan intra veineux et cyclophosphamide et pour les leucémies aigües lymphoïdes (LAL), le plus souvent il s'agit de l'association irradiation corporelle et cyclophosphamide.

C) La prise du greffon

On observe une prise du greffon dans 95% des greffes. Avant la greffe, des marqueurs génétiques, pour lesquels il y a une différence entre le donneur et le receveur, sont identifiés. Ces différences correspondent au polymorphisme allélique au niveau de *short tandem repeats*. Ainsi, on évalue en PCR compétitive le pourcentage d'ADN du donneur et du receveur sur les cellules sanguines, c'est la chimère. Celle-ci permet de détecter la réapparition de cellules d'origine receveur après la greffe. On peut réaliser cette chimère sur sang total ou sur population séparée après tri cellulaire, ce qui permet de suivre la chimère myéloïde et lymphoïde. Pour s'assurer de la prise du greffon, on réalise une chimère à j30. L'objectif est d'avoir un receveur 100% donneur au niveau des cellules sanguines.

En cas de conditionnement non myéloablatif, on observe souvent une chimère mixte à j30. Au-delà de j30, on surveille régulièrement la chimère chez le receveur car la réapparition ou l'augmentation en cas de chimère mixte de l'ADN du receveur dans les cellules sanguines est anormale et fait redouter une rechute. On peut être amené à réinjecter des lymphocytes du donneur (DLI) pour renforcer le greffon et avoir une chimère 100% donneur.

IV) Résultats de l'allogreffe

A) Effet allogénique

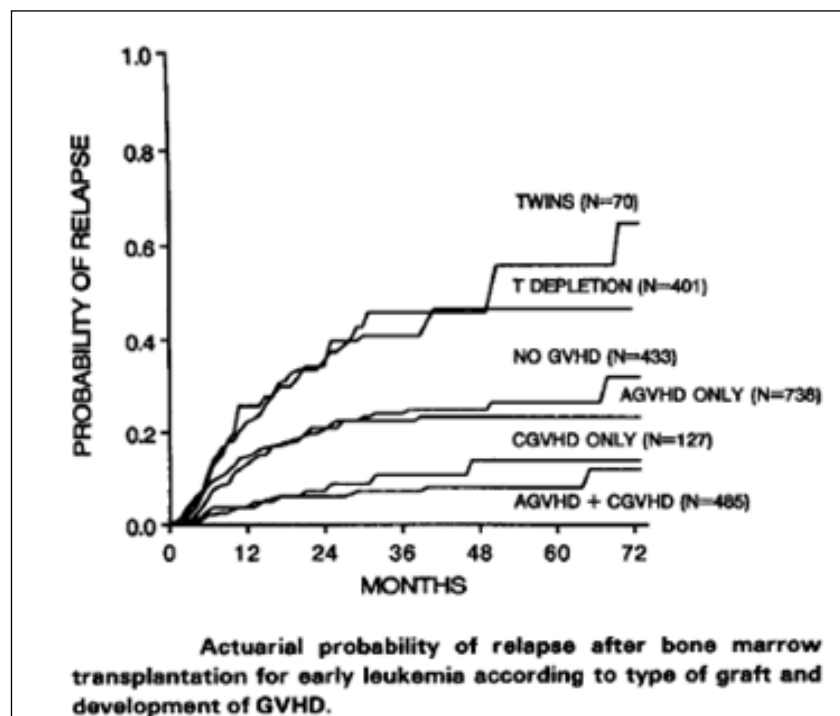


Figure 4 : Probabilité de survenue de rechute en fonction de la survenue de GVH, de la déplétion en lymphocytes T d'après Horowitz Blood 1990(10)

L'allogreffe est une immunothérapie, car au delà de l'effet dose de la chimiothérapie administrée dans le conditionnement, c'est l'effet « graft versus leukemia » (GVL), ou « graft versus tumor » (GVT), en cas de tumeur solide qui est recherché. Cet effet GVL ou GVT correspond à l'action des lymphocytes du donneur

sur les cellules résiduelles de la maladie chez le receveur. C'est cet effet GVL qui est corrélé à l'absence de rechute. Horowitz(10) a montré que la rechute est liée à la survenue ou non de GVH, au type de GVH (GVH aigüe survenant avant J100 ou GVH chronique survenant après J100) et au type de greffon (syngénique ou non, T déplété ou non) (Figure 4). Ainsi on admet qu'en cas de greffe syngénique l'effet GVL est quasi inexistant alors qu'en cas de survenue de GVHa et GVHc l'effet GVL est maximal puisque le risque de rechute est minimal.

A.1) Les antigènes mineurs d'histocompatibilités

Cet effet GVL est possible en raison de la présence de différences entre le donneur et le receveur, telles que les antigènes mineurs d'histocompatibilité (MiHAS). Ces antigènes mineurs correspondent au polymorphisme des gènes qui conduit à un polymorphisme protéique et à un polymorphisme peptidique. Ces MiHAS entraînent une réponse immune moindre. Un même HLA peut présenter plusieurs MiHAS ainsi, le HLA du receveur peut présenter des MiHAS du receveur et du donneur. Les MiHAS ubiquitaires sont responsables de la GVH et les MiHAS présents sur les cellules malignes sont responsables de l'effet GVL ou GVT. (11)

A.2) H-Y

H-Y est présent chez l'homme et absent chez la femme.

A.3) Les lymphocytes Natural Killer

Les lymphocytes « natural killer » (NK), *via* leurs récepteurs Killer cell Immunoglobulin-like Receptors, (KIR) par différents mécanismes de cytotoxicité (Fas/FasLigand, perforine/granzyme, TRAIL) peuvent détruire les cellules tumorales.

L'activation des lymphocytes NK peut se faire, *via* une action concertée entre les récepteurs KIR inhibiteurs et KIR activateurs de cytotoxicité, par la reconnaissance de l'absence de molécule HLA à la surface des cellules tumorales.

Polymorphisme KIR

A la surface des lymphocytes NK, le répertoire des récepteurs KIR est variable selon les individus et diffère donc entre le donneur et le receveur.

En fonction de la prédominance des signaux activateurs et inhibiteurs les lymphocytes NK s'activent et mettent en place une cytotoxicité ou bien restent inactifs (figure 5).

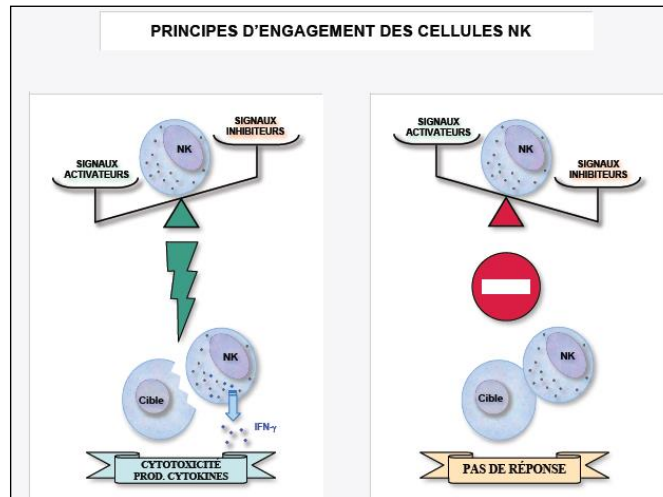


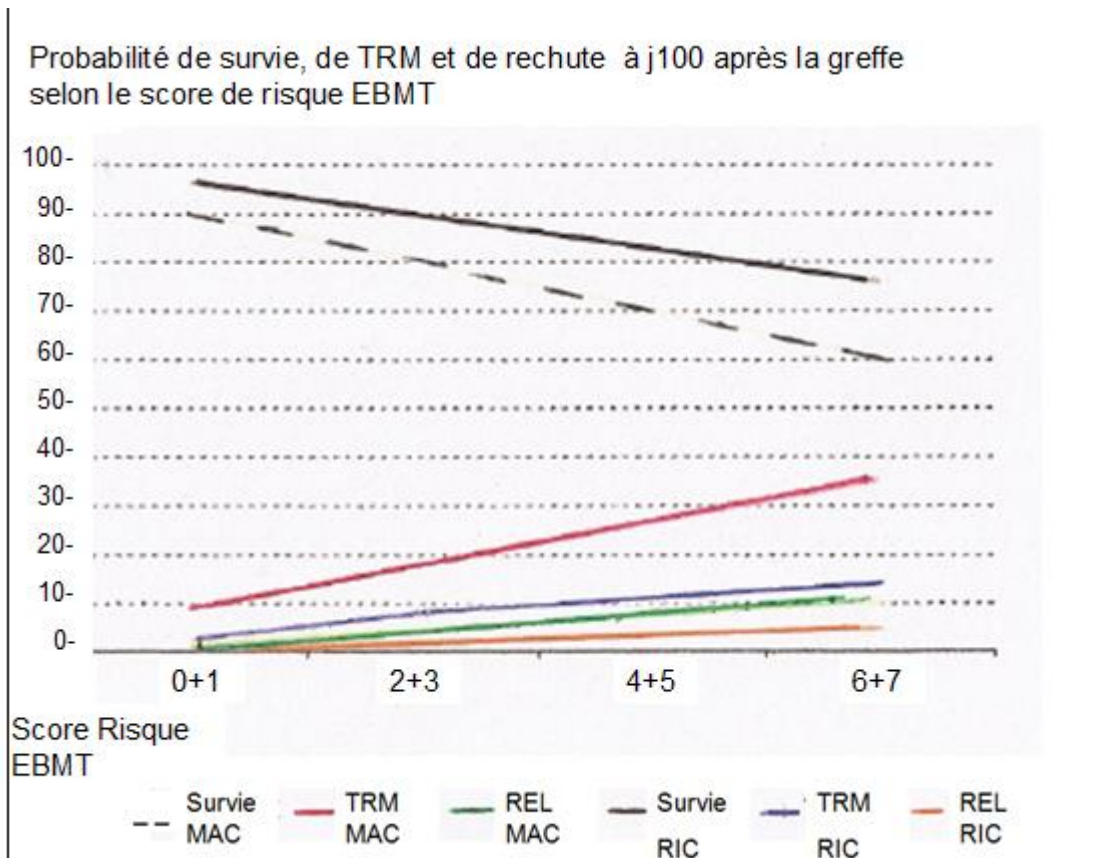
Figure 5 : Activation des NK en fonction de la balance des signaux activateurs et inhibiteurs.

B) La survie

Toutes allogreffes confondues, la survie globale après allogreffe est de 50%. La survie globale est très variable selon le délai diagnostic-greffe, le type de pathologie à l'origine de l'indication de la greffe (figures 6 et 7). Ainsi, dans la décision d'allogreffe il faut mettre en balance pour un patient donné le risque lié à la procédure d'allogreffe et le risque lié à l'histoire naturelle de la maladie.

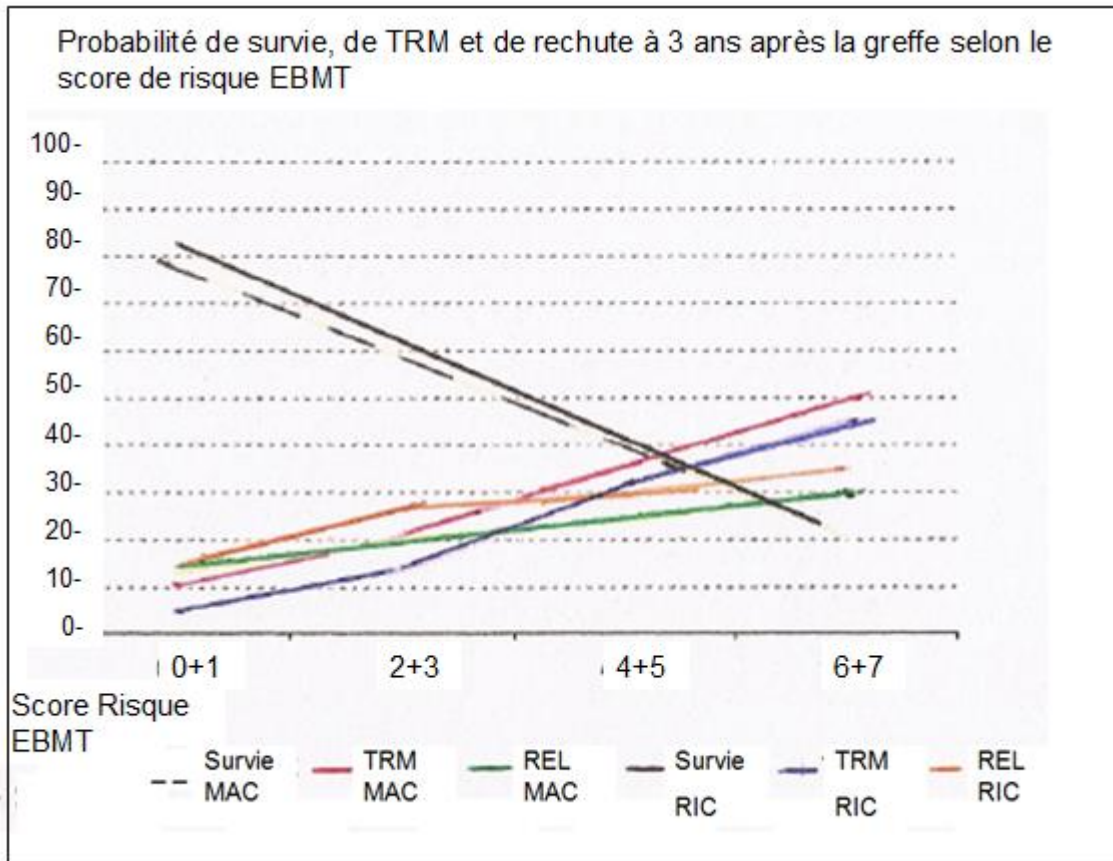
C) La rechute

Elle survient, le plus souvent, dans les 2 années qui suivent la greffe. Le risque de rechute est variable selon le type de pathologie ayant indiqué la greffe (figures 6 et 7). Elle peut être anticipée par le suivi de la maladie résiduelle et du chimérisme. En cas de rechute moléculaire ou de chimérisme mixte, on peut d'abord diminuer l'immunomodulation puis, en cas d'échec, réinjecter des lymphocytes du donneur, DLI, afin d'exercer un effet GVL.



Mortalité liée à la transplantation, TRM ; Rechute, REL ; Conditionnement myéloablatif, MAC ; Conditionnement d'intensité réduite, RIC ; Score de risque EBMT cf annexe 1

Figure 6 : Probabilité de survie, de mortalité liée à la transplantation (TRM) et de rechute à j100 selon le score de risque EBMT. D'après EBMT handbook : Haematopoietic Stem Cell Transplantation édition 2012(12).



Mortalité liée à la transplantation, TRM ; Rechute, REL ; Conditionnement myéloablatif, MAC ; Conditionnement d'intensité réduite, RIC ; Score de risque EBMT cf annexe 1

Figure 7 : Probabilité de survie, de TRM et de rechute à 3 ans après la greffe selon le score de risque EBMT. D'après EBMT handbook édition 2012(12).

D) Le rejet du greffon

Avec les conditionnements actuels, le rejet de greffon est exceptionnel et correspond à moins de 5% des allogreffes. L'immunosuppression du conditionnement et la dose de cellules CD34+ sont les 2 éléments importants pour éviter le rejet.

E) Les complications principales

La mortalité liée à la transplantation (TRM), correspond à l'ensemble des décès non liés à la rechute.

E.1) GVH

La GVH correspond à l'attaque par les cellules du donneur des cellules du receveur. Environ 70% des patients développent une GVH aigüe ou chronique, dont 30% des patients décéderont.

Elle peut être de type aigüe ou chronique, avec anciennement, une distinction en fonction du délai de survenue après la greffe. La GVH aigüe (GVHa) correspondait à des manifestations survenant dans les 100 premiers jours après la greffe. Cependant, avec les nouveaux conditionnements d'intensité réduite, on observe des manifestations cliniques typiques des GVHa après j100. Ainsi, depuis 2005(13) la distinction entre GVHa et GVH chronique (GVHc) est basée sur le type des manifestations cliniques et non plus sur le délai de survenue (figure 8).

	Délais post greffe	Signes GVHa	Signes GVHc
Gvh Aigue Classique	≤100j	oui	non
Persistante, récurrente, présentation tardive	>100j		
Gvh Chronique Classique Overloap syndrome	Pas de délai	non oui	oui

Figure 8 : Classification du type de GVH : GVHa ou GVHc d'après Filipovich BBMT 2005(13).

GVHa

La GVHa est la première cause de décès à court terme après la greffe. Elle touche environ 50% des patients allogreffés.

Physiopathologie de la GVHa (figure 9)

Le modèle de Ferrara (14)

Au cours de la GVHa, on observe en premier une phase d'initiation de la réaction immunitaire du donneur contre le receveur qui est liée au relargage de cytokines pro inflammatoires (TNF α , IL6 et IL1) par les tissus endommagés par le conditionnement. Ces cytokines augmentent l'expression des molécules d'adhésion

et l'expression des molécules HLA. Ce qui conduit à faciliter la reconnaissance des antigènes majeurs et mineurs d'histocompatibilité par les lymphocytes T matures du donneur.

Une deuxième phase consiste en l'activation des lymphocytes T du donneur par les cellules présentatrices de l'antigène du receveur. En réponse les lymphocytes de type TH1 du donneur vont proliférer et produire des cytokines de type TH1 : IL2 et IFN γ . Ces cytokines vont activer des lymphocytes T cytotoxiques (CTL), et NK, et aider les macrophages à produire de l'IL1 et du TNF α .

Puis, pendant la troisième phase, les CTL et les NK qui ont été activés vont rejoindre les tissus endommagés, via l'effet chimio-attractant, des cytokines et provoquer des lésions tissulaires à leur tour. Les macrophages, après activation par les cytokines TH1 et recevant un second signal, via le LPS relargué par les tissus endommagés à la première étape, vont également participer à cette destruction cellulaire.

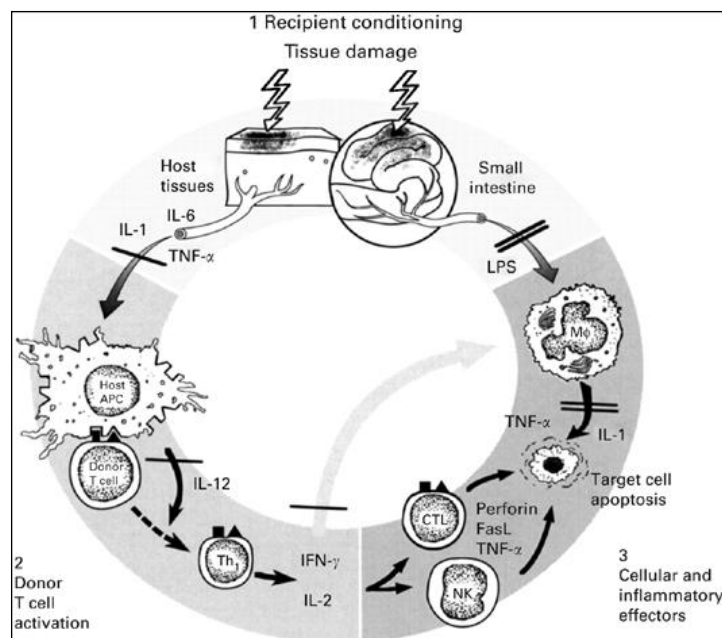


Figure 9 : Physiopathologie de la GVHa d'après Ferrara Seminars in Hematology 2006(15).

Ce modèle est surtout valable pour les greffes avec conditionnement myéloablatif. Les greffes d'intensité réduite entraînent moins de lésions tissulaires initialement.

Critères de Billingham

Pour que la réaction de GVHa ait lieu, Billingham a défini des critères :

- Le receveur doit être incapable de rejeter le greffon.
- Le greffon doit contenir des cellules immunocompétentes.
- Receveur et donneur doivent présenter des allo antigènes différents.
- Les cellules effectrices doivent être capables de migrer pour rejoindre les tissus cibles(16).

Les facteurs de risque de GVHa

Les facteurs de risque de survenue d'une GVHa sont la présence d'incompatibilités HLA, l'âge avancé, le donneur de sexe féminin, l'intensité du conditionnement, l'immunisation antérieure du donneur, les greffons de type CSP, la séropositivité pour le cytomégalovirus (CMV) du receveur et une indication de greffe pour une maladie en phase avancée.

Prophylaxie de la GVHa

Une prophylaxie de la GVHa sera instaurée. Elle sera fonction du type de conditionnement, du type de donneur apparenté ou non, et du statut de la maladie à la greffe. Cette prophylaxie vise principalement à « éteindre » les lymphocytes T soit en réalisant une T déplétion in vivo par sérum anti lymphocytaire (SAL) ou in vitro soit en inhibant leur prolifération (méthotrexate, mycophenolate mofetil) ou leur activation (inhibiteur de la calcineurine tel que la ciclosporine).

Les différents types d'atteintes

L'atteinte cutanée correspond à un érythème morbilliforme, plus ou moins étendu, pouvant dans les atteintes les plus sévères, conduire à un décollement cutané.

L'atteinte hépatique est de type cholestase avec un ictère, une augmentation de la bilirubine, des phosphatases alcalines, et de la 5'nucléotidase.

L'atteinte digestive peut correspondre à une simple anorexie comme à des vomissements ou des diarrhées plus ou moins profuses.

Quelque soit l'atteinte, il faut toujours éliminer des diagnostics différentiels tels qu'une infection ou une toxicité médicamenteuse.

Pour aider au diagnostic, on peut réaliser des biopsies avec étude en anatomopathologie à la recherche d'une infiltration par des cellules T allo réactives. Celles-ci attaquent, avec prédilection, les assises épithéliales basales de l'épiderme, entraînant l'apoptose des cellules malpighiennes basales, voire dans les formes les plus graves de l'ensemble de l'épiderme.

Classification

Selon le score de Glucksberg(17), on classera la GVHa en fonction de l'importance des atteintes de la peau, du foie et du tube digestif (figure 10).

Stade	Peau	Foie (bili)	TD (diarrhées)
0	Pas de rash	< 34 $\mu\text{mol/l}$	< 500ml/j
1	< 25 % SC	34-50 $\mu\text{mol/l}$	500-1000 ml/j
2	25-50% SC	51-102 $\mu\text{mol/l}$	1000-1500 ml/j
3	> 50 % SC	103-255 $\mu\text{mol/l}$	> 1500ml/j
4	Erythrodermie/ bulles/desquamation	> 255 $\mu\text{mol/l}$	> 1500 ml/j + dls abdos +/- ileus

Grade	Peau	Foie (bili)	TD (diarrhées)
I	St 1 ou 2	St 0	St 0
II	St 0-2	St 1	St 0-1
II	St 3	St 0-1	St 0-1
III	St 0-2	St 0-2	St 0-2
III	St 3	St 0-3	St 0-4
IV	St 0-4	St 0-4	St 0-4

Figure 10 : Score de Glucksberg(17).

Traitement (18).

Le traitement de première ligne consiste en l'administration de corticoïdes type méthylprednisone, à la dose de 2 mg/kg, puis en fonction de la réponse à 14 jours on réalisera une décroissance de la corticothérapie.

En cas de cortico-résistance ou de cortico-dépendance, des traitements de deuxième ligne sont proposés. Il n'y a pas de consensus sur le traitement de 2^{ème} ligne. On peut utiliser, du mycophénolate mofétil, des anti-TNF α , des inhibiteurs du récepteur de l'interleukine2, du sérum antilymphocytaire ou la photophérèse extra-corporelle, des bolus de méthotrexate ou des injections de cellules souches mésenchymateuses (MSC).

GVHc

La GVHc est la principale cause de morbi-mortalité tardive non liée à la rechute. Les décès sont principalement liés aux infections causées par l'immunodéficience, liée à la GVHc et à son traitement. Cependant, c'est la GVHc qui est associée à l'effet GVL et donc à un moindre risque de rechute.

Elle associe un déficit immunitaire et des symptômes cliniques similaires à ceux rencontrés dans des pathologies auto-immunes.

Physiopathologie

La physiopathologie de la GVHc est moins établie que celle de la GVHa.

On émet des hypothèses (19,20) :

- Le conditionnement entraîne des lésions au niveau du thymus conduisant à une défaillance dans la sélection des lymphocytes permettant la survie de lymphocytes auto réactifs, d'où les symptômes d'auto-immunité observés.
- Le conditionnement entraîne l'activation de macrophages qui vont en retour synthétiser du TGF β , qui en se fixant aux fibroblastes va induire la production de collagène. Cet excès de collagène peut expliquer les formes de GVHc type sclérodermie.
- Un défaut de collaboration entre les lymphocytes T et les lymphocytes B est également évoqué, conduisant à l'utilisation de thérapeutiques telles que le rituximab pour traiter la GVHc.

Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques(13) sont très variables pouvant atteindre de nombreux organes. Au niveau cutané, on peut observer des sclérodermies, des sécheresses oculaires, des lichens endobuccaux. Au niveau pulmonaire, on observe surtout des anomalies obstructives telles que la bronchiolite oblitérante ou les pneumopathies organisées(21). On peut également observer des cytopénies.

Facteur de risque

Le principal risque de la GVHc est l'antécédent de la GVHa. Les autres facteurs de risque sont les greffons de type CSP, l'âge avancé, un donneur féminin, un donneur non apparenté, une incompatibilité HLA.

Classification de la GVHc (figures 11 et 12)

Grade	Type d'atteinte
Limité	Atteinte cutanée localisée et/ou atteinte hépatique
Extensif	Atteinte cutanée localisée ou atteinte hépatique additionnée à l'une des atteintes suivantes : -Histologie hépatique montrant une hépatite chronique agressive, une nécrose ou une cirrhose. -Atteinte oculaire (Schirmer <5mn) -Atteinte salivaire ou buccale démontrée par biopsie -Atteinte de tout autre organe

Figure 11: Ancienne classification de la GVHc d'après Shulman Am J Med (22).

Depuis 2005, selon le degré et le nombre d'organes cibles atteints, on classe la GVHc en légère, modérée ou sévère (figure 12).

Grade de GVH chronique	Atteinte maximale	Atteinte pulmonaire
Légère 29%	1 ou 2 organes atteints Et Score max =1	Non
Modérée 42%	1-2 organes et score max=2 Ou ≥ 3 organes et score max=1	Score =1
Sévère 28%	1 score=3 Ou ≥3 organes et score >1	Score ≥2

Figure 12: Tableau classification grade de sévérité de la GVH chronique D'après Filipovich BBMT 2005(13)

Traitement de la GVHc

Le traitement de première ligne comporte des corticoïdes avec plus ou moins de la ciclosporine, selon la sévérité des atteintes.(23)

Le traitement de 2ème ligne(24) n'est pas codifié, mais certains traitements semblent plus efficaces sur certaines atteintes. Par exemple, on reconnaît l'efficacité de la photochimiothérapie extra corporelle en cas d'atteinte cutanée et des inhibiteurs de la tyrosine kinase dans les formes sclérodermiques. D'autres traitements sont utilisés en 2^{ème} ligne : le rituximab, les inhibiteurs de mTor... Des

thérapeutiques innovantes, telles que l'injection de cellules souches mésenchymateuses, offrent des perspectives intéressantes.

Le traitement de la GVHc doit associer des prophylaxies anti infectieuses et des mesures associées telles que les larmes artificielles, le support nutritionnel et la crème solaire protectrice.

Survie

La survie de la GVHc est fonction du grade de la GVH allant d'une survie globale à 5 ans de 83% en cas de forme légère à 46% en cas de forme sévère (figure 13). L'atteinte d'organe la plus grave est l'atteinte pulmonaire.

Grade de GVH chronique	Survie globale à 5 ans	Mortalité liée à cGVH
Légère 29%	83%	0%
Modérée 42%	77%	9%
Sévère 28%	46%	30%

Figure 13 : Survie en cas de GVH chronique en fonction du grade de sévérité d'après Perez-Simon BBMT 2008(25) .

E.2) Autres complications de la greffe :

Les autres complications, à court terme, de la greffe sont représentées par les cystites hémorragiques, les pathologies de l'endothélium : les maladies veino-occlusives, les micro-angiopathies thrombotiques, le syndrome de prise de greffe, le syndrome de fuite capillaire, les pathologies neurologiques (encéphalopathie post-conditionnement...), le syndrome de pneumopathie idiopathique...

La greffe est aussi associée à des complications à long terme liées au conditionnement telles que les cancers secondaires (thyroïde, mélanome...), les troubles endocriniens (infertilité, syndrome métabolique)...

Ce sont ces complications à long terme et la GVHc qui ont un impact sur la qualité de vie des patients guéris de leur pathologie initiale.

Les Maladies veino-occlusives (MVO)

Physiopathologie

L'endothélium des cellules sinusoïdales et les hépatocytes sont le site primaire de la toxicité, ensuite il y a un syndrome d'obstruction des sinusoïdes avec des anomalies de la microcirculation. Puis apparaissent des microthromboses des veinules et des sinusoïdes. Ensuite, on observe un stade hypercoagulant avec une baisse de l'antithrombine, de la protéine C et du facteur VII et une augmentation de la phospholipase A1. Enfin, on observe une hypertension portale et une fibrose puis une nécrose hépatocellulaire conduisant à un syndrome hépato rénal. Le stade terminal est une défaillance multi-organe.

Epidémiologie

L'incidence est de 10 à 15% des greffes. Les principaux facteurs de risque sont l'âge jeune (moins de 4 ans), l'utilisation de busulfan dans le conditionnement, les greffes non apparentées, l'ostéopétrose.

Prophylaxie

Une prophylaxie est réalisée en surveillant le taux de busulfan, en évitant les hépatotoxiques et en administrant de l'héparine à 100UI/kg et de l'acide ursodésoxycholique.

Diagnostic

Cliniquement on observe un ictère, une rétention hydro sodée avec prise de poids et œdèmes, une ascite et une hépatomégalie douloureuse.

Un écho doppler des veines hépatiques retrouve une augmentation des résistances et parfois une inversion du flux porte.

Au niveau biologique on observera une thrombopénie réfractaire aux transfusions, un temps de thrombine diminué avec une baisse du facteur VII et une diminution de l'antithrombine.

On peut également réaliser une biopsie hépatique (par voie transjugulaire). On observera une réduction concentrique non thrombotique de la lumière des petites veines intra hépatiques. Une biopsie normale n'exclue pas le diagnostic.

Les critères diagnostiques sont définis soit par les critères de Seattle (Mc Donald) soit par les critères de Baltimore (Jones) :

_Les critères de Seattle correspondent à la présence dans les 20 jours après la greffe de 2 critères parmi un ictère, une bilirubine supérieure à 2mg/dl, une hépatomégalie plus ou moins douloureuse, une prise de poids de plus de 2%.

_Les critères de Baltimore correspondent à la présence dans les 21 jours après la greffe d'une augmentation de la bilirubine à plus de 2mg/dl et deux des signes suivants: hépatomégalie plus ou moins douloureuse, ascite, prise de poids de plus de 5%.

Il est nécessaire d'écarter les diagnostics différentiels tels qu'une infection, une GVH hépatique, une toxicité médicamenteuse.

Traitement

Le traitement est symptomatique avec une restriction hydro sodée, médicamenteux avec des diurétiques, une supplémentation en albumine afin de maintenir un volume intra vasculaire suffisant pour la perfusion rénale, des antalgiques.

Le traitement spécifique est le défibrotide qui agit en diminuant le taux de phospholipase A1 qui est l'inhibiteur principal de la cascade de fibrinolyse. En cas de MVO très sévère une transplantation hépatique peut être nécessaire.

Evolution

La mortalité attribuable à la MVO est comprise entre 18 et 28%. Pour les MVO sévère elle atteint 75 à 95%.

La Microangiopathie thrombotique (MAT)

Physiopathologie

Il s'agit d'une pathologie de l'endothélium, il n'y pas de déficit en ADAMTS 13. On observe une dysfonction endothéliale généralisée conduisant à l'activation intravasculaire des plaquettes et à la formation de thrombi riches en plaquettes dans la microcirculation. On observe également une hyperapoptose des cellules endothéliales (FAS dépendante) de la microvascularisation au niveau du système nerveux central, de la peau, et des reins.

Epidémiologie

L'incidence est très variable 2-21%.

Diagnostic

Les critères diagnostiques sont retenus par l'international working groupe de l'EBMT sont : une schizocytose supérieure à 4%, une thrombopénie inférieure à 50G/L ou en baisse des plaquettes de plus de 50%, une augmentation durable des LDH, une baisse de l'hémoglobine ou une augmentation des besoins transfusionnels en culot globulaire, une baisse de l'haptoglobine.

Selon la quantité de schizocytes, le taux de LDH et la clinique on grade la MAT (tableau 1).

Grade	LDH	Schizocytes (%)	clinique
0	N ou ↑	≤1.2	Absence
1	N	≥ 1.3	Infraclinique
2	↑	1.3-4.8	Minime
3	↑	4.9-9.6	Modérée
4	↑	≥ 9.7	Sévère

Tableau 1 : Gradation des MAT.

Traitement

On commence par suspendre les traitements immunosuppresseurs pourvoyeur de MAT : les inhibiteurs des calcineurines (la ciclosporine et le tacrolimus), les inhibiteurs de m-Tor (le sirolimus et l'everolimus).

L'intérêt des échanges plasmatiques est contesté.

Un traitement par soliris, actuellement utilisé dans les syndromes hémolytiques et urémiques atypiques, est proposé par certaines équipes (26).

Le syndrome de fuite capillaire

Physiopathologie

Il s'agit de la fuite extravasculaire des liquides intravasculaires.

Epidémiologie

Les facteurs favorisants sont l'utilisation de facteurs de croissance hématopoïétiques et les greffes non apparentées.

L'incidence n'est pas connue.

Diagnostic

Pour poser le diagnostic il faut 3 critères majeurs ou 2 critères majeurs et plus d'1 critère mineur.

Les critères majeurs sont une hyperthermie supérieure ou égale 37°3 non expliquée, un rash supérieur à 25% de la surface corporelle, un œdème pulmonaire non cardiogénique.

Les critères mineurs sont une altération de la fonction hépatique, une insuffisance rénale (créatinine qui double), une prise de poids de plus de 2.5%, et une encéphalopathie transitoire non expliquée.

Traitement

Il faut arrêter le G-CSF et associer des traitements symptomatiques : corticoïdes à 2 mg /Kg/j, restauration d'une volémie efficace avec albumine et déplétion hydro sodée, restriction hydrique voir une épuration extra-rénale.

Evolution

En cas de progression le risque est d'observer un syndrome de défaillance multi-organes dont le taux de mortalité est élevé.

Le syndrome de prise de greffe

Physiopathologie

Le syndrome de prise de greffe est lié au relargage massif de cytokines proinflammatoires par les tissus endommagés par le conditionnement et par la dégranulation des polynucléaires neutrophiles.

Epidémiologie

L'incidence varie de 8 à 12%. Les facteurs de risque sont l'utilisation de facteur de croissance hématopoïétique et les greffes de CSP.

Diagnostic

Ce syndrome survient dans les 96h encadrant la sortie d'aplasie. Pour poser le diagnostic il faut 3 critères majeurs ou 2 critères majeurs et 1 critère mineur. Les critères majeurs sont une hyperthermie d'origine non infectieuse, un rash de plus de 25% de la surface cutanée ou des infiltrats pulmonaires. Les critères mineurs sont une diarrhée, une prise de poids, une insuffisance rénale, une atteinte du système nerveux central.

Traitement

Le traitement comporte une corticothérapie à 0.5 à 10 mg/Kg (en moyenne 1 mg/Kg) avec décroissance sur 1 semaine, un arrêt du GCSF, et un traitement symptomatique avec restriction hydrique, restauration d'une volémie efficace (macromolécules et déplétion hydro-sodée).

Evolution

Avec la mise en place d'un traitement précoce, on observe une résolution complète en 1 à 5 jours dans plus de 80% des cas.

F) Immunité en post allogreffe

F.1) Reconstitution immunitaire

Le conditionnement a un rôle plus ou moins myéloablatif conduisant à une destruction des précurseurs granulocytaires. Il a également un rôle immunosuppresseur, en éradiquant presque totalement les lymphocytes du receveur, pour éviter les rejets du greffon par le système immunitaire du receveur. Ainsi, en post allogreffe on observe à la fois un défaut de l'immunité innée et de l'immunité adaptative.

La reconstitution immunitaire après greffe sera liée à :

- une expansion des lymphocytes matures et naïfs contenus dans le greffon
- une granulopoïèse et une lymphopoïèse de novo à partir des CSH contenus dans le greffon.

De nombreux facteurs interfèrent dans la reconstitution immunitaire :

- pour le receveur : l'âge, le type de conditionnement (myéloablatif ou non), l'utilisation de sérum anti lymphocytaire, la pathologie initiale.
- la source de CSH : moelle, cellules souches périphériques, sang placentaire, les manipulations du greffon
- l'évolution post greffe avec la survenue de GVH et d'infections.

On observe, dans un premier temps, une défaillance de l'immunité innée, liée à une destruction par le conditionnement à la fois des muqueuses qui constituent le premier obstacle aux pathogènes et à la fois des CSH conduisant à une neutropénie. Durant cette phase, le patient sera principalement exposé aux bactéries et aux infections fongiques. Selon le type de greffon, cette phase a une durée variable allant de 14 jours pour un greffon de cellules souches périphériques à 21 jours pour un greffon médullaire et jusqu'à 30 jours en cas de sang placentaire. Il faut noter que la restauration d'un nombre seuil de polynucléaires neutrophiles à plus de 500/ μ l ne suffit pas. En effet, ces PNN ne sont pas immédiatement fonctionnels. Initialement, on observe une diminution du chimiotactisme, de la production d'ions superoxyde et de la bactéricidie (27).

Les cellules Natural Killer (NK) retrouvent à la fois, des niveaux normaux et une fonctionnalité dès les 2 premiers mois qui suivent la greffe et ceci indépendamment du type de greffon ou de la présence de GVH. On note précocement une expansion des NK CD56 « bright » CD16 low qui sont capables de produire des cytokines (28), une forte activité « lymphokine activated killer » et peu de cytotoxicité naturelle et médiée par les anticorps .

Les cellules dendritiques également retrouvent des niveaux normaux précocement.

Au niveau de l'immunité adaptative, le déficit immunitaire observé, après l'allogreffe, est lié à une défaillance de production et d'éducation thymique des lymphocytes. On observe, également, un défaut périphérique de présentation de l'antigène.

Il est important de noter, que ce n'est pas seulement un chiffre seuil de lymphocytes qui permet de prédire une reconstitution immunitaire satisfaisante mais, surtout une évaluation satisfaisante des capacités fonctionnelles des lymphocytes.

Lymphocytes T (27)

Dans un premier temps, on observe une expansion des lymphocytes T mémoires du donneur, qui étaient contenus dans le greffon, conduisant à une faible diversité du répertoire T responsable d'une moindre réponse anti-infectieuse. On observe une prédominance de CD8 avec une inversion du rapport CD4/CD8. Puis, dans un second temps ce met en place une production de novo, à partir du thymus du receveur, de lymphocyte T naïf.

Au total, durant la première année post allogreffe, la lymphopoïèse à partir de la différenciation des CSH du donneur est altérée de part :

- Des anomalies de la niche hématopoïétique du fait de l'âge et du conditionnement entraînant une faible production de précurseurs lymphocytaires.

- Un défaut d'entrée des progéniteurs lymphoïdes au niveau du thymus(29).

- Une altération de la thymopoïèse du fait de l'âge, du conditionnement et de la GVH (30), ce qui conduit à une diminution de la capacité de production de lymphocytes T naïfs avec une faible diversité du répertoire des récepteurs T, entraînant une augmentation du risque d'infections opportunistes et de rechute.

L'étude des T cell receptor Rearrangement Excision DNA Circles (TREC) permet d'estimer cette production de lymphocytes T naïfs et montre un défaut de thymopoïèse jusqu'à 3 à 6 mois après la greffe.

Lymphocytes B

Dès 3 mois, après la greffe les lymphocytes B retrouvent des niveaux quasi normaux. Cependant, la restauration d'une production des immunoglobulines pourra durer 2 ans. Avec notamment un délai avant la production d'IgG2 et IgG4 permettant une protection vis-à-vis des germes encapsulés. Les anticorps dirigés contre des antigènes régulièrement rencontrés, tels que le CMV, retrouvent leur niveau d'avant la greffe, à la différence de ceux dirigés contre des antigènes moins rencontrés tels que le tétanos, la poliomyélite. Il est donc important d'avoir une stratégie vaccinale précoce en post allogreffe.

F.2) Les infections en post allogreffe

Les infections demeurent une cause de morbi-mortalité importante en post allogreffe. Cependant, au cours de la dernière décennie, on note une diminution de la mortalité liée aux infections, probablement en lien avec l'amélioration de mesures de supports, de nouvelles molécules anti-infectieuses et les conditionnements de toxicité réduite(31).

Les principaux facteurs de risque d'infection après la greffe sont le statut de la pathologie hématologique avant la greffe, les comorbidités du patient, le degré d'immunosuppression lié au conditionnement et à la prophylaxie de la GVH, la rupture des premières de défense (mucite).

En fonction du type de déficit immunitaire on observera différents types d'infections, ce qui permet de séparer en 3 phases la période post allogreffe (figure 14).

-une phase précoce de J0 à J30

Durant cette phase, le patient est le plus à risque d'infections de tout type puisqu'on rencontre à la fois une défaillance de l'immunité innée et de l'immunité adaptative. De plus, les patients ayant eu une irradiation au cours de leur conditionnement ont une asplénie fonctionnelle

Les principaux pathogènes rencontrés durant cette phase sont les bactéries à gram positif et négatif, les candida et l'herpes simplex virus (HSV).

Les patients ayant eu un conditionnement d'intensité réduite ont moins d'infections liées à la neutropénie et à la mucite.

-une phase intermédiaire de J30 à J100

Les principaux pathogènes rencontrés durant cette phase, sont les virus avec notamment le CMV et les champignons avec notamment l'aspergillus.

-une phase tardive après J100

Les infections survenant durant cette période sont liées à la présence de GVH qui compromet la reconstitution immunitaire.

La persistance d'une asplénie fonctionnelle liée au conditionnement et à la présence d'une GVH conduit à un risque d'infection à germes encapsulés.

A cette phase, il existe une relation claire entre le nombre de lymphocytes CD4 et la survenue de certaines infections telles que la toxoplasmose ou les infections à mycobactéries.

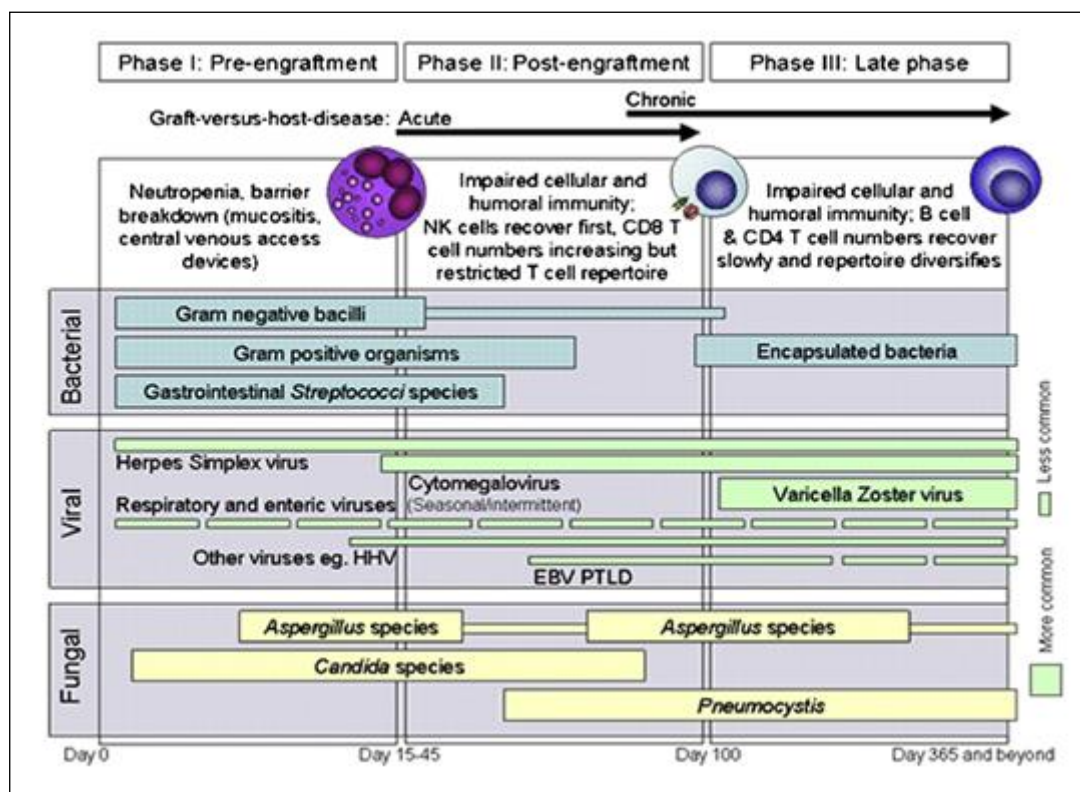


Figure 14 : Différentes phases infectieuses en post allogreffe d'après Tomblyn BBMT 2009(32).

Le greffon

Le greffon comprend différents types cellulaires : les cellules nucléées totales, les globules rouges et les plaquettes. Parmi les cellules nucléées totales, il y a les cellules souches qui permettent la prise de greffe.

Nous n'évoquerons que les greffons de type médullaire et CSP.

I) Composition du greffon

A) Cellules nucléées totales

Les cellules nucléées totales (CNT) correspondent aux leucocytes et aux érythroblastes.

B) Cellules souches hématopoïétiques

B.1) Généralités sur les cellules souches

Les cellules souches ont la capacité de proliférer, de s'auto renouveler et de se différencier en éléments matures. Elles effectuent des divisions symétriques lorsqu'elles donnent 2 cellules identiques et des divisions asymétriques lorsqu'elles donnent naissance à 2 cellules filles différentes : une cellule souche et une cellule différenciée (figure 15).

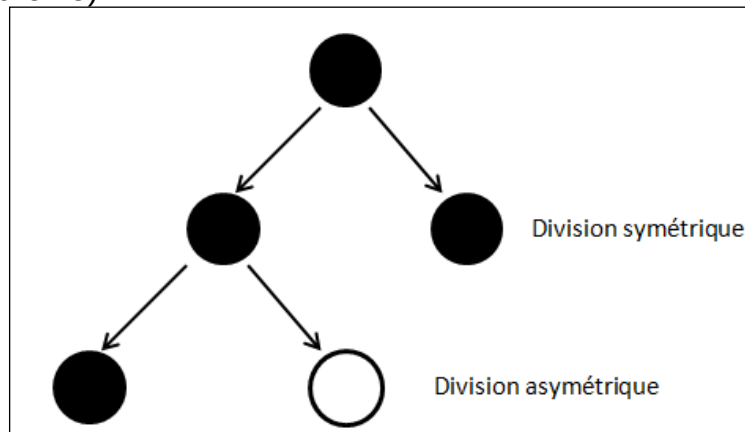


Figure 15 : Division cellulaire symétrique et asymétrique

Les cellules souches ont différents potentiels de différenciation.

Les cellules souches totipotentes correspondent aux cellules embryonnaires jusqu'à 8 blastomères soit jusqu'au stade blastocyste. Elles sont capables de reconstituer un individu entier.

Les cellules souches pluripotentes correspondent aux cellules embryonnaires à partir du stade blastocyste. Elles sont capables de donner tous les types tissulaires, hormis les annexes embryonnaires.

Les cellules souches multipotentes sont capables de reconstituer tous les types cellulaires issus du même feuillet embryonnaire.

Les cellules souches unipotentes ne donnent qu'un type cellulaire mais conservent leur capacité d'auto-renouvellement.

Chez l'adulte, on distingue plusieurs types de cellules souches multipotentes : les cellules souches multipotentes généralistes et les cellules souches multipotentes spécialisées.

Parmi les cellules souches multipotentes spécialisées, on trouve les CSH, les cellules épidermiques.

Parmi les cellules souches multipotentes généralistes, on trouve les cellules souches mésenchymateuses.

B.2) Les cellules souches hématopoïétiques

Au cours du développement, les CSH naissent au niveau de la splanchnopleure para aortique (33–35), puis colonisent le foie fœtal et finalement s'établissent au niveau de la moelle osseuse (figure 16).

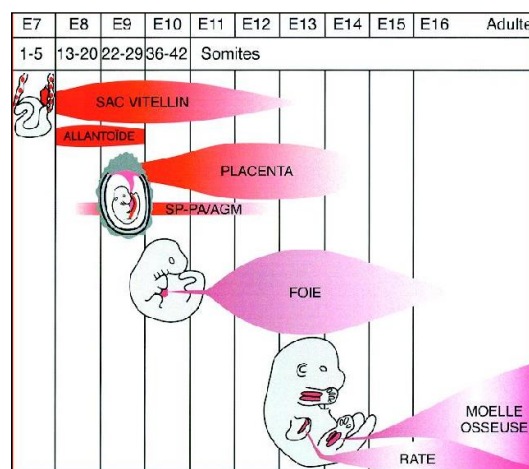


Figure 16 : Localisation de l'hématopoïèse au cours de l'embryogenèse. splanopleure para aortique, SPoA ; Aorte-gonade_mesonephros , AGM

Les CSH sont des cellules souches multipotentes, donc capables de reconstituer un type tissulaire dans son ensemble. Elles possèdent des propriétés d'auto renouvellement, de prolifération, et ont la capacité de se différencier en tous les éléments figurés du sang. Ainsi, il a été montré, que chez la souris, après irradiation létale, qu'une seule cellule souche hématopoïétique est capable de reconstituer une hématopoïèse complète et durable(36–39).

L'hématopoïèse

L'hématopoïèse est l'ensemble des processus, qui assure la production constante et régulée des différentes cellules sanguines (figure 17). La moelle osseuse contient une hiérarchie de progéniteurs hématopoïétiques à différents niveaux de maturation. Elle produit environ 10^{12} cellules par jour, pour permettre une homéostasie des cellules sanguines, puisque celles-ci ont une durée de vie limitée (tableau 2). La production médullaire peut également augmenter en cas de besoin exceptionnel, tel qu'une infection ou une hémorragie ...

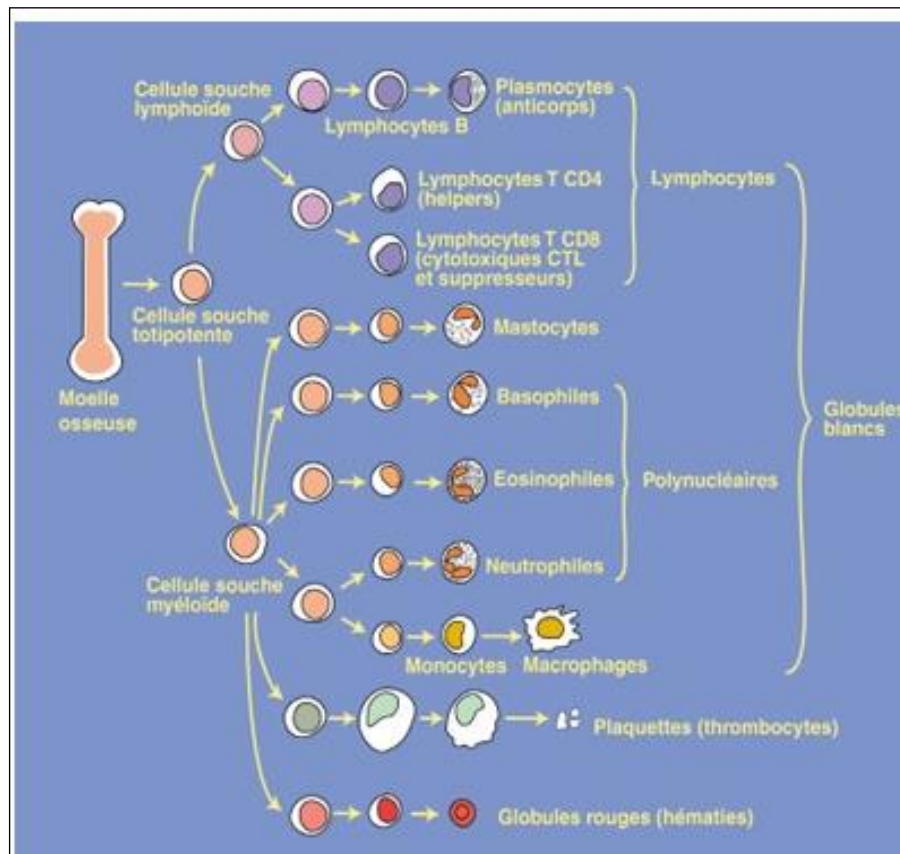


Figure 17 : Schéma de l'hématopoïèse

	Nombre	Durée de vie	Production par jour
Globules rouges	$20 \cdot 10^{12}$	120 jours	$200 \cdot 10^9$
Polynucléaires neutrophiles	$0.5 \cdot 10^{12}$	24 heures	$50 \cdot 10^9$
Plaquettes	10^{12}	7 jours	$100 \cdot 10^9$

Tableau 2 : Production quotidienne et durée de vie des cellules du sang

Les différents tests d'évaluation indirects des CSH

On ne peut pas évaluer directement le nombre de CSH médullaire ainsi différentes techniques permettent d'évaluer indirectement leur nombre (figure 18).

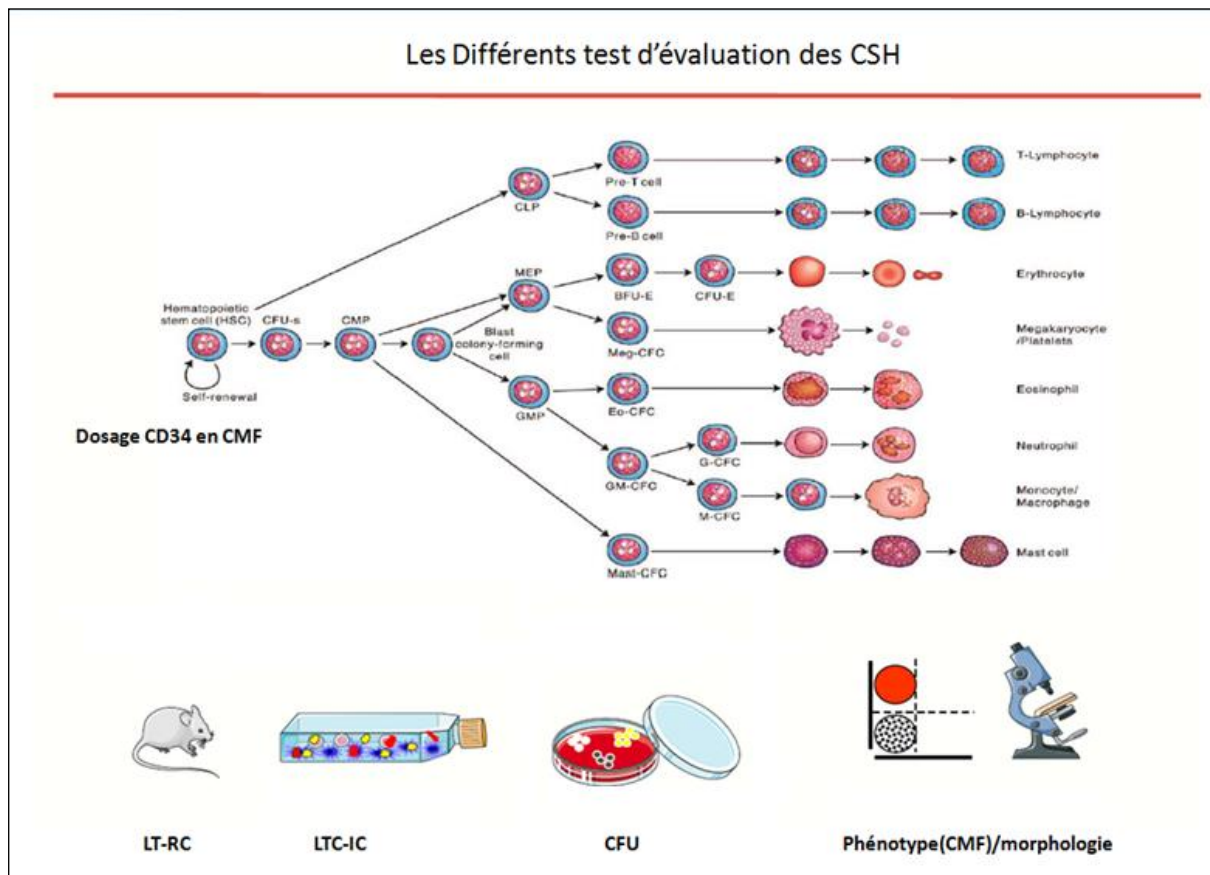


Figure 18 : Schéma de l'hématopoïèse avec les différents tests d'évaluation des CSH

Tests in vitro

-CFU : colonies formant unité : on met en évidence de manière rétrospective la présence des progéniteurs clonogéniques hématopoïétiques. On cultive des cellules issues de prélèvement médullaires sur milieu semi solide pendant 14 jours, puis on observe le nombre de colonies. Le milieu semi-solide permet d'immobiliser les cellules, ainsi on est certain que la colonie observée a pour origine une seule cellule (figure19).

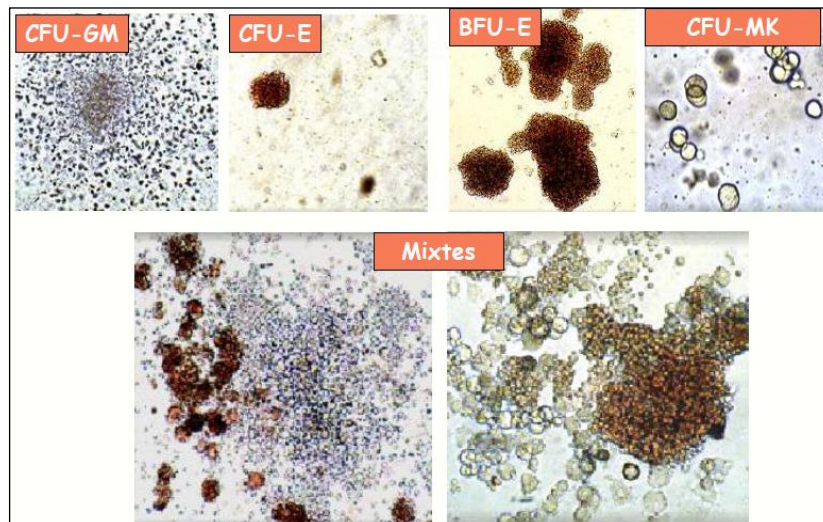


Figure 19 : Les progéniteurs clonogéniques hématopoïétiques. Colonies formant unité, CFU-GM ; colonies formant unité érythroïde, CFU-E

-LTC-IC : Long terme culture-initiating cell : on observe, rétrospectivement, la présence de LTC-IC initiale. On cultive pendant 5 semaines les cellules médullaires sur un stroma (cellules souches mésenchymateuses), puis on cultive pendant 14 jours sur milieu semi solide. On compte le nombre de colonies obtenues à l'issue des 14 jours. Pour obtenir une estimation du nombre de LTC-IC initiales, on fait le rapport entre le nombre de cellules initialement plantées et le nombre de colonies obtenues.

Test in vivo

-LT-RC : Long terme repopulating cell : Il s'agit du seul test permettant de prouver la présence de CSH dans une population de cellules. Il consiste dans un premier temps en l'injection des cellules à étudier dans une souris létalement irradiée. Au bout de 20 semaines après l'injection primaire les LT-RC sont mise en évidence. Puis on teste le sang, la rate, le thymus et la moelle osseuse (MO) de la souris receveuse par cytométrie en flux pour établir le degré de contribution des LT-RC issues de l'injection primaire à la reconstitution du système hématopoïétique de la souris greffée. Cette injection primaire permet donc de tester la multipotence des CSH immatures initialement présente. D'autre part différentes doses de la MO de cette souris sont injectées dans une deuxième souris receveuse létalement irradiée, pour tester la capacité des LT-RC à reconstituer son système hématopoïétique ; on parle de reconstitution secondaire. Cette 2^{ème} injection permet de tester leur potentiel d'autorenouvellement.

Isolement de la CSH directement

Pour la greffe, il est nécessaire de quantifier rapidement et directement le nombre de CSH juste avant la greffe et non de manière différée avec des évaluations rétrospectives (CFU, LTC-IC, LT-RC). Pour quantifier directement les CSH, on peut quantifier en cytométrie le nombre de cellules porteuses de certains antigènes de surface reflétant le phénotype cellulaire.

Chez la souris(40)

L'équipe de Weissman(41,42) a montré que l'injection de cellules médullaires exprimant l'antigène stem cell-1, Sca-1, ayant une faible expression de Thy1.1 et n'exprimant pas de marqueurs de lignage, lin-, permet de reconstituer une hématopoïèse durable et de maintenir en vie des souris adultes de type C57BL/Ka-Thy-1.1, irradiées létalement. Ikuta et Weissman(43) ont montré que les cellules médullaires Sca-1⁺, Lin⁻, Thy-1.1⁺ qui exprimaient un protooncogène de la famille des tyrosines kinase, c-kit étaient capables d'une activité de reconstitution multi lignées à long terme. Osawa et al (44) ont montré que les cellules médullaires CD34^{low/-}, c-kit⁺, Sca-1⁺, Lin⁻ correspondent aux CSH de souris. Il a également été montré que les CSH murines exprimaient une pompe à efflux des colorants tel que le HOESCHT. En cytométrie, après mise au contact de Hoesht, les CSH sont sur le côté : side population(SP) (45).

Au total chez la souris les CSH sont définies par le phénotype suivant : **CD34-, lin-, Sca+, c-kit+, SP-**.

Chez l'homme(46,47)

Afin d'isoler la CSH, deux hypothèses ont été posées :

_La présence sur les CSH de marqueurs de surface qui disparaissent avec la maturation.

_Les cellules leucémiques, puisque bloquées dans leur maturation, possèdent les marqueurs CSH.

Ainsi des souris ont été immunisées avec des cellules leucémiques et parmi les anticorps obtenus, ceux ayant une forte affinité pour les cellules de l'immunité et une faible affinité pour les cellules sanguines matures, ont été étudiés. Cela a permis l'identification d'un anticorps murin nommé My10, fixant 1% des cellules normales de la moelle osseuse. Les cellules fixant le My10, possèdent des propriétés d'auto renouvellement in vitro. Toutes les CSH humaines, les progéniteurs hématopoïétiques en cours de différenciation et les cellules endothéliales expriment le My10, les autres cellules humaines n'expriment pas My10.

Actuellement My10 est nommé CD34+.

La fraction de cellules CD34+ CD38- correspond aux cellules CD34+ les plus immatures, donc multipotentes, capables de reconstituer l'hématopoïèse dans des souris non-obese diabetic/severe combined immunodeficiency (NOD/SCID) ou rag2^{-/-} γ^{-/-}. (48) Les cellules CD34+CD38- correspondent à environ 0.1% des cellules médullaires totales.

Chez l'homme les CSH sont CD45+ CD34+ CD38- .

B.3)CD34+(49)

Structure

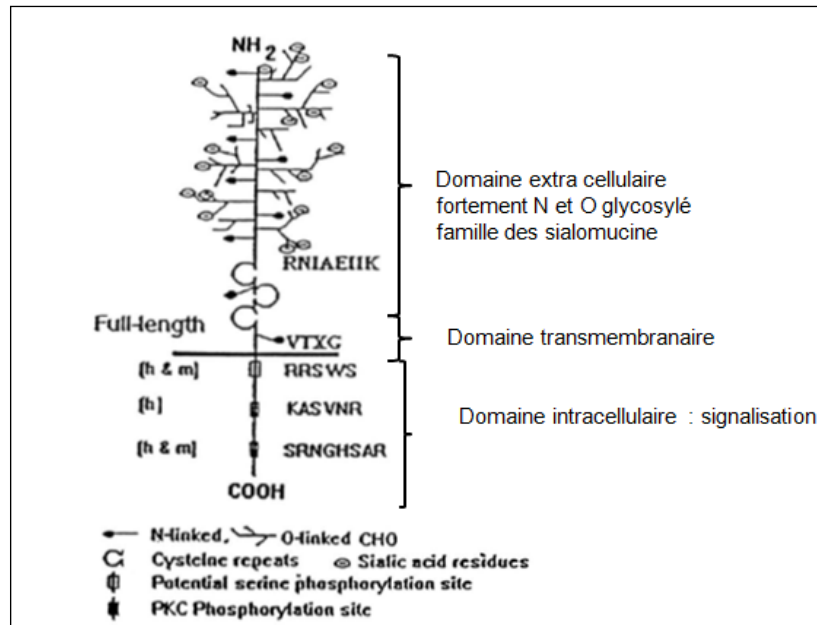


Figure 20 : Structure CD34 D'après Krause Blood 1996(49).

L'antigène CD34+ est une protéine transmembranaire de type I, fortement glycosylée, qui est membre de la famille des sialomucines (49) (figure 20). Il existe différentes formes de CD34+ plus ou moins glycosylées. CD34+ est exprimé sur les CSH, sur les progéniteurs hématopoïétiques et sur les cellules endothéliales des petits vaisseaux. L'expression de l'ARNm de CD34+ est détectée au niveau du foie, de la rate, de la moelle osseuse et du thymus et aussi au niveau du cœur, des poumons, des muscles squelettiques, des reins et du cerveau fœtal et adulte.

Il existe 3 classes d'anticorps anti-CD34 classés selon leur capacité à reconnaître le CD34 après traitement enzymatique : neuraminidase, chymopapaine, O glycoprotéase. La classe I est totalement ou partiellement sensible à la neuraminidase et aussi sensible aux glycoprotéases, la classe II est sensible uniquement aux glycoprotéases et la classe III est insensible aux 3 enzymes.

Fonctions

Les rôles du CD34 ne sont pas clairement élucidés, mais on pense que c'est un marqueur impliqué dans l'adhésion cellulaire et la différenciation hématopoïétique.

Adhésion

CD34 serait impliqué dans l'adhésion des CSH au stroma médullaire. En effet, comme le sont classiquement les molécules d'adhésion, le CD34 est une sialomucine de surface fortement glycosylée. De plus, les cellules CD34 injectées en intra veineux sont capables de se domicilier dans la niche hématopoïétique.

On pense, que les différents niveaux de glycosylation de la molécule CD34 influencent la localisation des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques.

Différenciation hématopoïétique

CD34 serait également impliqué dans la différenciation hématopoïétique, en maintenant les cellules dans un stade d'immaturité. En effet, on observe dans les cellules leucémiques de souris, que l'on veut différencier par l'IL6 ou le leukemic inhibitory factor, une diminution de l'ARNm de CD34, suivie d'une différenciation morphologique des blastes en cellules matures. La forme complète de CD34 est associée à un blocage au stade immature, alors que la forme tronquée de CD34 n'inhibe pas la différenciation(50).

Des expériences de Knock-out de CD34 chez la souris montrent des valeurs périphériques de cellules sanguines normales, avec cependant une baisse des CFU, ce qui suggère un moindre nombre de progéniteurs hématopoïétiques(49).

Applications cliniques du CD34

Diagnostic et sous classification des leucémies :

Environ 40% des leucémies aiguës myéloïdes expriment le CD34. Notamment toutes les LAM avec translocation t(8;21) expriment le CD34. Cependant, le CD34 est à la fois retrouvé dans des leucémies de bon et de mauvais pronostic, ainsi il ne peut être considéré comme un facteur pronostique indépendant.

Utilisation du CD34 pour quantifier les progéniteurs hématopoïétique et les CSH :

L'utilisation d'anticorps anti CD34 en cytométrie en flux a permis de réaliser des contrôles qualités sur les greffons. On peut, notamment, contrôler la persistance de CD34 après les manipulations sur le greffon.

Evaluation CD34+ en cytométrie

La méthode d'évaluation des CD34 en cytométrie fait l'objet d'un consensus international : la méthode de l'« International Society of Hematotherapy and Graft Engineering » (ISHAGE) (51) consistant en des fenêtrages successifs (cf annexe 2). L'évaluation des CD34+ est toujours réalisée en faisant un comarquage CD34 et CD45 pour cibler les leucocytes. On utilise un anticorps anti-pan leucocytaire CD45, qui doit reconnaître toutes les isoformes de CD45. De plus, on réalise un marquage 7-amino-actinomycine d (7aad), qui pénétrera uniquement dans les cellules mortes, ainsi on ne comptabilisera que les cellules 7aad- correspondant aux cellules vivantes.

Il faut utiliser des anticorps anti CD34 de classe III, car ils reconnaissent les épitopes résistants aux 3 enzymes, ainsi la reconnaissance a lieu quelque soit l'état de glycosylation de la molécule CD34

En double plateforme

C'est la méthode historique de quantification du nombre de CD34 en 2 étapes. En premier, on quantifie le nombre de cellules nucléées totales avec un appareil à hémogramme, puis on quantifie parmi les cellules nucléées totales le pourcentage de CD34+CD45+ viables en cytométrie. Le résultat final de CD34+ est obtenu en rapportant le pourcentage de CD34+CD45+ viables au nombre de CNT.

Nombre de CD34+= CNT X % CD34+CD45+7aad-

Cette méthode en 2 temps présente 2 inconvénients :

-Elle cumule les risques d'incertitude de 2 techniques successives.

-Elle établie la quantité de CD34+ en appliquant le pourcentage de cellules CD34+ donné sur les CNT qui comprennent à la fois les leucocytes et également les érythroblastes.

En simple plateforme

En simple plateforme, on quantifie directement le nombre absolu de cellules CD34+ sur le cytomètre en flux. On utilise un tube contenant un nombre connu de billes, dans lequel le marquage des CD34 est effectué. Le cytomètre fait un rapport entre le nombre de billes comptées et le nombre d'événements CD34+ comptés et donne ainsi directement un résultat en valeur absolue par la formule suivante :

Nombre événements CD34+ comptés	x	nombre de billes dans tubes	= CD34+/μL
Nombre de billes comptées		volume de échantillon	

Contenu en CD34+ des greffons

La médiane de CD34+ dans un greffon médullaire est de 2 à 3x10⁶/kg de receveur. La médiane de CD34+ dans un greffon de CSP est de 8x10⁶/kg de receveur.

II) La prise de la greffe

Après l'injection en périphérie les CSH vont s'installer dans la niche hématopoïétique, c'est le principe de la domiciliation ou homing.

A) La niche hématopoïétique

En 1978, Schofield décrit la niche hématopoïétique comme «un endroit spécifique qui permet de maintenir les capacités des CSH».

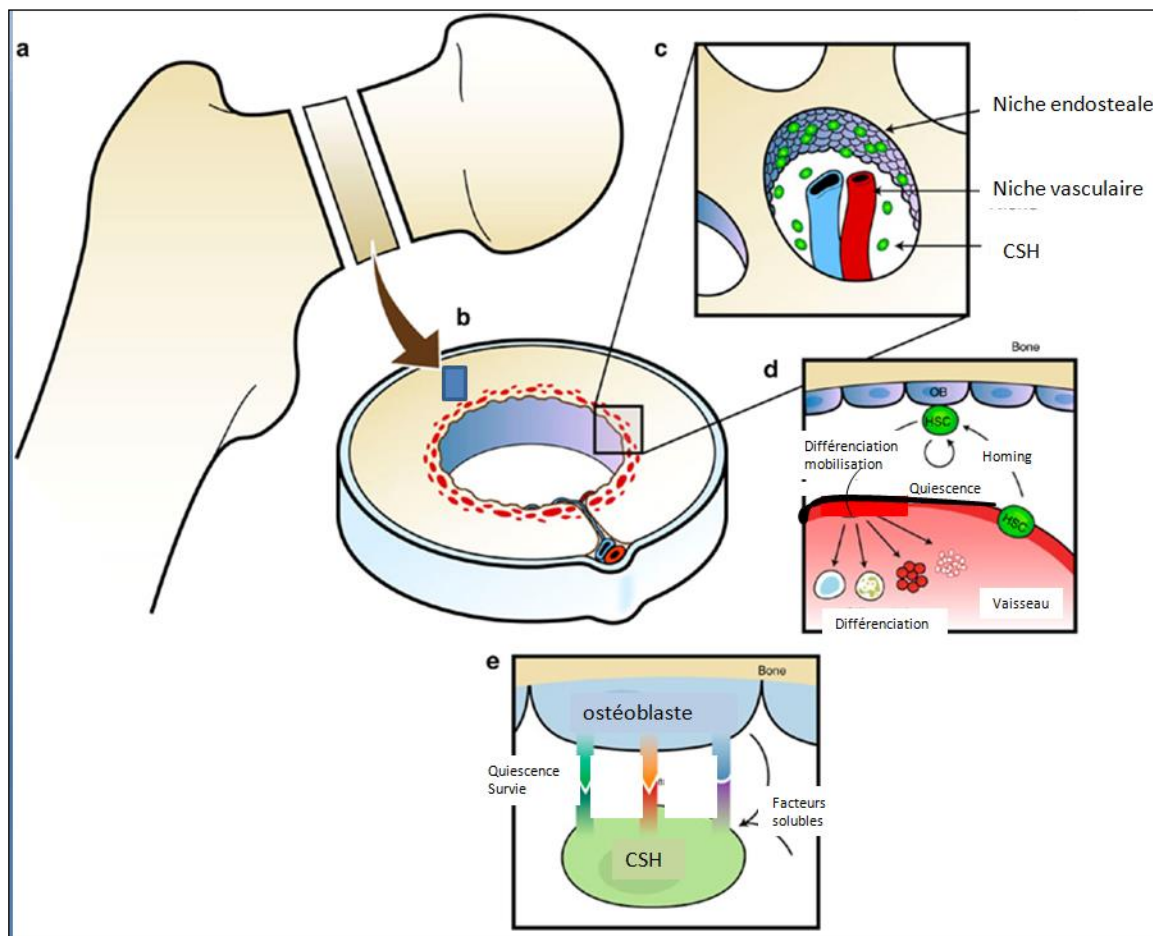


Figure 21 : Un modèle de la niche hématopoïétique dans les os long d'après Shiozawa Leukemia 2008(52)

a) os long

b) coupe transversale os long

c) les différentes niches : la niche endostéale ou niche ostéoblastique et la niche vasculaire

d) Les CSH peuvent se mobiliser et se différencier en progéniteurs hématopoïétiques, poursuivre leur différenciation en cellules sanguines matures puis passer dans les vaisseaux sanguins. Les CSH peuvent également rester quiescentes. Les CSH peuvent directement passer dans le sang sans étape de différenciation soit spontanément (moins de 1%) soit après mobilisation par facteur de croissance granulocytaire. Le homing correspond à la domiciliation des CSH dans la niche hématopoïétique.

e) Les ostéoblastes et les CSH communiquent *via* des facteurs solubles.

La niche hématopoïétique comporte les CSH et des cellules non hématopoïétiques : les ostéoblastes, les cellules souches mésenchymateuses, les cellules endothéliales...

Les propriétés de la niche hématopoïétique sont (53):

- d'avoir une structure asymétrique pouvant orienter vers la quiescence, la prolifération (division symétrique) ou la différenciation (division asymétrique)
- de permettre un ancrage physique des CSH via des ligands, des sélectines et des intégrines (VLA-4) situées sur les cellules stromales. Cet ancrage conduit au maintien des CSH en phase de quiescence G0.
- de générer des facteurs solubles extra-cellulaires régulateurs : CXCR4/SDF1, SCF...

SDF1 est produit par les cellules stromales médullaires et se fixe sur son récepteur CXCR4 situé sur les CSH. La présence de SDF1 sur CXCR4 induit une modification du cytosquelette des CSH via une signalisation impliquant JAK2. Cette modification du cytosquelette permet de maintenir l'ancrage des CSH dans la niche. SDF1 est chimiotactique pour les CSH via un gradient de concentration et c'est lui qui est responsable du phénomène de homing.

B) Les étapes de la reprise de l'hématopoïèse après la greffe

Après la greffe on observe 2 phases successives de reprise de l'hématopoïèse liées à la présence dans le greffon de précurseurs hématopoïétique à différents stades de maturation. Une première phase de récupération précoce correspondant à la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques déjà engagés dans la différenciation puis une seconde phase correspond à la différenciation des CSH multipotentes.

La sortie d'aplasie correspond à des CNT supérieures à 1G/L, à des neutrophiles supérieurs à 0.5G/L et des plaquettes supérieures à 20 G/L.

C) Les manipulations du greffon

C.1) Greffon médullaire

Après le prélèvement médullaire, on peut réaliser différentes manipulations sur le greffon telles que la réduction de volume, la désérythrocytation, la déplasmatisation, le tri CD34.

Réduction de volume

Afin d'avoir suffisamment de CSH, on prélève environ 20ml/kg de moelle chez le donneur. Ce volume est souvent trop conséquent pour être directement greffé chez le receveur. Une réduction de volume est réalisée par réalisation d'une centrifugation permettant l'obtention de 3 couches dont une couche leucocytaire appelée « buffy coat », une couche correspondant au plasma et une couche de globules rouges. Ensuite le surnageant est retiré.

Notion d'incompatibilité ABO

30 à 40% des greffes sont réalisées en situation d'incompatibilité ABO(54).

Incompatibilité majeure

L'incompatibilité majeure correspond à la présence chez le receveur d'anticorps naturels anti-A et/ou anti-B dirigés contre les hématies du donneur. Cette incompatibilité est retrouvée chez 10 à 15% des couples donneur-receveur HLA compatibles.

Elle a pour conséquence une augmentation des besoins transfusionnels après greffe et une reprise tardive de l'érythropoïèse chez les receveurs dont les titres d'anticorps sont élevés avant la greffe. Il a été observé des anticorps de type receveur jusqu'à 600 jours après la greffe. En cas de conditionnement d'intensité réduite il peut persister de façon prolongée des anticorps du receveur dirigés contre les progéniteurs érythroïdes ayant pour conséquence un retard de production des hématies de type donneur par rapport au conditionnement myéloablatif.

Actuellement, Pour éviter cette incompatibilité, on réalise une désérythrocytation du greffon avant la greffe(55).

Incompatibilité mineure

L'incompatibilité mineure correspond à la présence chez le donneur d'anticorps dirigés contre les antigènes A et/ou B des hématies du receveur. Elle peut être à l'origine d'une hémolyse immédiate par interaction des anticorps du donneur et des hématies du receveur.

Pour prévenir cette réaction une déplasmatisation du greffon est réalisée.

Incompatibilité complexe

L'incompatibilité complexe correspond à la situation où il y a incompatibilités majeure et mineure.

Collins et al (56)ont montré que la déplasmatisation ne conduit pas à une perte significative de CD34+ après la manipulation, alors que la désérythrocytation conduit à une perte significative médiane de 38% de CD34+ après manipulation ($p<0.01$).

Sélection CD34

Principe

On réalise sur le greffon médullaire un tri CD34 à l'aide d'une sélection immunomagnétique : des microbilles magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD34 fixent les cellules CD34+, puis la séparation des cellules est ensuite effectuée par passage dans un champ magnétique.

Intérêt

L'objectif est d'éliminer un maximum de lymphocyte T responsable de la GVH. Ce type de manipulation peut être indiquée en situation haplo-identique et quand l'indication d'allogreffe est une pathologie non maligne telle que les maladies métaboliques, les aplasies, les déficits immunitaires. En cas de pathologie maligne, le risque est de perdre les lymphocytes T responsables de l'effet GVL.

C.2) Greffon de CSP

Incompatibilité majeure

En cas de greffon de CSP, on ne réalise pas de désérythrocytation en raison du risque de perte cellulaire trop important. En cas d'incompatibilité majeure, les CSP sont prélevées avec un hémocrite la plus faible possible (idéalement <5%). Et si l'hémocrite est trop élevé, une hyperhydratation chez le receveur est réalisée au moment de la greffe.

Incompatibilité mineure

Il est décrit des cas d'hémolyses mortelles et précoces en cas d'incompatibilité mineure. L'hémolyse est alors liée à la synthèse par le greffon, plus précocement actif qu'un greffon médullaire, d'anticorps dirigés contre les antigènes du système ABO du receveur dont les hématies persistent encore. Ainsi en cas d'incompatibilité mineure on réalise une déplasmatisation.

D) Influence de la composition du greffon sur l'évolution clinique en autogreffe

Impact des cellules CD34+

L'impact de la dose de cellules CD34+ a d'abord été étudié dans les autogreffes de CSP.

Pour les autogreffes, après chimiothérapie myéloablatrice, plusieurs études ont montré une relation entre la dose de CD34 administrée et la sortie d'aplasie. Faucher et al (57), rapportent, dans une étude concernant 93 patients autogreffés, qu'une dose de CD34+ supérieure ou égale à $3 \times 10^6/\text{kg}$, permettait une récupération des granuleux et des plaquettes significativement plus précoce. Weaver et al (58), dans une étude portant sur 692 patients autogreffés atteints de pathologies malignes, concluent qu'un seuil minimal de CD34+ ne peut pas être défini mais qu'une dose supérieure à $5 \times 10^6/\text{kg}$ CD34 semble être optimale pour une récupération hématopoïétique rapide. Dans une étude portant sur 59 patients autogreffés atteints de divers cancers, Dercksen et al (59) ont montré qu'une dose de CD34+, supérieure à $6 \times 10^6/\text{kg}$, augmentait significativement la vitesse de récupération plaquettaire ($p < 0.001$), mais n'avait pas d'impact significatif sur la récupération des granuleux.

Récemment, Lanza et al (60) ont montré en étudiant 397 autogreffes en analyse multivariée, qu'une quantité de CD34+ supérieure ou égale à $4 \times 10^6/\text{kg}$ obtenue en une seule procédure d'aphérèse est associée à un meilleur devenir post greffe ($p = 0.001$). De plus, ils ont montré, également en analyse multivariée, que l'injection d'une quantité de CD34+ supérieure à $5 \times 10^6/\text{kg}$ est associée à un meilleur devenir post autogreffe ($p < 0.0001$), ceci n'était pas valable pour les autogreffes dans le cadre de leucémies aiguës. En effet, dans le cadre d'autogreffes pour leucémies aiguës en première rémission, en analyse multivariée, il a été montré qu'une quantité de CD34+ supérieure à $7.16 \times 10^6/\text{kg}$ entraîne plus de rechute et moins de survie sans leucémie (61).

Actuellement, la quantité de CD34+ recommandée à administrer, en cas d'autogreffe est de plus de $5 \times 10^6/\text{kg}$ et au minimum de 2×10^6 CD34/kg (62,63).

E) Influence de la composition du greffon sur l'évolution clinique en allogreffe, à l'exception des sangs placentaires

E.1) Impact des CNT

Greffon de CSP

Les greffons de CSP, de part leur méthode d'obtention par aphérèse après mobilisation par GCSF, sont actuellement toujours évalués en CD34+ et non en CNT.

Greffon médullaire

En 1977, Storb note pour la première fois, qu'il faut au moins 3×10^8 CNT/kg pour assurer la prise de la greffe dans les cas de greffe pour aplasie (64). Sierra et al(65), dans une étude portant sur 174 greffes de moelle, relèvent un lien significatif entre une quantité de CNT supérieure à 3.65×10^8 /kg et une sortie d'aplasie plus précoce et une moindre incidence de GVHa sévère.

Dominietto et al(66), rapportent 905 allogreffes de moelle en 2002. La dose médiane de CNT injectée est de 3.4×10^8 /kg. Ils montrent qu'une augmentation de la quantité de CNT dans le greffon est associée, en analyse multivariée, à moins de TRM.

Pour l'EBMT, la dose cible de CNT, en cas de greffon médullaire, doit être supérieure à 2×10^8 /kg de receveur(12).

E.2) Impact des CD34+

L'impact des CD34+ est difficile à évaluer, car il faut prendre en compte d'autres paramètres tels que le caractère apparenté ou non apparenté ainsi que la T déplétion.

Greffon de CSP

Situation de greffes apparentées

Mohty et al (67), rapportent 100 allogreffes apparentées de CSP pour leucémies aiguës et chroniques. Ils montrent qu'une augmentation de la dose de CD34+ est associée à une reconstitution plus rapide des neutrophiles et des plaquettes ($p=0.03$ et $p=0.007$ respectivement). Mais ils observent, en analyse multivariée, qu'une dose élevée de CD34+ conduit à plus de GVHc ($p=0.0093$). Pour les patients évaluable pour la GVHc, ils observent une meilleure survie sans rechute chez les patients ayant reçu moins de 8.3×10^6 /kg CD34+, ceci est lié au fait que les patients recevant plus de 8.3×10^6 /kg CD34+ présentent plus de mortalité liée à la GVHc. Finalement, ils concluent que l'effet bénéfique de l'augmentation de la dose de CD34+ sur la reconstitution hématopoïétique était contrebalancé par le risque d'augmentation de GVHc.

Afin d'estimer l'impact réel en allogreffe apparentée des cellules progénitrices hématopoïétiques, en s'affranchissant de l'impact des lymphocytes T, une équipe (68) a étudié l'impact de la dose de CD34+ en condition T déplétée *via* une sélection CD34+. En analyse multivariée, une dose de CD34+ comprise entre $1 \times 10^6/\text{kg}$ et $3 \times 10^6/\text{kg}$ par rapport à une dose supérieure à $3 \times 10^6/\text{kg}$ conduisait à une meilleure survie ($p=0.0008$)

En situation non apparentées

Collins et al(56), dans une étude portant sur 181 allogreffes non apparentées de CSP, ont montré en analyse multivariée que la survie à un an, était meilleure lorsque le greffon contenait plus de $5.41 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+. En revanche, en étude multivariée, une dose de CD34+ supérieure à $5.41 \times 10^6/\text{kg}$ n'influait pas la survenue de GVHa, de GVHc ni la sortie d'aplasie.

L'EBMT recommande une dose cible de CD34+/kg de 5 à 10×10^6 en cas de greffon de type CSP(12).

Greffon médullaire

Situation de greffes apparentées

-Mavroudis et al(69), dans une étude portant sur 28 allogreffes avec greffons médullaires apparentés T dépletés, notent qu'une dose de CD34+ supérieure à $1 \times 10^6/\text{kg}$ conduit, significativement à moins de TRM ($p=0.003$) et plus de survie globale($p=0.005$). Ils montrent également, que la restauration monocyttaire est, significativement, plus rapide avec une dose de CD34+ supérieure à 2×10^6 CD34+/kg. Cette restauration monocyttaire, plus précoce, permettrait d'améliorer la présentation monocyttaire des antigènes d'agents infectieux aux lymphocytes et ainsi de réduire la mortalité d'origine infectieuse. La durée d'hospitalisation est significativement plus courte ($p=0.03$), en cas de dose de CD34+ supérieure à $2 \times 10^6/\text{kg}$ par rapport à moins de $1 \times 10^6/\text{kg}$.

- Moriariu-Zamfir et al(70), dans une étude concernant 50 allogreffes de moelles apparentées ont injecté une dose médiane de $3.12 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+. Ils observent, en analyse univariée, significativement moins de TRM ($p=0.009$), plus de survie globale à 2 ans ($p=0.0006$) et moins de mortalité liée aux infections ($p=0.01$) dans le groupe ayant reçu plus de $3.12 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+. En revanche, en analyse univariée, ils n'observent pas de différence concernant la sortie d'aplasie et la survenue de GVH.

-Bittencourt et al(71), dans une étude comportant 202 allogreffes de moelles apparentées, rapportaient une dose médiane de CD34+ injectées de $3.7 \times 10^6/\text{kg}$. Le groupe ayant reçu plus de $3 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+ a, en analyse multivariée, significativement, une sortie d'aplasie plus rapide, une survie globale à 5 ans meilleure, une moindre TRM à J180 et moins d'infection fongique. En revanche, ils ne relèvent pas de lien entre la dose de CD34+ injectée et la survenue de GVH ou la survenue d'infection bactérienne ou virale.

Situation de greffes non apparentées

-Collins et al(56), dans une étude concernant 94 allogreffes de moelles non apparentées, rapportent une dose médiane de 3.62×10^6 /kg CD34 infusées. Ils ne notent pas, en analyse multivariée, de lien entre la dose de CD34+ et la sortie d'aplasie, la survie globale et la survenue de GVH.

	Nombre de greffes	Dose de CD34+ testés	Sortie aplasie	OS, TRM	GVH	Infections
Mavroudis et al Blood 1996(69)	28 T déplétées apparentées	-<1.10 ⁶ CD34+/kg vs >1.10 ⁶ CD34+/kg -<2.10 ⁶ CD34+/kg vs >2.10 ⁶ CD34+/kg	NS Restauration monocyte plus rapide	-OS (p=0.005) +TRM (p=0.003)	NT	NT
Moriariu-Zamfir et al BMT 2001(70)	50 greffes apparentées	<3.12.10 ⁶ CD34+/kg vs >3.12.10 ⁶ CD34+/kg	NS	+OS à 2ans (p=0.0006) -TRM à J100 (p=0.009)	NT	-Mortalité liée aux infections (p=0.01)
Bittencourt et al Blood 2002(71)	212 greffes apparentées	<3.10 ⁶ CD34+/kg Vs >3.10 ⁶ CD34+/kg	Restauration PNN(p=0.04) Monocyte (p=0.02) Plaquettes(p=0.00008)	+OS à 5 ans (p=0.03) -TRM à 180j (p=0.006)	NS	NS pour survenue infection bactérienne, virale -infections fongiques(p=0.008)
Collins et al BBMT 2010(56)	94 greffes non apparentées	<3.6210 ⁶ CD34+/kg Vs >3.6210 ⁶ CD34+/kg	NS	OS : NS	NS	NT

Non testé, NT ; différence non significative, NS ; Survie Globale : OS

Tableau 3 : Etude de l'impact de la dose de CD34+ en allogreffe de moelle osseuse.

Objectifs de l'étude

Pour les autogreffes et les allogreffes de CSP, la quantité minimale à réinjecter de CNT, de CD34+ et de CFU-GM est bien codifiée. En revanche, actuellement, en allogreffe de moelle, en l'absence de consensus sur la dose optimale de CD34+ et en raison d'un consensus sur un seuil minimal de CNT ($2 \times 10^8/\text{kg}$ de receveur), la dose de greffon à réinjecter est prescrite uniquement en CNT sans tenir compte de la quantité de CD34+.

Or, on sait d'une part que les CD34+ reflètent plus précisément que les CNT la quantité de CSH. D'autre part, en cas de désérythrocytation, en raison de la procédure consistant en une séparation des leucocytes par gradient de densité, les cellules nucléées totales correspondent aux cellules mononucléées et ne contiennent plus de polynucléaires. Alors, qu'en absence de désérythrocytation les CNT comprennent toutes les cellules nucléées, y compris, les polynucléaires.

Ainsi, il semble plus rigoureux de recommander une quantité de CD34+ plutôt qu'une quantité de CNT.

Afin de déterminer, en allogreffe de moelle, la dose optimale de CD34+ à réinjecter, nous étudions l'impact de la dose de CD34+ sur le devenir post greffe en terme de survie, de reconstitution hématopoïétique et de complications précoces (GVH, infections et pathologies de l'endothélium). Nous avons également étudié l'impact des autres composants du greffon (CNT, CFU-GM, CD3+), des manipulations sur le greffon et d'autres paramètres (caractéristiques du donneur, du receveur et du conditionnement).

Matériels et méthodes

I) Population étudiée

Nous avons étudié, rétrospectivement, tous les patients recevant une première allogreffe de moelle osseuse à l'Unité de Transplantation Médullaire Allogénique (UTMA) du CHU de Nancy entre 2006 et 2011.

Nous avons exclus de l'étude les patients ayant reçus un greffon congelé puis décongelé, avec sélection CD34+ ou issu d'un donneur syngénique. Les patients avec conditionnement séquentiel ou suivis dans une autre région ont également été exclus.

II) Choix du donneur

A) Compatibilité HLA

La compatibilité HLA est évaluée au niveau allélique pour les antigènes de classe I HLA-A, -B, -Cw et de classe II DRB1, DRB3, DRB4, DRB5, DQA, DQB, DPB. Une compatibilité 10/10 correspond à une identité donneur/receveur HLA-A,-B,-C, DR et DQ.

B) Choix du donneur

Lorsqu'un donneur HLA identique est disponible dans la fratrie, l'allogreffe est réalisée en situation géno-identique. En absence de donneur familiale compatible, on cherche un donneur sur le registre international des donneurs volontaires et l'allogreffe est en situation phéno-identique.

C) Choix du type de greffon : moelle versus CSP

Le choix s'est porté sur un greffon médullaire lorsque le receveur est un enfant. En cas d'indication de greffe pour une pathologie non maligne, telle que l'aplasie médullaire idiopathique ou un déficit immunitaire, on a également privilégié la moelle. Enfin, en cas de contre-indication à un prélèvement de CSP chez le donneur la source de CSH est alors médullaire.

II) Conditionnement, prévention de la GVH et traitements de support

A) Conditionnement

Le conditionnement de l'allogreffe est de type myéloablatif chez les patients jeunes (<45 ans), sans comorbidités et sans lourds antécédents de chimiothérapie. Pour les autres, le conditionnement est d'intensité réduite. Le type de conditionnement varie selon le diagnostic.

B) Prophylaxie de la GVH

La prophylaxie de la GVH est réalisée par ciclosporine (3mg/kg jour en intra veineuse continue puis adaptation aux taux sériques) et flagyl, avec ajout de méthotrexate (15mg/m² à j1 puis 10mg/m² à j3, j6 et j11) en cas de conditionnement myéloablatif ou de mycophénolate mofétil en cas de RIC. En cas de donneur non apparenté ou de donneur apparenté et de conditionnement myéloablatif, on ajoute du sérum anti lymphocytaire (SAL) de lapin avant la greffe.

C) Les prophylaxies anti-infectieuses

L'allogreffe est réalisée en milieu protégé, avec traitement de l'air par flux laminaire. Une décontamination digestive, non absorbable est réalisée par une association glycopeptide et aminoside et amphotericine B. L'alimentation est stérile, à partir du début du conditionnement et jusqu'à la sortie d'aplasie.

La prévention de la pneumocystose est réalisée par bactrim un jour sur 2 jusqu'à j360. La prévention de la toxoplasmose est assurée par bactrim puis par fansidar-osfolate, à la reprise alimentaire. La prévention du pneumocoque est assurée par du zinnat. La prévention anti herpes virus consiste en l'injection de zovirax, puis relais par zelitrex à la reprise alimentaire. La prévention anti fongique est réalisée par fluconazole, puis par itraconazole à la reprise alimentaire.

Une surveillance bi hebdomadaire des « polymerase chaine reaction » (PCR) sanguines Epstein Barr Virus (EBV), CMV, Adénovirus et Human Herpes Virus 6 (HHV6) est réalisée. En cas de positivité des PCR, un traitement pré-emptif est mis en place.

III) Recueil du greffon, manipulation du greffon et contrôle qualité

A) Prélèvement médullaire au bloc opératoire

Le volume prélevé de moelle est fonction du poids du receveur et du donneur et entre 10 et 20ml/kg de donneur de moelle. L'objectif est d'obtenir plus de 3x10⁸ CNT/kg de receveur.

B) Manipulation sur le greffon

A réception du greffon médullaire des contrôles qualités sont réalisés : numération des CNT, des CD34+, microbiologie. (cf annexe 3 logigramme procédés moelle)

B.1 Réduction de volume

Le volume du greffon est réduit après filtration de la moelle. Après centrifugation à 3000 tours/minute pendant 6 minutes, le surnageant est retiré et l'anneau de leucocytes récupéré. Cet anneau de leucocytes est appelé *buffy coat*. Puis, on recueille un volume de globules rouges afin d'obtenir un hématocrite final à 20% pour une poche de 450ml. Selon le volume de moelle initial, on réalise successivement 1 à 3 manipulations couplant centrifugation puis recueil du *buffy coat*.

B.2 Déplasmatisation

Après filtration, le greffon est centrifugé à 1300 tours/minute pendant 15 minutes à 15°C, puis le surnageant est retiré, le *buffy coat* est récupéré et homogénéisé.

Après la déplasmatisation, on s'assure de la disparition des anticorps anti-A et/ou anti-B.

B.3 Désérythrocytation

L'objectif est d'obtenir une réduction de 90% des globules rouges.

Si le volume de globule rouge présent dans le greffon est supérieur à 90 ml, on réalise un *buffy coat* permettant d'éliminer une partie des globules rouges, puis on réalise une séparation de cellules mononucléées par gradient de densité.

Si le volume de globules rouges présents dans le greffon est inférieur à 90 ml, on réalise directement une séparation de cellules mononucléées par gradient de densité.

C) Contrôle qualité

Après réalisation de la manipulation du greffon (désérythrocytation ou déplasmatisation ou réduction de volume), des contrôles qualités sont réalisés sur le greffon avant réinjection : une numération des CNT, une quantification des CD34+, des CFU-GM, des CD3 et un contrôle microbiologique.

C.1 Quantification des CNT

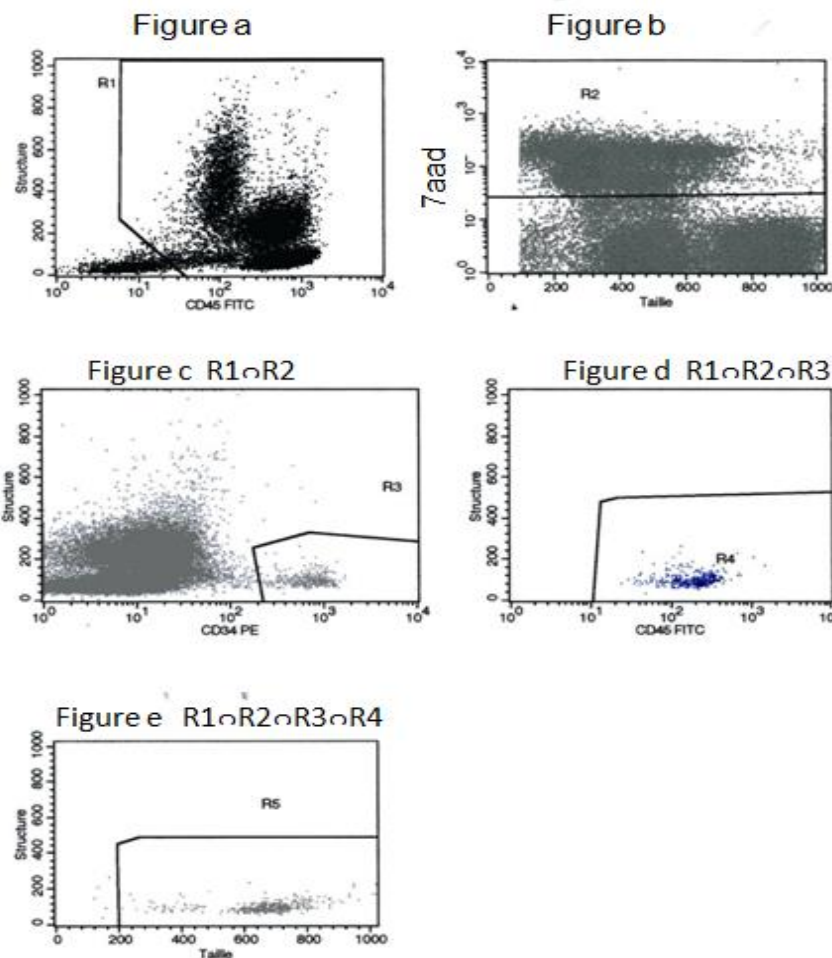
La quantification des CNT est faite sur un appareil hématimètre advia.

C.2 Quantification des CD34+

L'évaluation du nombre de CD34+ est réalisée en double plateforme.

On réalise l'immunomarquage avec 3 tubes de marquage : 2 tubes identiques, nommé tube 1 et 2, avec anticorps anti CD34/antiCD45 et 7aad, un tube dit tube contrôle isotype, nommé tube 3, avec anticorps anti CD45/IgG1PE et 7aad. L'anticorps anti CD34 est marqué à la phycoérythrine (anti CD34 PE), anticorps anti -HPCA2 clone 8g12 référence 345802 de BECTON DICKINSON. L'anticorps anti CD45 est marqué à l'isothiocyanate de fluorescéine (anti-CD45 FITC), clone J33 référence A07782 de BECTON DICKINSON. Le 7aad est commandé sous la référence 555815 à BECTON DICKINSON. Le contrôle isotypique de souris IgG1 est marqué à la phycoérythrine (IgG1 PE), référence 345816 de BECTON DICKINSON. Les anticorps sont incubés pendant 15 minutes, à température ambiante, à l'abri de la lumière. Puis on réalise une lyse érythrocytaire avec le réactif de lyse BD Pharm lyse 10x de BECTON DICKINSON.

On procède ensuite à l'acquisition des événements sur le cytomètre FACS CALIBUR de BECTON DICKINSON. L'analyse est réalisée avec l'aide du logiciel Cell Quest (figure 22).



CD45+

Sample ID: UTCT Patient ID:
 Tube: CD45/CD34 Acquisition Date:
 Gate: No Gate Gated Events: 1
 Total Events: 80209

Region	Events	% Gated	% Total
R1	73221	91.29	91.29
R2	48227	60.13	60.13
R3	1597	1.99	1.99
R4	71519	89.17	89.17
R5	68830	85.81	85.81
R6	48949	61.03	61.03
R7	45452	56.67	56.67

VIABILITE TOTALE

Sample ID: UTCT Patient ID:
 Tube: CD45/CD34 Acquisition Date:
 Gate: G1 Gated Events: 7
 Total Events: 80209

Region	Events	% Gated	% Total
R1	73221	100.00	91.29
R2	41896	57.22	52.23
R3	1584	2.16	1.97
R4	69754	95.27	86.97
R5	67313	91.93	83.92
R6	42556	58.12	53.06
R7	45452	62.08	56.67

CD34+ VIABLES

Sample ID: UTCT Patient ID:
 Tube: CD45/CD34 Acquisition Date: 0
 Gate: G5 Gated Events: 349
 Total Events: 80209

Region	Events	% Gated	% Total
R1	349	100.00	0.44
R2	349	100.00	0.44
R3	349	100.00	0.44
R4	349	100.00	0.44
R5	349	98.57	0.43
R6	349	100.00	0.44
R7	79	22.64	0.10

VIABILITE DES CD 34 EN %

Sample ID: UTCT Patient ID:
 Tube: CD45/CD34 Acquisition Date: 01
 Gate: G7 Gated Events: 1584
 Total Events: 80209

Region	Events	% Gated	% Total
R1	1584	100.00	1.97
R2	349	22.03	0.44
R3	1584	100.00	1.97
R4	1584	100.00	1.97
R5	1522	96.09	1.90
R6	363	22.92	0.45
R7	100	6.31	0.12

Figure 22 : Quantification des CD34+ : analyse en cytométrie

Figure a : Représentation bi paramétrique CD45FITC (LOG)/structure(LIN) : on réalise une fenêtre R1 ciblant les leucocytes, permettant d'éliminer les globules rouges et les plaquettes.

Figure b : Représentation bi paramétrique taille (LIN)/7aad (LOG) conditionnée sur R1 : on réalise une fenêtre R2 correspondant aux cellules leucocytaires viables.

Figure c : Représentation bi paramétrique CD34PE (LOG)/structure (LIN) conditionnée sur R1∩R2 : réalisation de la fenêtre R3 ciblant les événements CD34+ de faible granularité.

Figure d : Représentation bi paramétrique CD45FITC (LOG)/structure (LIN) conditionnée sur R1 ∩R2 ∩R3 : réalisation de la fenêtre R4 ciblant les événements CD45+ « faible » (les cellules CD34+ exprimant faiblement le CD45).

Figure e : Représentation bi paramétrique taille (LIN) / structure(LIN) conditionnée sur la fenêtre R1∩R2∩R3∩R4 : analyse des événements dans la fenêtre R5 ce qui correspond aux événements CD34+ viables.

Le pourcentage de cellules CD34+ viables est donné selon le calcul suivant :

$$\frac{\text{Moyenne du nombre d'événements CD34+ dans tubes 1 et 2 dans R5} - \text{nombre d'événements du tube 3 dans R5}}{\text{Moyenne du nombre d'événements CD45+ des tubes 1 et 2 dans R1}} \times 100 = \% \text{ CD 34 viables}$$

Finalement, on obtient le nombre de CD34 viables, en multipliant le nombre de CNT par le pourcentage de CD34.

C.3 Quantification des colonies formant unité –granulocyte-macrophage, CFU-GM

La quantification des colonies formant unité –granulocyte-macrophage (CFU-GM) permet d'apprécier la quantité de progéniteurs clonogéniques hématopoïétiques présente dans le greffon. Elle permet, également, de calculer une clonogénécité, correspondant à la capacité des cellules CD34+ présentent dans le greffon à donner des CFU-GM.

D'abord, on isole les cellules monocléées par un gradient de densité. Puis, on met en culture les cellules obtenues dans un milieu de culture de méthylcellulose avec cytokines (H84535 Methocult™ de Stem cell technology), à la concentration de 2×10^4 cellules par millilitre et par boîte.

Après 14 jours de culture à 37°C et 5% de CO₂, on lit le nombre et le type de colonies. Les CFU-GM correspondent aux colonies de plus de 20 granulocytes ou macrophages.

Le nombre de CFU/kg est obtenu selon l'équation suivante :

$$\frac{\text{Nombre de colonies/boîte} \times \text{nombre de cellules monocléées /kg dans le produit}}{\text{Nombre de cellules mononucléées ensemencées}}$$

C.4 Contrôle disparition des anticorps anti-A et/ou anti-B

En cas d'incompatibilité mineure, après la déplasmatisation, on s'assure de la disparition des anticorps anti-A et/ou anti-B. Ce contrôle est réalisé à l'Etablissement français du sang (EFS). Le résultat est disponible à posteriori ainsi, c'est un contrôle qualité du procédé et il n'y a pas de seuil à obtenir pour autoriser la greffe.

IV) Réinjection du greffon

La réinjection du greffon est faite *via* le cathéter veineux central posé chez le malade avant le conditionnement.

En cas d'incompatibilité ABO majeure on réalise une hydratation avec 1l/1.73 m² de NaCl 0.9% durant la greffe, suivi de diurétiques en fonction de la tolérance. Une surveillance hémodynamique est assurée pendant la transfusion.

V) Définition des points clefs post greffe

A) Reconstitution hématopoïétique

La reconstitution des globules blancs (GB) est définie par le premier des 3 premiers jours consécutifs où les PNN sont supérieurs à 0.5 G/L, au cours des 60 premiers jours après la greffe.

La reconstitution des polynucléaires neutrophiles (PNN) est définie par le premier des 3 premiers jours consécutifs où les PNN sont supérieurs à 0.5 G/L, au cours des 60 premiers jours après la greffe.

La reconstitution des plaquettes est définie par le premier des 3 premiers jours où spontanément les plaquettes sont supérieures à 20 G/L ou à 50G/L au cours des 180 premiers jours après la greffe.

B) Infections

Le traitement, en cas d'hyperthermie non documentée, fait appel à une bi antibiothérapie à large spectre, active sur le pyocyanique et active sur les bactéries cocci gram plus meticilline résistantes. Les infections bactériennes sévères correspondent aux bactériémies.

Pour les virus CMV, EBV, adénovirus et HHV6, il s'agit d'infection, en cas de PCR sanguine positive et de maladie, en cas de présence de signes cliniques.

Les infections fongiques invasives correspondent aux candidémies, aux infections disséminées à candida (cf annexe), aux aspergilloses prouvées et probables (cf annexes).

C) GVHa

Elle est classée en grade I, II, III ou IV selon le score de Glucksberg(17). Les patients ayant présenté un rejet précoce avant j30 ou décédés avant j30 ne sont pas évaluable pour la GVHa.

D) GVHc

La GVHc est évaluable, seulement, chez les patients ayant survécus plus de 100 jours après la greffe. Elle est classée en GVH limitée ou extensive selon Shulman(22). Les patients ayant présenté un rejet ou décédés avant j100 ne sont pas évaluable pour la GVHc.

E) MVO, MAT, syndrome de fuite capillaire et syndrome de prise de greffe.

Les patients ayant présenté un rejet précoce avant j30 ou décédés avant j30 ne sont pas évaluable pour la MVO, la MAT, le syndrome de fuite capillaire et la prise de greffe.

F) La survie

Elle est calculée de la date de greffe jusqu'à la mort quelque soit la cause.

G) La mortalité liée à la greffe, TRM

Elle correspond au décès lié à la greffe en excluant les décès liés à la rechute.

VI) L'analyse statistique

Les seuils de CNT, de CD34+, de CFU-GM et de CD3+ testés sont la médiane, Q1 correspondant à la quantité de cellules du 1^{er} quartile et Q3 correspondant au 3^{ème} quartile.

Nous n'avons pas étudié la GVHa, la MAT, la MVO et le syndrome de prise de greffe chez les patients décédés avant J30 ou ayant rejeté précocement leur greffon. Nous n'avons pas étudié la GVHc chez les patients décédés avant J 100.

Les caractéristiques des receveurs étudiés sont l'âge, l'indication de la greffe pour pathologie maligne ou non et le sexe.

Les caractéristiques des donneurs étudiées sont l'âge, le sexe, le caractère apparenté ou non et la compatibilité HLA.

Pour l'analyse des liens entre les différents types cellulaires nous avons utilisé le coefficient de corrélation de Pearson, avec probabilité $> |r|$ sous $H_0: \rho=0$

Pour les variables qualitatives nous avons utilisé un test du Chi-2 et pour les variables quantitatives un test issu d'un test de Student.

Les courbes de survie globale et sans maladie sont obtenues par une estimation de Kaplan Meier.

Pour l'analyse des facteurs de risque de survenue de la rechute, des infections bactériennes, virales, fongiques, de la sortie d'aplasie, de GVH, de MVO, les variables prises en compte sont : l'âge et le sexe du donneur et du receveur, le caractère malin ou non de la pathologie, le type de conditionnement, la présence de

SAL dans le conditionnement, le caractère géno ou phéno-identique, la concordance HLA(10/10 ou 9/10), la dose de CNT, de CD34, de CD3 et de CFU-GM.

Pour l'analyse multivariée : seuls les facteurs présentant une association significative au seuil 0.2 en modèle bivarié ont été candidat dans le modèle multivarié. La méthode de sélection des variables Stepwise a été utilisée avec un seuil d'entrée dans le modèle à 0.20 et un seuil de sortie du modèle à 0.10. Par conséquent, les variables qui n'apparaissent pas dans le modèle multivarié ne répondent pas à ces critères de sélection. Les variables quantitatives n'ont pas de modalité de référence. L'odds ratio(OR) exprime la variation de risque pour une augmentation de 1 unité de la variable.

Les comparaisons des rendements entre les manipulations sont obtenues par procédure Anova.

Résultats

I) Description de la population

118 patients ont été allogreffés avec de la moelle entre 2006 et 2011 dans l'Unité de Transplantation Médullaire Allogénique (UTMA) du CHU de Nancy.

Cent quatre patients ont été inclus et 14 patients ont été exclus. Parmi les patients exclus, 2 correspondaient à une seconde greffe, 3 à un greffon congelé puis décongelé, 2 à un greffon sélectionné CD34+, 1 a été allogreffé en syngénique, 2 avaient reçu un conditionnement séquentiel et enfin 2 patients sont suivis dans d'autres régions. Un patient a été exclu car ayant reçu une greffe dans le cadre d'une indication particulière pour un déficit en adénosine désaminase et n'a donc pas reçu de conditionnement. Enfin un patient a été exclu car regreffé avec des CSP à j7 de sa greffe de moelle osseuse en raison de la pauvreté du greffon ($0,28 \times 10^8$ CNT/kg). (Tableau 4).

Caractéristiques	médiane (range)/n(%)
Patient	
Age (année)	27 ans (0 ans-64 ans)
Poids	61 kg (4.8-103)
Femme	45/104(43%)
Sérologie CMV	37/104(35.6%)
Diagnostic	
Leucémies aiguës lymphoïde	27(37.5%)
Leucémies aiguës myéloïde	39(26%)
Pathologies malignes	86(82.7%)
Donneur	
Age	30 ans (2 ans-68 ans)
Femme	48/104(46%)
Compatibilité HLA 10/10	89/104(86%)
Apparenté	50/104(48%)
ABO compatible	47/104(45%)
ABO incompatibilité majeure	25/104(24%)
ABO incompatibilité majeure et mineure	6/104(6%)
ABO incompatibilité mineure	26/104(25%)
Transplantation	
Prophylaxie de la GVH	
Ciclosporine seule	7/104(7%)
Ciclosporine + méthotrexate	65/104(62%)
Ciclosporine + mycophénolate mofétil	30/104(29%)
Ciclosporine + corticoïde	1/104(1%)
Ciclosporine + méthotrexate + alemtuzumab	1/104(1%)
SAL	74/104(71%)
SAL (<40mg/kg)	48/74 (65%)
Conditionnements	
Myéloablatif	67/104(64%)
Intensité réduite	37/104(36%)

Tableau 4 : Caractéristiques de la population incluse.

La durée médiane de suivi était de 23.5 mois (0.5 mois-79.8 mois).

Dans notre étude la médiane d'âge des patients était de 27 ans (0 ans-64 ans) avec en majorité des hommes (57%).

Les indications de greffe étaient très majoritairement une pathologie maligne (86%) avec le plus souvent des pathologies de type leucémies aiguës (63.5%) (Figure 23).

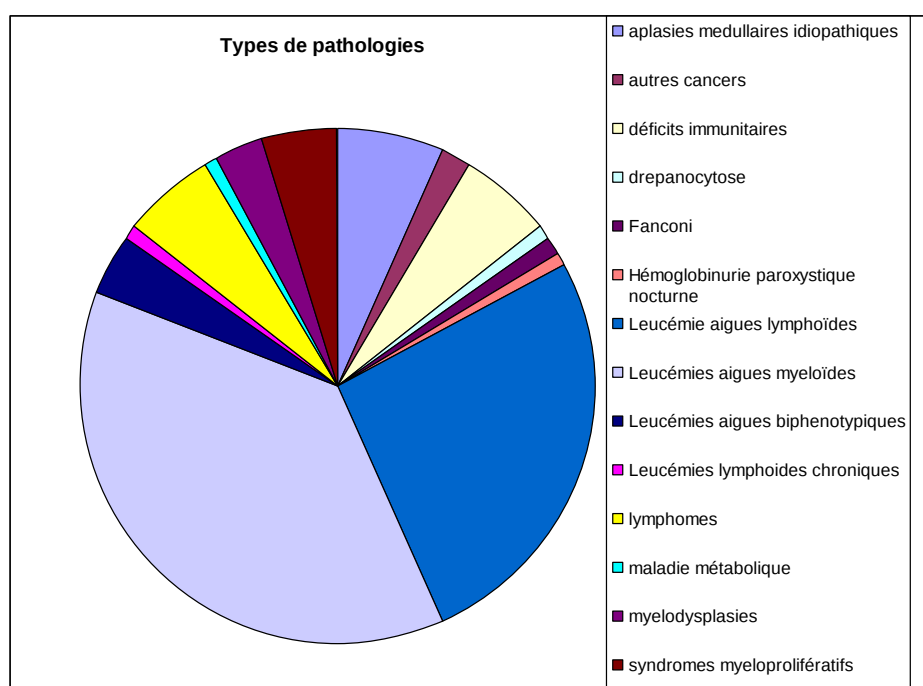


Figure 23 : Types de pathologies.

La médiane d'âge des donneurs était de 30 ans (2 ans-68 ans) et il s'agissait majoritairement d'hommes (54%). La compatibilité HLA était le plus souvent 10/10 (86%). La majorité des greffons était issue de donneurs non apparentés (52%).

Cinquante-cinq pour cent des greffes étaient réalisées en situation ABO incompatible avec 24% d'incompatibilité majeure, 6% d'incompatibilité majeure et mineure et 25% d'incompatibilité mineure (figure24).

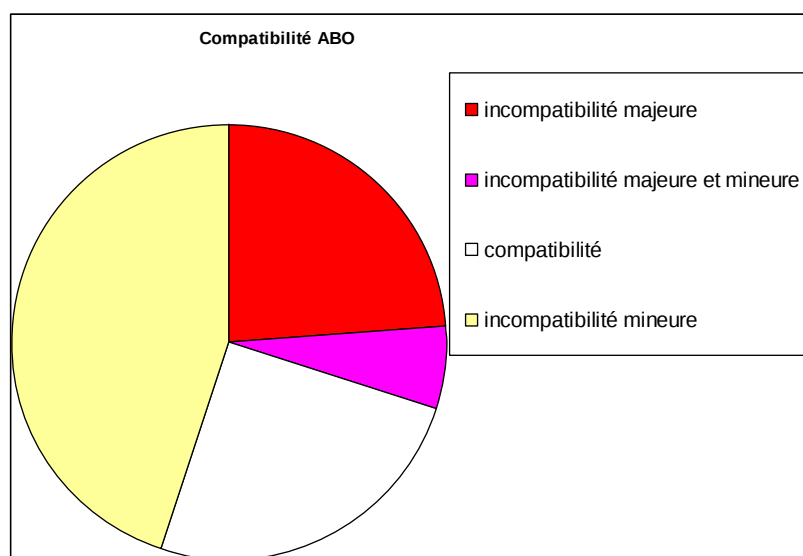


Figure 24 : Compatibilité ABO.

La prophylaxie de la GVH était toujours à base de ciclosporine seule ou additionnée le plus souvent de méthotrexate (62%) ou de mycophénolate mofétil (29%).

Le conditionnement était de type myéloablatif (MAC) le plus souvent (64%), avec une association de busulfan intra veineux et de cyclophosphamide pour 32 patients ou une association irradiation corporelle totale et de cyclophosphamide pour 28 patients. Les conditionnements d'intensité réduite (RIC) concernaient 36% des patients et étaient, le plus souvent, de type fludarabine et melphalan (18 patients) ou fludarabine et busulfan intra veineux (9 patients) (figure 25).

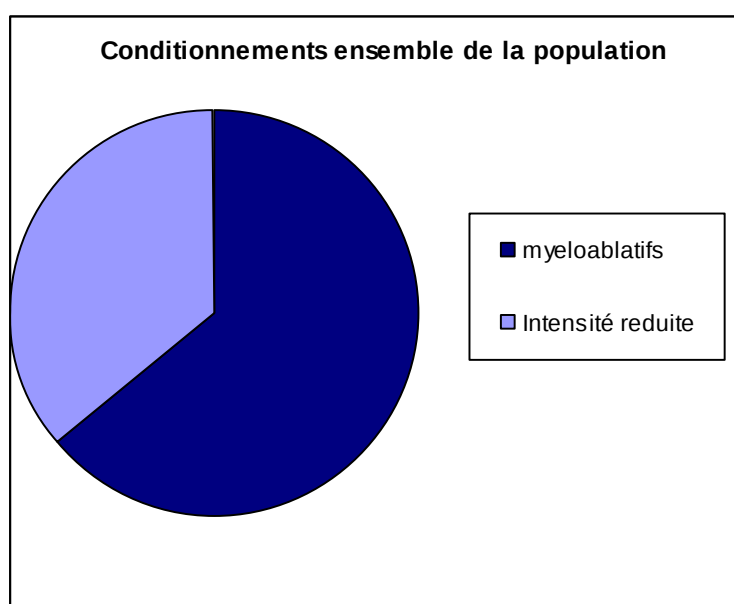


Figure 25 : Type de conditionnement

II) Description du greffon

A) Composition

La médiane de la composition du greffon était en CNT/kg de $2,12 \times 10^8$ (0,53-10.3), en CD34+/kg de $2,72 \times 10^6$ (0.99-16.92), en CD3+/kg de $2,54 \times 10^7$ (1.09-9.61) et en CFU-GM/kg de 53.4×10^4 (1.24-260).

B) Impact des caractéristiques pré-greffe sur la composition du greffon

Nous avons observé l'impact de l'âge du donneur, du sexe du donneur et du type de manipulation sur les quantités de CNT, de CD34+, de CD3+ et de CFU-GM du greffon.

-sur les CNT

En analyse univariée, lorsque le donneur est jeune ou de sexe féminin ou lorsque le greffon a subi une réduction de volume ou une déplasmatisation, le greffon est significativement plus riche en CNT ($p=0.0344$, $p=0.0046$ et $p<0.0001$ respectivement). Il y a significativement des donneurs plus jeunes dans le groupe dose de CNT/kg supérieure à 3.015×10^8 ($p=0.0126$).

En analyse multivariée, les greffons ayant subi une réduction de volume ou une déplasmatisation ont un taux de CNT significativement supérieur aux greffons ayant subi une désérythrocytation ($p<0.0001$).

-sur les CD34+

En analyse univariée, plus le donneur est jeune plus le greffon est significativement riche en CD34+ ($p=0.0038$). Il y a significativement des donneurs plus jeunes dans le groupe dose de CD34+/kg supérieure à 2.7×10^6 et supérieure à 3.47×10^6 ($p=0.0255$ et $p=0.0005$ respectivement).

En analyse multivarié, aucun des facteurs testés n'influence significativement la quantité de cellules CD34+ dans le greffon.

-sur les CFU-GM

Aucun des facteurs testés n'a d'impact significatif sur la quantité de CFU-GM du greffon.

-sur les CD3+

Aucun des facteurs testés n'a d'impact significatif sur la quantité de CD3 du greffon.

En revanche il n'y a pas de différence significative pour l'âge des donneurs pour les différents groupes de dose de CFU-GM et CD3+.

	Age des donneurs
CNT $<1.265.10^8$ vs $>1.265.10^8/\text{kg}$ $<2.12.10^8$ vs $>2.12.10^8/\text{kg}$ $<3.015.10^8$ vs $>3.015.10^8/\text{kg}$	28.8 ans vs 29.6 ans p=0.7803 28.9 vs 29.8 ans p=0.7288 31.2 ans vs 23.9 ans p=0.0126
CD34+ $<1.93.10^6$ vs $>1.93.10^6/\text{kg}$ $<2.7.10^6$ vs $>2.7.10^6/\text{kg}$ $<3.47.10^6$ vs $>3.47.10^6/\text{kg}$	31.1 ans vs 28.8ans p=0.4419 32.3 ans vs 26.5 ans p=0.0255 31.8 ans vs 21.6 ans p=0.0005
CFU-GM $32.215.10^4$ vs $32.215.10^4/\text{kg}$ $53.45.10^4$ vs $53.45.10^4/\text{kg}$ $76.695.10^4$ vs $76.695.10^4/\text{kg}$	31.5 ans vs 28.7 ans p=0.3553 31.1 ans vs 27.7 ans p=0.1968 30.1 ans vs 27.2ans p=0.3165
CD3 $<2.015.10^7$ vs $>2.011510^7/\text{kg}$ $<2.53.10^7$ vs $>2.53.10^7/\text{kg}$ $<3.3.10^7$ vs $>3.3.10^7/\text{kg}$	26.5 ans vs 30.4 ans p=0.1947 30.9 ans vs 27.9 ans p=0.2359 30.6 ans vs 25.7 ans p=0.1079

Tableau 5 : Impact de l'âge du donneur sur la composition cellulaire.

C) Manipulations

Les manipulations sur les greffons étaient majoritairement des réductions de volume (n=42, soit 40%). Trente-deux pour cent (n=33) des greffons étaient désérythrocytés et 25% (n=26) déplasmatisés. Trois greffons n'ont subi aucune manipulation. (Figure 26).

Les indications de désérythrocytation étaient une incompatibilité majeure, une incompatibilité complexe et la présence d'un anticorps anti M.

Pour 31 soit 29.8% greffons, une partie a été congelée en vue d'éventuelle DLI. La dose médiane de CNT/kg congelée était de $0,09 \times 10^8$ (0,012-10,15) et la dose médiane de CD34/kg congelée était de $0,29 \times 10^6$ (0,017-20).

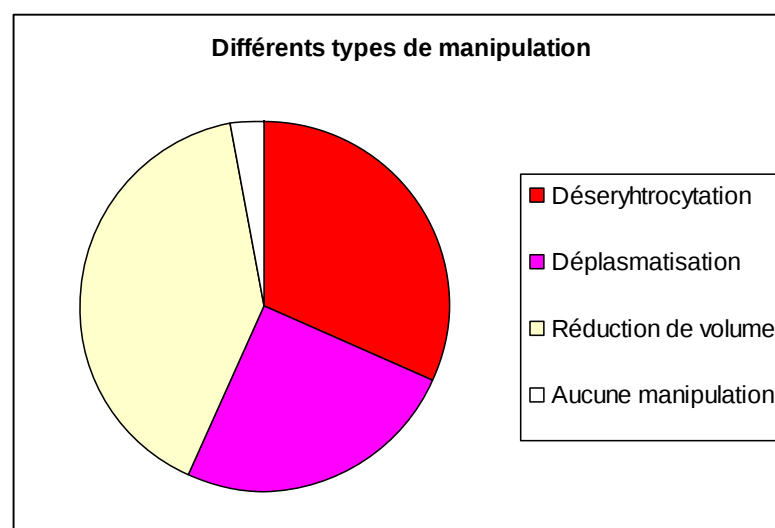


Figure 26 : Répartition des différents types de manipulation

Rendement des manipulations

	Moyennes avant manipulation+/-ET		Moyennes après manipulation+/-ET	
	CNT10 ⁸ /kg	CD34+10 ⁶ /kg	CNT10 ⁸ /kg	CD34+10 ⁶ /kg
Désérythrocytation n=33	3.5+/-1.1	3.8+/-1.5	1.1+/-0.4	2.6+/-1.1
Déplasmatisation n=26	4.4+/-2.2	4.8+/-2.3	3+/-0.9	3.2+/-2.5
Réduction de volume n=42	3.5+/-1.7	4+/-3.3	3.1+/-1.8	3.1+/-1.3
p	0.0961	0.2367	<0.0001	0.1632

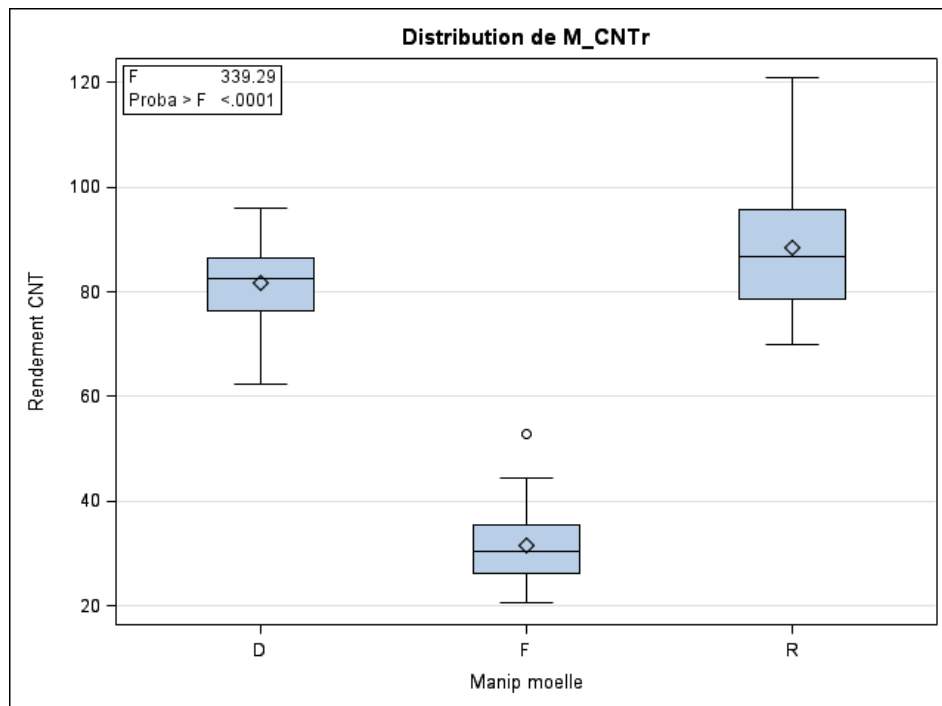
Tableau 6 : Moyenne des quantités de CNT et CD34+ avant manipulations et après manipulations.

Avant manipulation, il n'y a pas de différence significative en terme de quantité de CNT et de CD34+ entre les différentes manipulations.

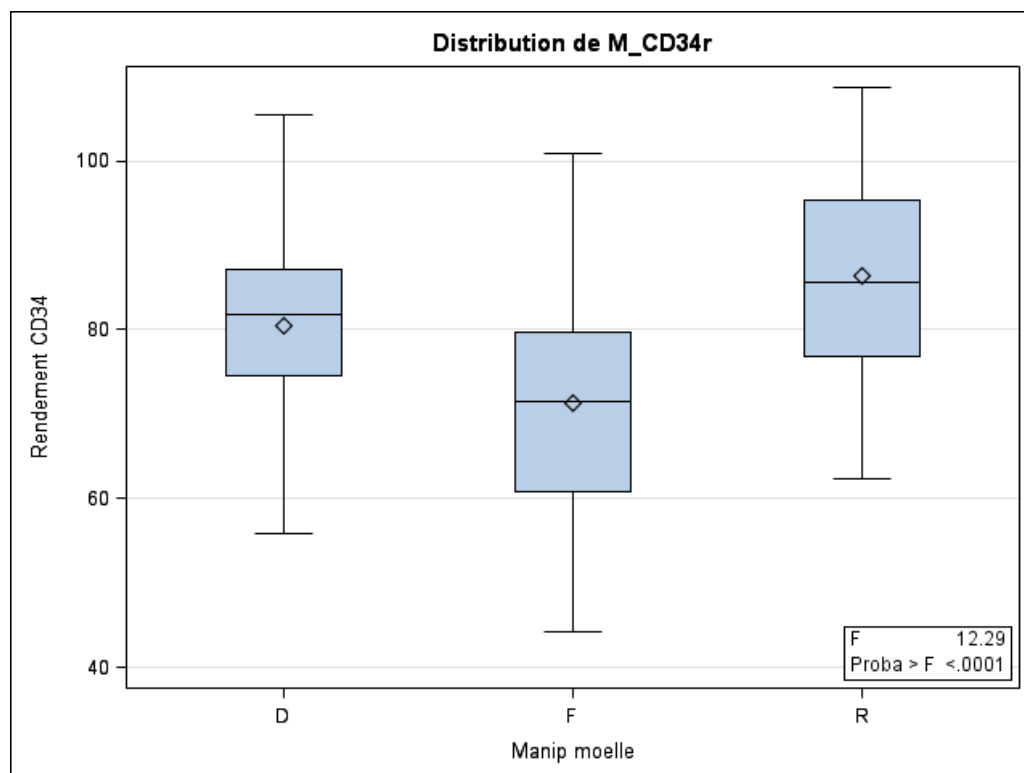
Après désérythrocytation, il y a significativement moins de CNT qu'après réduction de volume ou déplasmatisation ($p < 0.0001$). En revanche, pour les CD34+, le type de manipulation n'a pas d'impact significatif. (Tableau 6)

Les moyennes de rendement de CNT sont significativement différentes entre les 3 types de manipulation : 31.7% pour la désérythrocytation, 88.2% pour la réduction de volume et 81.8% pour la déplasmatisation ($p < 0.0001$). (Figure 27).

Les moyennes de rendement de CD34+ sont significativement différentes entre les 3 types de manipulation : 71.8% pour la désérythrocytation, 86.3% pour la réduction de volume et 80.5% pour la déplasmatisation ($p < 0.0001$). (Figure 28)



Déplamatisation, D ; Désérytrocytation, F, Réduction de volume, R
Figure 27 : Comparaison des moyennes de rendement de CNT en fonction des manipulations



Déplamatisation, D ; Désérytrocytation, F, Réduction de volume, R

Figure 28 : Comparaison des moyennes de rendement de CD34 en fonction des manipulations

D) Lien entre les différents types de cellules

Il existe un lien entre la quantité de CNT et de CD34 ($p < 0.0001$). De même il existe un lien entre la quantité de CNT et CD3 ($p < 0.0003$). En revanche, il n'y a pas de lien entre la quantité de CNT et de CFU-GM.

Il existe un lien entre la quantité de CD34 et la quantité de CFU-GM ($p = 0.0003$). De même il existe un lien entre la quantité de CD34 et la quantité de CD3 ($p < 0.0001$).

La moyenne initiale des CNT/kg est de 3.77×10^8 et la moyenne initiale des CD34+/kg est de 4.33×10^6 , ainsi les CD34+ initiales représentent environ 1.14% des CNT initiales.

II) Devenir de la population

A) Rejet

Deux patients (1.9%) ont présenté un rejet précoce de la greffe. Un patient (0.9%) a présenté un rejet tardif de la greffe.

B) Reconstitution hématopoïétique

B.1) Globules blancs

-Prise de greffe

La reconstitution des globules blancs à plus de 1G/L a eu lieu au temps médian de J23 (J11-J34). L'incidence cumulative de globules blancs supérieurs à 1G/L à J30 était de 88.5%.

-Impact des caractéristiques du receveur

L'âge, le sexe du receveur et le type de pathologie maligne ou non, n'ont pas d'impact significatif sur la reconstitution des globules blancs.

-Impact des caractéristiques du donneur

Le fait d'avoir un donneur de sexe masculin a un impact significatif défavorable sur la probabilité d'avoir des globules blancs supérieurs à 1G/L à J30 ($p=0.0225$).

En analyse multivariée, avoir un donneur jeune (OR1.09 [1.02-1.16]) augmente significativement le risque de ne pas avoir des globules blancs supérieurs à 1G/L à J30.

Le caractère apparenté ou non apparenté et la compatibilité HLA n'a pas d'impact significatif sur la reconstitution des globules blancs.

-Impact du type de conditionnement

Le type de conditionnement (MAC ou RIC) et l'injection de SAL n'ont pas d'impact significatif sur la reconstitution des globules blancs à 1G/L à J30.

-Impact des manipulations du greffon

Que le greffon soit désérythrocyté ou déplasmatisé ou qu'il ait subi une réduction de volume il n'y a pas de retentissement significatif sur la reconstitution des globules blancs.

-Impact de la composition du greffon

On analyse d'abord le risque de ne pas atteindre des globules blancs supérieurs à 1G/L à J30 selon que le greffon est plus ou moins riche en CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. Puis on teste le risque de survenue de ne pas atteindre des globules blancs supérieurs à 1G/L à J30 en fonction de différents seuils de CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+.

En analyse uni et multivariée, on n'observe pas d'impact significatif de la dose de CNT, de CD34+, de CFU-GM et de CD3+ sur la reconstitution des globules blancs à J30.

Concernant la reconstitution des globules blancs, on ne note pas de différence significative entre les différents seuils testés de CNT, de CD34+, de CFU-GM et de CD3. (Tableau 7)

	GB>1000 à j30
CNT	
<1.265.10 ⁸ vs >1.265.10 ⁸ /kg	84.6%vs 89.7% p=0.4784
<2.12.10 ⁸ vs > 2.12.10 ⁸ /kg	82.7% vs 94.2% p=0.0655
<3.015.10 ⁸ vs >3.015.10 ⁸ /kg	87.2% vs 92.3% p=0.4784
CD34+	
<1.93.10 ⁶ vs >1.93.10 ⁶ /kg	88.5% vs 88.5% p=1
<2.7.10 ⁶ vs >2.7.10 ⁶ /kg	84.6% vs 92.3% p=0.2196
<3.47.10 ⁶ vs >3.47.10 ⁶ /kg	87.3% vs 92% p=0.5252
CFU-GM	
<32.215.10 ⁴ vs >32.215.10 ⁴ /kg	92.3% vs 87.2% p=0.4784
<53.45.10 ⁴ vs >53.45.10 ⁴ /kg	84.6% vs 92.3% p=0.2196
<76.695.10 ⁴ vs >76.695.10 ⁴ /kg	92.3% vs 87.2% p=0.4784
CD3	
<2.015.10 ⁷ vs >2.015.10 ⁷ /kg	80.8% vs 91% p=0.1563
<2.53.10 ⁷ vs >2.53.10 ⁷ /kg	86.5% vs 90.4% p=0.5393
<3.3.10 ⁷ vs >3.3.10 ⁷ /kg	87.3% vs 92% p=0.5252

Tableau 7 : Impact de différents seuils cellulaires sur la reconstitution des globules blancs à j30.

-les patients ayant eu la reconstitution de globules blancs la plus lente

On compare la composition cellulaire des greffons des 25% de patients les plus lents à reconstituer leurs globules blancs ou ne les reconstituant pas avec les autres patients.

Il n'y a pas de différence significative en terme de composition cellulaire du greffon entre les patients ayant eu la reconstitution la plus lente pour les globules blancs et le reste des patients. (Tableau 8)

	Patients la reconstitution GB la plus lente (Moyenne+/-ET) N=26	Autres patients (Moyenne+/-ET) N=78	p
CNT/kg	2.2+/-2	2.5+/-1.4	0.4216
CD34+/kg	2.6+/-1.1	3.2+/-2.1	0.1797
CFU-GM/kg	52.9+/-32.4	69.7+/-53.9	0.1370

Tableau 8 : Comparaison de la composition du greffon entre les patients ayant reconstitué le plus lentement leurs globules blancs et le reste de la cohorte.

B.2) Polynucléaires neutrophiles

-Prise de greffe

La reconstitution des polynucléaires neutrophiles à plus de 0.500 G/L a eu lieu au temps médian de J25 (J11-J37). L'incidence cumulative des polynucléaires neutrophiles supérieurs à 0.500 G/L à J30 était de 83,7%.

-Impact caractéristiques du receveur

En analyse univariée et multivariée, l'âge, le sexe du receveur et le type de pathologie maligne ou non, n'ont pas d'impact significatif sur la reconstitution des polynucléaires neutrophiles.

-Impact caractéristiques du donneur

En analyse multivariée, avoir un donneur jeune (OR1.08 [1.02-1.14]) augmente significativement le risque de ne pas avoir des PNN supérieurs à 0.500 G/L à J30.

Le sexe du receveur, le caractère apparenté ou non apparenté et la compatibilité HLA, n'ont pas d'impact significatif sur la reconstitution des polynucléaires neutrophiles.

-Impact du type de conditionnement

Les patients ayant reçu un conditionnement de type RIC, ont significativement plus de risque de ne pas obtenir 0.500 G/L PNN à J30. (p=0.0073).

En analyse multivariée, recevoir un RIC (OR 4.45 [1.34-14.51]) ou ne pas avoir reçu de SAL (OR 9.3 [1.36-62.5]) augmente significativement le risque de ne pas avoir des PNN supérieurs à 0.500 G/L à J30

-Impact des manipulations du greffon

Que le greffon soit désérythrocyté ou déplasmatisé ou réduit de volume il n'y a pas de retentissement significatif sur la reconstitution des polynucléaires neutrophiles.

-Impact de la composition du greffon

On analyse d'abord le risque de ne pas atteindre des PNN supérieurs à 0.500 G/L à J30 selon que le greffon est plus ou moins riche en CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. Puis on teste le risque de survenue de ne pas atteindre des PNN supérieurs à 0.500 G/L à J30 en fonction de différents seuils de CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+.

En analyse uni et multivariée, on n'observe pas d'impact significatif de la dose de CNT, de CD34+, de CFU-GM et de CD3+ sur la reconstitution des polynucléaires neutrophiles à J30.

Concernant la reconstitution des polynucléaires neutrophiles, on ne note pas de différence significative entre les différents seuils testés de CNT, de CD34+, de CFU-GM et de CD3.

	PNN>500 à j30
CNT	
<1.265.10 ⁸ vs >1.265.10 ⁸ /kg	84.6%vs 83.3% p=0.8783
<2.12.10 ⁸ vs > 2.12.10 ⁸ /kg	76.9% vs 90.4% p=0.0634
<3.015.10 ⁸ vs >3.015.10 ⁸ /kg	82.1% vs 88.5% p=0.4440
CD34+	
<1.93.10 ⁶ vs >1.93.10 ⁶ /kg	84.6% vs 83.3% p=0.8783
<2.7.10 ⁶ vs >2.7.10 ⁶ /kg	80.8% vs 86.5% p=0.4263
<3.47.10 ⁶ vs >3.47.10 ⁶ /kg	84.8% vs 80% p=0.5708
CFU-GM	
<32.215.10 ⁴ vs >32.215.10 ⁴ /kg	92.3% vs 80.8% p=0.1682
<53.45.10 ⁴ vs >53.45.10 ⁴ /kg	82.7% vs 84.6% p=0.7909
<76.695.10 ⁴ vs >76.695.10 ⁴ /kg	92.3% vs 80.8% p=0.1682
CD3	
<2.015.10 ⁷ vs >2.015.10 ⁷ /kg	80.8% vs 81.6% p=0.6460
<2.53.10 ⁷ vs >2.53.10 ⁷ /kg	82.7% vs 84.6% p=0.7909
<3.3.10 ⁷ vs >3.3.10 ⁷ /kg	82.8% vs 80% p=0.5708

Tableau 9: Impact de différents seuils cellulaires sur la reconstitution des PNN à j30.

-les patients ayant eu la reconstitution des polynucléaires neutrophiles la plus lente

On compare la composition cellulaire des greffons des 25% de patients les plus lents à reconstituer leurs polynucléaires neutrophiles ou ne les reconstituant pas, avec les autres patients.

Il n'y a pas de différence significative en terme de composition cellulaire du greffon entre les patients ayant eu la reconstitution la plus lente pour les polynucléaires neutrophiles et le reste des patients. (Tableau 10)

	Patients la reconstitution PNN la plus lente (Moyenne+/-ET) N=25	Autres patients (Moyenne+/-ET) N=79	p
CNT/kg	2.3+/-1.9	2.4+/-1.4	0.8263
CD34+/kg	2.9+/-1.3	3.1+/-2	0.5592
CFU-GM/kg	72.1+/-57.3	63.4+/-67.4	0.4492

Tableau 10 : Comparaison de la composition du greffon entre les patients ayant reconstitué le plus lentement leurs polynucléaires neutrophiles et le reste de la cohorte.

B.3) Plaquettes

-Prise de greffe

La reconstitution des plaquettes à plus de 20G/L a eu lieu au temps médian de J24 (J11-J195). L'incidence cumulative des plaquettes supérieures à 20G/L à J180 était de 94.2%.

La reconstitution des plaquettes à plus de 50G/L a eu lieu au temps médian de J34 (J14-J397). L'incidence cumulative des plaquettes supérieures à 50G/L à J180 est de 84.6%.

-Impact caractéristiques du receveur

L'âge, le sexe du receveur et le type de pathologie maligne ou non, n'ont pas d'impact significatif sur une reconstitution à plus de 20G/L ou de 50G/L des plaquettes à J180.

-Impact caractéristiques du donneur

L'âge, le sexe du donneur, la compatibilité HLA, le caractère apparenté ou non, n'ont pas d'impact significatif sur une reconstitution à plus de 20G/L des plaquettes à J180.

Le fait d'avoir un donneur non apparenté ou d'avoir un donneur de sexe masculin augmente significativement ($p=0.0401$ et $p=0.0130$ respectivement) le risque de ne pas avoir des plaquettes supérieures à 50G/L à J180.

En analyse multivariée, seul le fait d'avoir un donneur de sexe masculin augmente significativement le risque de ne pas avoir des plaquettes supérieures à 50G/L à J180 (OR 4.52 [1.2-16.95]).

-Impact du type de conditionnement

Le type de conditionnement n'a pas d'impact significatif sur le fait d'avoir des plaquettes supérieures à 20 G/L ou à 50G/L à J180.

Le fait de recevoir du SAL augmente significativement ($p=0.0150$) le risque de ne pas avoir des plaquettes supérieures à 20 G/L ou à 50G/L à J180.

-Impact des manipulations du greffon

Que le greffon soit désérythrocyté ou déplasmatisé ou qu'il ait subi une réduction de volume, il n'y a pas de retentissement significatif sur la reconstitution des plaquettes.

-Impact de la composition du greffon

On analyse d'abord le risque de ne pas atteindre des plaquettes supérieures à 20 G/L ou 50 G/L à J180 selon que le greffon est plus ou moins riche en CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. Puis on teste le risque de survenue de ne pas atteindre des plaquettes supérieures à 20 G/L ou 50 G/L à J180 en fonction de différents seuils de CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+.

En analyse uni et multivariée, on n'observe pas d'impact significatif de la dose de CNT, de CD34+, de CFU-GM et de CD3+ sur la reconstitution des plaquettes à J180.

Concernant la reconstitution des plaquettes, on ne note pas de différence significative entre les différents seuils testés de CNT, de CD34+, de CFU-GM et de CD3. (Tableau11)

	Plaquettes>20G/L à j180	Plaquettes >30G/L à j180
CNT		
<1.265.10 ⁸ vs >1.265.10 ⁸ /kg	92.3%vs 94.9% p=0.6272	80.8% vs 85.9% p=0.5302
<2.12.10 ⁸ vs > 2.12.10 ⁸ /kg	92.3% vs 96.2% p=0.4003	78.8% vs 90.4% p=0.1030
<3.0.15.10 ⁸ vs >3.015.10 ⁸ /kg	93.6% vs 96.2% p=0.6272	82.1% vs 92.3% p=0.2094
CD34+		
<1.93.10 ⁶ vs >1.93.10 ⁶ /kg	92.3% vs 94.9% p=0.6272	84.6% vs 84.6% p=1
<2.7.10 ⁶ vs >2.7.10 ⁶ /kg	90.4% vs 98.1% p=0.0925	78.8% vs 90.4% p=0.1030
<3.47.10 ⁶ vs >3.47.10 ⁶ /kg	92.4% vs 100% p=0.1558	83.5% vs 88% p=0.5905
CFU-GM		
<32.215.10 ⁴ vs >32.215.10 ⁴ /kg	100% vs 92.3% p=0.1452	92.3% vs 82.1% p=0.2094
<53.45.10 ⁴ vs >53.45.10 ⁴ /kg	90.4% vs 98.1% p=0.0925	84.36% vs 84.6% p=1
<76.695.10 ⁴ vs >76.695.10 ⁴ /kg	100% vs 92.3% p=0.1452	92.3% vs 82.1% p=0.2094
CD3		
<2.015.10 ⁷ vs >2.015.10 ⁷ /kg	92.3% vs 94.9% p=0.6272	88.5% vs 83.3% p=0.5202
<2.53.10 ⁷ vs >2.53.10 ⁷ /kg	94.2% vs 94.2% p=1	86.5% vs 82.7% p=0.5867
<3.3.10 ⁷ vs >3.3.10 ⁷ /kg	92.4% vs100% p=0.1558	82.3% vs 92% p=0.2403

Tableau 11: Impact de différents seuils cellulaires sur la reconstitution des plaquettes à j180

-les patients ayant eu la reconstitution des plaquettes la plus lente

On compare la composition cellulaire des greffons des 25% de patients les plus lents à reconstituer leurs plaquettes ou ne les reconstituant pas avec les autres patients.

Il n'y a pas de différence significative en terme de composition cellulaire du greffon entre les patients ayant eu la reconstitution la plus lente pour les plaquettes et le reste des patients. (Figure 12)

	Patients la reconstitution plaquettaire la plus lente (Moyenne+/-ET) N=26	Autres patients (Moyenne+/-ET) N=78	p
CNT/kg	2.1+/-0.9	2.5+/-1.7	0.2177
CD34+/kg	2.6+/-0.8	3.2+/-2.1	0.1498
CFU-GM/kg	60.2+/-55.3	67.3+/-48.1	0.5335

Tableau 12: Comparaison de la composition du greffon entre les patients ayant reconstitué le plus lentement leurs plaquettes et le reste de la cohorte.

B.4) Patients avec la reconstitution en PNN et en plaquettes la plus lente

On compare la composition cellulaire des greffons des patients n'ayant pas reconstitué leur PNN et leurs plaquettes ou ayant reconstitué leurs PNN à plus de 0.5G/L et leurs plaquettes à plus de 50G/L le plus tardivement.

Seul la quantité de CNT/kg est significativement moindre ($p=0.0482$) chez les patients ayant reconstitué le plus lentement leurs PNN et leurs plaquettes. (Tableau 13)

	Patients la reconstitution plaquettaire la plus lente (Moyenne+/-ET) N=11	Autres patients (Moyenne+/-ET) N=93	p
CNT/kg	1.5+/-0.7	2.5+/-1.6	0.0482
CD34+/kg	2.3+/-0.7	3.1+/-2	0.1645
CFU-GM/kg	62.5+/-44.8	65.9+/-50.6	0.8300

Tableau 13: comparaison de la composition du greffon entre les patients ayant reconstitué le plus lentement leurs PNN et leurs plaquettes et le reste de la cohorte.

C) Complications

C.1 Infections

Bactériennes

-Incidence

Quarante cinq virgule deux pour cent (n=47) des patients ont présenté une infection bactérienne. Le délai médian de survenue d'une première infection bactérienne est de 2,5 mois après la greffe (0-28.7 mois). La majorité était des bactériémies à staphylocoque coagulase négative. Les 2^{ème}s types d'infection les plus fréquentes étaient les colites à *clostridium difficile*.

-Impact des caractéristiques du receveur

Le sexe du receveur n'a pas d'impact significatif sur la survenue d'infection bactérienne.

L'âge du receveur plus élevé (30.3 ans vs 23.3 ans) et une indication de greffe pour pathologie maligne (50% vs 22%) augmentent significativement le risque de survenue d'infection bactérienne (p=0.0264 et p=0.0265 respectivement).

En analyse multivariée, les caractéristiques du receveur n'ont pas d'impact significatif sur la survenue d'une infection bactérienne.

-Impact des caractéristiques du donneur

La compatibilité HLA, le caractère apparenté ou non et le sexe du donneur n'a pas d'impact significatif sur la survenue d'infection bactérienne.

En analyse uni et multivariée, le fait d'avoir un donneur âgé (p=0.0055 et OR 1.052[1.015-1.090] respectivement) augmente significativement le risque de survenue d'une infection bactérienne.

-Impact du type de conditionnement

Le type de conditionnement et l'injection de SAL n'ont pas d'impact significatif sur la survenue d'une infection bactérienne.

-Impact des manipulations du greffon

Que le greffon soit désérythrocyté ou déplasmatisé ou qu'il ait subi une réduction de volume il n'y a pas de retentissement significatif sur la survenue d'une infection bactérienne.

-Impact de la composition du greffon

On analyse d'abord le risque de survenue d'une infection bactérienne selon que le greffon est plus ou moins riche en CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. Puis on teste le risque de survenue d'une infection bactérienne en fonction de différents seuils de CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. (Tableau 14)

Une quantité de CD34+/kg dans le greffon plus faible ($2.54 \cdot 10^6$ vs $3.47 \cdot 10^6$) et une quantité dans le greffon de CFU-GM/kg plus faible ($53.98 \cdot 10^4$ vs $75.06 \cdot 10^4$) augmentent significativement le risque de survenue d'une infection bactérienne (p=0.0025 et p=0.0252 respectivement).

En analyse multivariée, le fait d'avoir un greffon avec une quantité de CFU-GM/kg faible (OR 1.01 [1-1.02]) augmente le risque d'avoir une infection bactérienne.

Pour les CNT, en cas de greffon comportant moins de 3.015×10^8 /kg CNT, on observe significativement ($p=0.0307$) plus d'infection bactérienne.

Pour les CD34+, en cas de greffon comportant moins de 1.93×10^6 /kg ou moins de 3.47×10^6 /kg on observe significativement ($p=0.0169$ et $p=0.0475$ respectivement) plus d'infection bactérienne.

Pour les CFU-GM, en cas de greffon comportant moins de 53.45×10^4 ou moins de 76.695×10^4 on observe significativement ($p=0.0302$ et $p=0.021$ respectivement) plus d'infection bactérienne.

Les différents seuils testés de CD3 ne permettent pas d'observer de différence de survenue d'infection bactérienne.

	Survenue infection bactérienne
CNT < $1.265 \cdot 10^8$ vs > $1.265 \cdot 10^8$ /kg < $2.12 \cdot 10^8$ vs > $2.12 \cdot 10^8$ /kg <$3.015 \cdot 10^8$ vs >$3.015 \cdot 10^8$/kg	50%vs 43.6% $p=0.5695$ 53.8% vs 36.5% $p=0.0762$ 51.3% vs 26.9% $p=0.0307$
CD34+ <$1.93 \cdot 10^6$ vs >$1.93 \cdot 10^6$/kg < $2.7 \cdot 10^6$ vs > $2.7 \cdot 10^6$ /kg <$3.47 \cdot 10^6$ vs >$3.47 \cdot 10^6$/kg	65.4% vs 38.5% $p=0.0169$ 51.9% vs 38.5% $p=0.1678$ 50.6% vs 28% $p=0.0475$
CFU-GM < $32.215 \cdot 10^4$ vs > $32.215 \cdot 10^4$ /kg <$53.45 \cdot 10^4$ vs >$53.45 \cdot 10^4$/kg <$76.695 \cdot 10^4$ vs >$76.695 \cdot 10^4$/kg	57.7% vs 41% $p=0.1392$ 55.8% vs 34.6% $p=0.0302$ 53.8% vs 19.2% $p=0.021$
CD3 < $2.015 \cdot 10^7$ vs > $2.015 \cdot 10^7$ /kg < $2.53 \cdot 10^7$ vs > $2.53 \cdot 10^7$ /kg < $3.3 \cdot 10^7$ vs > $3.3 \cdot 10^7$ /kg	38.5% vs 47.4% $p=0.4259$ 48.1% vs 42.3% $p=0.5545$ 49.4% vs 32% $p=0.1293$

Tableau 14 : Impact de différents seuils cellulaires sur la survenue d'infections bactériennes.

	Infections bactériennes		p	Multivariée
	oui	non		
Dose moyenne de CD34+/kg	2.54 10 ⁶	3.47 10 ⁶	0.0025	
Dose moyenne de CFU-GM/kg	53.98 10 ⁴	75.06 10 ⁴	0.0252	OR 1.01 [1-1.02]
Age du receveur	30.3 ans	23.3 ans	0.0264	
Age du donneur	33.2 ans	26.3 ans	0.0055	OR 1.052[1.015-1.090]
Pathologies malignes vs non malignes	50% 22.8%	50% 77.2%	0.0265	
CNT<3.015.10 ⁸ vs >3.015.10 ⁸ /kg	51.3%	26.9%	0.0307	
CD34+<1.93.10 ⁶ vs >1.93.10 ⁶ /kg	65.4%	38.5%	0.0169	
<3.47.10 ⁶ vs >3.47.10 ⁶ /kg	50.6%	28%	0.0475	
CFU-GM <53.45.10 ⁴ vs >53.45.10 ⁴ /kg	55.8%	34.6%	0.0302	
<76.695.10 ⁴ vs >76.695.10 ⁴ /kg	53.8%	19.2%	0.021	

Tableau 15: Facteurs de risque de survenue d'infections bactériennes

Infections virales

-Incidence

Soixante virgule six pour cent des patients ont présenté une pathologie virale. Le délai médian de survenue d'une première atteinte virale est de 1,9 mois après la greffe (0.1-36.9 mois). Les infections virales les plus fréquentes étaient les infections à CMV puis à poliomaBK virus puis à EBV puis à VZV.

-Impact des caractéristiques du receveur

L'âge, le sexe du receveur et le type de pathologie maligne ou non n'a pas d'impact significatif sur la survenue d'infection virale.

-Impact des caractéristiques du donneur

L'âge, le sexe du donneur, la compatibilité HLA, le caractère apparenté ou non n'a pas d'impact significatif sur la survenue d'infection virale.

-Impact du type de conditionnement

Un conditionnement MAC augmente significativement (p=0.0238) le risque de survenue d'une infection virale.

En analyse multivariée, un conditionnement MAC augmente significativement (OR 2.58 [1.13-5.88]) le risque de survenue d'une infection virale.

L'injection de SAL n'a pas d'impact significatif sur la survenue d'infections virales.

-Impact des manipulations du greffon

Que le greffon soit désérythrocyté ou déplasmatisé ou qu'il ait subi une réduction de volume il n'y a pas de retentissement significatif sur la survenue d'infection virale.

-Impact de la composition du greffon

On analyse d'abord le risque de survenue d'une infection virale selon que le greffon est plus ou moins riche en CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. Puis on teste le risque de survenue d'une infection virale en fonction de différents seuils de CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. (Tableau 16)

En analyse univariée et multivariée, on n'observe pas d'impact significatif de la richesse du greffon en CNT, en CD34+, en CFU-GM et en CD3+ sur la survenue d'infections virales.

On ne note pas de différence significative pour la survenue d'infections virales entre les différents seuils testés de CNT, de CD34+, de CFU-GM et de CD3.

	Survenue infection virale
CNT	
<1.265.10 ⁸ vs >1.265.10 ⁸ /kg	69.2%vs 57.7% p=0.2971
<2.12.10 ⁸ vs > 2.12.10 ⁸ /kg	69.2%vs 51.9% p=0.0709
<3.015.10 ⁸ vs >3.015.10 ⁸ /kg	62.8%vs 53.8% p=0.4174
CD34+	
<1.93.10 ⁶ vs >1.93.10 ⁶ /kg	57.7% vs 61.5% p=0.7282
<2.7.10 ⁶ vs >2.7.10 ⁶ /kg	59.6% vs 61.5% p=0.8410
<3.47.10 ⁶ vs >3.47.10 ⁶ /kg	63.3% vs 52% p=0.3140
CFU-GM	
32.215.10 ⁴ vs 32.215.10 ⁴ /kg	65.4% vs 59% p=0.5621
53.45.10 ⁴ vs 53.45.10 ⁴ /kg	63.5%vs 57.7% p=0.5472
76.695.10 ⁴ vs 76.695.10 ⁴ /kg	62.8% vs 53.8% p=0.4174
CD3	
<2.015.10 ⁷ vs >2.015.10 ⁷ /kg	61.5% vs 60.3% p=0.9078
<2.53.10 ⁷ vs >2.53.10 ⁷ /kg	67.3% vs 53.8% p=0.1601
<3.3.10 ⁷ vs >3.3.10 ⁷ /kg	60.8% vs 60% p=0.9460

Tableau 16: Impact de différents seuils cellulaires sur la survenue d'infections virales.

	Infections virales		p	Multivariée
	oui	non		
Conditionnement MAC vs RIC	68.7% 45.9%	31.3% 54.1%	0.0238	OR 2.58 [1.13-5.88]

Tableau 17 : Facteurs de risque de survenue d'infections virales

Infections fongiques

-Incidence

Dix-sept virgule trois pour cent des patients ont présenté une infection fongique. Le délai médian de survenue de ce type d'infection est de 6,4 mois après la greffe (0-28 mois). Parmi les infections fongiques, 64% sont des infections invasives dont 9 aspergilloses, une candidémie et une infection disséminée à *penicillium argilaceum*.

-Impact des caractéristiques du receveur

L'âge, le sexe du receveur et le type de pathologie maligne ou non n'ont pas d'impact sur la survenue d'infections fongiques.

-Impact des caractéristiques du donneur

L'âge, le sexe du donneur, la compatibilité HLA, le caractère apparenté ou non n'ont pas d'impact sur la survenue d'infection fongique.

-Impact du type de conditionnement

Le type de conditionnement ou l'injection de SAL n'ont pas d'impact significatif sur la survenue d'infections fongiques.

-Impact des manipulations du greffon

Que le greffon soit désérythrocyté ou déplasmatisé ou qu'il ait subi une réduction de volume il n'y a pas de retentissement significatif sur la survenue d'infections fongiques.

-Impact de la composition du greffon

On analyse d'abord le risque de survenue d'une infection fongique selon que le greffon est plus ou moins riche en CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. Puis on teste le risque de survenue d'une infection fongique en fonction de différents seuils de CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. (Tableau 18)

Une quantité de CNT/kg dans le greffon plus faible ($1.68 \cdot 10^8$ vs $2.54 \cdot 10^8$), une quantité de CD34+/kg dans le greffon plus faible ($2.3 \cdot 10^6$ vs $3.21 \cdot 10^6$) et une quantité dans le greffon de CFU-GM/kg plus faible ($44.18 \cdot 10^4$ vs $70 \cdot 10^4$) entraînent significativement ($p=0.0098$, $p=0.0102$, $p=0.0195$ respectivement) plus d'infections fongiques.

En analyse multivariée, le fait de recevoir un greffon avec une quantité faible de CNT/kg (OR 1.81 [1.03-3.2]), augmente significativement le risque de survenue d'une infection fongique.

Concernant la dose de CNT, une dose supérieure à $2.12 \cdot 10^8$ /kg conduit significativement ($p=0.0412$) à moins d'infections fongiques.

En cas de dose de CD34+ supérieure à $2.7 \cdot 10^6$ /kg ou supérieure à $3.47 \cdot 10^6$ /kg, on observe significativement ($p=0.0095$ et $p=0.0436$ respectivement) moins d'infections fongiques.

En cas de dose de CD3+ supérieure à $3.3 \cdot 10^7$ /kg on observe significativement ($p=0.0087$) moins d'infections fongiques.

On ne note pas d'impact significatif entre les différents seuils testés de CD3 sur la survenue d'infections fongiques

	Infection fongique
CNT <1.265.10 ⁸ vs >1.265.10 ⁸ /kg <2.12.10⁸ vs > 2.12.10⁸/kg <3.015.10 ⁸ vs >3.015.10 ⁸ /kg	26.9% vs 14.1% p=0.1345 25% vs 9.6% p=0.0412 20.5% vs 7.7% p=0.1345
CD34+ <1.93.10 ⁶ vs >1.93.10 ⁶ /kg <2.7.10⁶ vs >2.7.10⁶/kg <3.47.10⁶ vs >3.47.10⁶/kg	26.9% vs 14.1% p=0.1345 26.9% vs 7.7% p=0.0095 21.5% vs 4% p=0.0436
CFU-GM <32.215.10 ⁴ vs >32.215.10 ⁴ /kg <53.45.10 ⁴ vs >53.45.10 ⁴ /kg <76.695.10 ⁴ vs >76.695.10 ⁴ /kg	23.1% vs 15.4% p=0.3692 23.1% vs 11.5% p=0.1199 20.5% vs 7.7% p=0.1345
CD3 <2.015.10 ⁷ vs >2.015.10 ⁷ /kg <2.53.10 ⁷ vs >2.53.10 ⁷ /kg <3.3.10⁷ vs >3.3.10⁷/kg	23.1% vs 15.4% p=0.3692 19.2% vs 15.4% p=0.6042 22.8% vs 0% p=0.0087

Tableau 18 : Impact de différents seuils cellulaires sur la survenue d'infection fongique.

	Infections fongiques		p	Multivariée
	oui	non		
Dose de CNT/kg	1.68 10 ⁸	2.54 10 ⁸	0.0098	OR 1.81 [1.03-3.2]
Dose de CD34+/kg	2.3 10 ⁶	3.21 10 ⁶	0.0102	
Dose de CFU/kg	44.18 10 ⁴	70 10 ⁴	0.0195	
CNT <2.12.10 ⁸ vs > 2.12.10 ⁸ /kg	25%	9.6%	p=0.0412	
CD34+<2.7.10 ⁶ vs>2.7.10 ⁶ /kg	26.9%	7.7%	p=0.0095	
<3.47.10 ⁶ vs>3.47.10 ⁶ /kg	21.5%	4%	p=0.0436	
CD3<3.3.10 ⁷ vs >3.3.10 ⁷ /kg	22.8%	0%	p=0.0087	

Tableau 19 : Facteurs de risque de survenue d'infections fongiques

Infection parasitaire

Un patient a présenté une infection parasitaire, il s'agissait d'une toxoplasmose cérébrale survenue 4,9 mois après la greffe.

Compte tenu de la faible incidence des infections parasitaires nous n'avons pas pu étudier l'impact des caractéristiques du donneur et du receveur, du conditionnement et de la composition du greffon sur ce type d'infection.

C.2 GVH

GVHa

-Incidence

Quatre-vingt et un pour cent des patients évaluable pour la GVHa ont présenté une GVHa dont 90.1% de grade II à IV. Le délai médian de survenue de GVHa était de 1,2 mois (0,7-4,9 mois).

-Impact des caractéristiques du receveur

Un receveur plus jeune (24.3 vs 34.8 ans) est un facteur de risque significatif ($p=0.0098$) de survenue de GVHa.

Le sexe du receveur et le type de pathologie maligne ou non n'influence pas la survenue de GVHa.

-Impact des caractéristiques du donneur

Une compatibilité HLA 9/10 est un facteur de risque significatif ($p=0.0198$) de survenue de GVHa.

L'âge, le sexe du donneur, le caractère apparenté ou non, n'influencent pas significativement la survenue de GVHa.

-Impact du type de conditionnement

Le type de conditionnement et l'injection de SAL n'influencent pas significativement la survenue de GVHa.

-Impact des manipulations du greffon

Que le greffon soit désérythrocyté ou déplasmaté ou qu'il ait subi une réduction de volume il n'y a pas de retentissement significatif sur la survenue de GVHa.

-Impact de la composition du greffon

On analyse d'abord le risque de survenue d'une GVHa selon que le greffon est plus ou moins riche en CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. Puis on teste le risque de survenue d'une GVHa en fonction de différents seuils de CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. (Tableau 20)

En analyse univariée et multivariée, la dose de CNT, de CD34+, de CFU-GM et de CD3 n'influence pas la survenue de GVHa.

On n'observe pas de différence significative de survenue de GVHa entre les différents seuils testés de CNT, de CD34+, de CFU-GM et de CD3+.

	GVHa
CNT <1.265.10 ⁸ vs >1.265.10 ⁸ /kg <2.12.10 ⁸ vs > 2.12.10 ⁸ /kg <3.015.10 ⁸ vs >3.015.10 ⁸ /kg	79.2% vs 81.6% p=0.7928 85.7% vs 76.5% p=0.2388 80% vs 84% p=0.9498
CD34+ <1.93.10 ⁶ vs >1.93.10 ⁶ /kg <2.7.10 ⁶ vs >2.7.10 ⁶ /kg <3.47.10 ⁶ vs >3.47.10 ⁶ /kg	75% vs 82.9% p=0.3901 83.7% vs 78.4% p=0.5041 81.6% vs 79.2% p=0.7928
CFU-GM 32.215.10 ⁴ vs 32.215.10 ⁴ /kg 53.45.10 ⁴ vs 53.45.10 ⁴ /kg 76.695.10 ⁴ vs 76.695.10 ⁴ /kg	84.6% vs 79.7% p=0.5849 85.4% vs 76.9% p=0.2794 81.1% vs 80.8% p=0.9722
CD3 <2.015.10 ⁷ vs >2.015.10 ⁷ /kg <2.53.10 ⁷ vs >2.53.10 ⁷ /kg <3.3.10 ⁷ vs >3.3.10 ⁷ /kg	88% vs 78.7% p=0.3029 82% vs 80% p=0.7988 82.6% vs 79.2% p=0.7928

Tableau 20 : Impact de différents seuils cellulaires sur la survenue de GVHa.

GVHc

-Incidence

Trente sept virgule deux pour cents des patients évaluable pour la GVHc ont présenté une GVHc dont 65,7% une GVH extensive. Le délai médian de survenue de GVHc était de 6 mois (3-27,4 mois).

-Impact des caractéristiques du receveur

L'âge, le sexe du receveur et le type de pathologie maligne ou non, n'ont pas d'impact significatif sur la survenue de GVHc.

-Impact des caractéristiques du donneur

L'âge, le sexe du donneur, la compatibilité HLA, le caractère apparenté ou non n'ont pas d'impact significatif sur la survenue de GVHc.

-Impact du type de conditionnement

Le type de conditionnement et l'injection de SAL n'ont pas d'impact significatif sur la survenue de GVHc.

-Impact des manipulations du greffon

Que le greffon soit désérythrocyté ou déplasmatisé ou qu'il ait subi une réduction de volume il n'y a pas de retentissement significatif sur la survenue de GVHc.

-Impact de la composition du greffon

On analyse d'abord le risque de survenue d'une GVHc selon que le greffon est plus ou moins riche en CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. Puis on teste le risque de survenue d'une GVHc en fonction de différents seuils de CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. (Tableau 21)

En analyse univariée et multivariée, la composition du greffon n'a pas d'impact significatif sur la survenue de GVHc.

En cas de greffon comportant moins de $53.45.10^4/\text{kg}$ CFU-GM, on observe significativement ($p=0.0376$) plus de GVHc.

On n'observe pas de différence significative de survenue de GVHc entre les différents seuils testés de CNT, de CD34 et de CD3.

	GVHc
CNT	
$<1.265.10^8$ vs $>1.265.10^8/\text{kg}$	21.7%vs 42.3% $p=0.0769$
$<2.12.10^8$ vs $>2.12.10^8/\text{kg}$	38.3% vs 36.2% $p=0.8310$
$<3.015.10^8$ vs $>3.015.10^8/\text{kg}$	37.14 vs 37.5% $p=0.9751$
CD34+	
$<1.93.10^6$ vs $>1.93.10^6/\text{kg}$	34.8% vs 38% $p=0.7796$
$<2.7.10^6$ vs $>2.7.10^6/\text{kg}$	34.8% vs 39.6% $p=0.6303$
$<3.47.10^6$ vs $>3.47.10^6/\text{kg}$	37.5% vs 36.4% $p=0.9231$
CFU-GM	
$32.215.10^4$ vs $32.215.10^4/\text{kg}$	44% vs 34.8% $p=0.4141$
$53.45.10^4$ vs $53.45.10^4/\text{kg}$	47.8% vs 27.1% $p=0.0376$
$76.695.10^4$ vs $76.695.10^4/\text{kg}$	41.4% vs 25% $p=0.1508$
CD3	
$<2.015.10^7$ vs $>2.015.10^7/\text{kg}$	29.7% vs 40% $p=0.3434$
$<2.53.10^7$ vs $>2.53.10^7/\text{kg}$	36.2% vs 38.3% $p=0.8310$
$<3.3.10^7$ vs $>3.3.10^7/\text{kg}$	37.1% vs 37.5% $p=0.9751$

Tableau 21 : Impact de différents seuils cellulaires sur la survenue de GVHc.

C.3 MVO

-Incidence

Onze pour cent des patients évaluable pour la MVO ont présenté une MVO. Le délai médian de survenue d'une MVO était de 0,4 mois (0.2-2.2 mois).

-Impact des caractéristiques du receveur

L'âge, le sexe du receveur et le type de pathologie maligne ou non, n'ont pas d'impact significatif sur la survenue de MVO.

-Impact des caractéristiques du donneur

L'âge et le sexe du donneur, la compatibilité HLA, le caractère apparenté ou non, n'ont pas d'impact significatif sur la survenue de MVO.

-Impact du type de conditionnement

En analyse bivariable et multivariable, le type de conditionnement et l'injection de SAL n'ont pas d'impact significatif sur la survenue de MVO.

-Impact des manipulations du greffon

Que le greffon soit désérythrocyté ou déplasmatisé ou qu'il ait subi une réduction de volume il n'y a pas de retentissement significatif sur la survenue de MVO.

-Impact de la composition du greffon

On analyse d'abord le risque de survenue d'une MVO selon que le greffon est plus ou moins riche en CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. Puis on teste le risque de survenue d'une MVO en fonction de différents seuils de CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. (Tableau 22)

En analyse univariée et multivariable, la composition du greffon n'a pas d'impact significatif sur la survenue de MVO.

En cas de greffon comportant plus $3.47.10^6/\text{kg}$ CD34+ ou plus de $2.015.10^7/\text{kg}$ CD3+ on observe, significativement, ($p=0.0119$ et $p=0.0424$ respectivement) plus de MVO.

On ne note pas de différence significative en terme de survenue de MVO entre les différents seuils testés de CNT et de CFU-GM.

	MVO
CNT	
$<1.265.10^8$ vs $>1.265.10^8/\text{kg}$	8.3% vs 11.8% $p=0.6320$
$<2.12.10^8$ vs $>2.12.10^8/\text{kg}$	8.2% vs 13.7% $p=0.3742$
$<3.015.10^8$ vs $>3.015.10^8/\text{kg}$	9.3% vs 11.8% $p=0.3582$
CD34+	
$<1.93.10^6$ vs $>1.93.10^6/\text{kg}$	4.2% vs 13.2% $p=0.2197$
$<2.7.10^6$ vs $>2.7.10^6/\text{kg}$	8.2% vs 13.7% $p=0.3742$
$<3.47.10^6$ vs $>3.47.10^6/\text{kg}$	6.6% vs 25% $p=0.0119$
CFU-GM	
$32.215.10^4$ vs $32.215.10^4/\text{kg}$	11.5% vs 10.8% $p=0.9188$
$53.45.10^4$ vs $53.45.10^4/\text{kg}$	8.3% vs 13.5% $p=0.4129$
$76.695.10^4$ vs $76.695.10^4/\text{kg}$	10.8% vs 11.5% $p=0.9188$
CD3	
$<2.015.10^7$ vs $>2.015.10^7/\text{kg}$	0% vs 14.7% $p=0.0424$
$<2.53.10^7$ vs $>2.53.10^7/\text{kg}$	8% vs 14% $p=0.3377$
$<3.3.10^7$ vs $>3.3.10^7/\text{kg}$	7.9% vs 20.8% $p=0.0774$

Tableau 22: Impact de différents seuils cellulaires sur la survenue de MVO.

C.4 MAT

-Incidence

Huit pour cent des patients évaluable pour la MAT ont présenté une MAT. Le délai médian de survenue d'une MAT était de 2 mois (0,9-3,7 mois).

- Compte tenu de la faible incidence de survenue de la MAT, l'impact des caractéristiques du receveur, des caractéristiques du donneur, le type de conditionnement n'a pu être étudié.

-Impact des manipulations du greffon

En cas de déplasmatisation par rapport à la désérythrocytation ou à la réduction de volume, on observe significativement plus de MAT ($p=0.0345$).

-Impact de la composition du greffon

Aucune analyse univariée et multivariée n'a pu être réalisée pour apprécier l'impact de la composition du greffon sur la survenue d'une MAT.

On teste le risque de survenue d'une MAT en fonction de différents seuils de CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. (Tableau 23)

En cas de greffon comportant plus $2.12.10^8/\text{kg}$ CNT, on observe significativement ($p=0.0412$) plus de MAT.

On ne note pas de différence significative, en terme de survenue de MAT entre les différents seuils testés de CNT, de CD34+ et de CFU-GM.

	MAT
CNT $<1.265.10^8$ vs $>1.265.10^8/\text{kg}$ $<2.12.10^8$ vs $>2.12.10^8/\text{kg}$ $<3.015.10^8$ vs $>3.015.10^8/\text{kg}$	4.2%vs 9.2% $p=0.4212$ 2% vs 13.7% $p=0.0412$ 5.3% vs 16% $p=0.0887$
CD34+ $<1.93.10^6$ vs $>1.93.10^6/\text{kg}$ $<2.7.10^6$ vs $>2.7.10^6/\text{kg}$ $<3.47.10^6$ vs $>3.47.10^6/\text{kg}$	4.2% vs 9.2% $p=0.4272$ 6.1% vs 9.8% $p=0.4975$ 7.9% vs 8.3% $p=0.9540$
CFU-GM $32.215.10^4$ vs $32.215.10^4/\text{kg}$ $53.45.10^4$ vs $53.45.10^4/\text{kg}$ $76.695.10^4$ vs $76.695.10^4/\text{kg}$	3.8% vs 9.5% $p=0.3641$ 4.2% vs 11.5% $p=0.1746$ 8.1% vs 7.7% $p=0.9644$
CD3 $<2.015.10^7$ vs $>2.015.10^7/\text{kg}$ $<2.53.10^7$ vs $>2.53.10^7/\text{kg}$ $<3.3.10^7$ vs $>3.3.10^7/\text{kg}$	4% vs 9.3% $p=0.3946$ 8 vs 8% $p=1$ 7.9% vs 8.3% $p=0.9450$

Tableau 23: Impact de différents seuils cellulaires sur la survenue de MAT

C.5 Syndrome de prise de greffe

-Incidence

Deux pour cent des patients évaluable pour le syndrome de prise de greffe ont présenté un syndrome de prise de greffe. Le délai médian était de 0,6 mois (0,6-0,7 mois)

-Compte tenu de la faible incidence de survenue d'un syndrome de prise de greffe, l'impact des caractéristiques du receveur, des caractéristiques du donneur, du type de conditionnement n'a pu être étudié.

-Impact des manipulations du greffon

Que le greffon soit désérythrocyté ou déplasmatisé ou qu'il ait subi une réduction de volume il n'y a pas de retentissement significatif sur la survenue d'un syndrome de prise de greffe.

-Impact de la composition du greffon

Aucune analyse univariée et multivariée n'a pu être réalisée pour apprécier l'impact de la composition du greffon sur la survenue d'un syndrome de prise de greffe.

On ne note pas de différence significative, en terme de survenue d'un syndrome de prise de greffe entre les différents seuils testés de CNT, de CD34+ , de CFU-GM et de CD3. (Tableau 24)

	Syndrome de prise de greffe
CNT	
<1.265.10 ⁸ vs >1.265.10 ⁸ /kg	0%vs 2.6% p=0.4221
<2.12.10 ⁸ vs > 2.12.10 ⁸ /kg	0% vs 2% p=0.1649
<3.015.10 ⁸ vs >3.015.10 ⁸ /kg	2.7% vs 0% p=0.4095
CD34+	
<1.93.10 ⁶ vs >1.93.10 ⁶ /kg	0% vs 2.6% p=0.4221
<2.7.10 ⁶ vs >2.7.10 ⁶ /kg	0% vs 3.9% p=0.6676
<3.47.10 ⁶ vs >3.47.10 ⁶ /kg	1.3% vs 4.2% p=0.3845
CFU-GM	
32.215.10 ⁴ vs 32.215.10 ⁴ /kg	0% vs 2.7% p=0.3971
53.45.10 ⁴ vs 53.45.10 ⁴ /kg	2.1% vs 1.9% p=0.9544
76.695.10 ⁴ vs 76.695.10 ⁴ /kg	2.7% vs 0% p=0.3971
CD3	
<2.015.10 ⁷ vs >2.015.10 ⁷ /kg	4% vs 1.3% p=0.4095
<2.53.10 ⁷ vs >2.53.10 ⁷ /kg	4% vs 0% p=0.1531
<3.3.10 ⁷ vs >3.3.10 ⁷ /kg	2.6% vs 0% p=0.4221

Tableau 24: Impact de différents seuils cellulaires sur la survenue d'un syndrome de prise de greffe.

C.6 Syndrome de fuite capillaire

2,9% des patients évaluable pour le syndrome de fuite capillaire ont présenté un syndrome de fuite capillaire. Le délai médian était de 0,3 mois (0,3-16,1 mois).

Compte tenu de la faible incidence du syndrome de fuite capillaire, aucune étude statistique n'a pu être réalisée pour étudier l'impact des caractéristiques du greffon.

D) TRM

-Incidence

Le taux de TRM était de 25.2%.

-Impact des manipulations du greffon

Que le greffon soit désérythrocyté ou déplasmatisé ou qu'il ait subi une réduction de volume il n'y a pas de retentissement significatif sur la TRM.

-Impact de la composition du greffon

Aucune analyse univariée et multivariée n'a pu être réalisée pour apprécier l'impact de la composition du greffon sur la survenue de TRM.

On ne note pas de différence significative en terme de TRM entre les différents seuils testés de CNT, de CD34, de CFU-GM et de CD3+. (Tableau 25)

	TRM
CNT	
<1.265.10 ⁸ vs >1.265.10 ⁸ /kg	32% vs 23.1% p=0.6562
<2.12.10 ⁸ vs > 2.12.10 ⁸ /kg	33.3% vs 17.3% p=0.1121
<3.015.10 ⁸ vs >3.015.10 ⁸ /kg	29.9% vs 11.5% p=0.1670
CD34+	
<1.93.10 ⁶ vs >1.93.10 ⁶ /kg	34.6% vs 22.1% p=0.7594
<2.7.10 ⁶ vs >2.7.10 ⁶ /kg	31.4% vs 19.2% p=0.3638
<3.47.10 ⁶ vs >3.47.10 ⁶ /kg	24.4% vs 28% p=0.8857
CFU-GM	
32.215.10 ⁴ vs 32.215.10 ⁴ /kg	23.1% vs 26% p=0.7330
53.45.10 ⁴ vs 53.45.10 ⁴ /kg	29.4% vs 21.2% p=0.3266
76.695.10 ⁴ vs 76.695.10 ⁴ /kg	27.3% vs 19.2% p=0.5520
CD3	
<2.015.10 ⁷ vs >2.015.10 ⁷ /kg	23.1% vs 26% p=0.7330
<2.53.10 ⁷ vs >2.53.10 ⁷ /kg	27.5% vs 23.1% p=0.5156
<3.3.10 ⁷ vs >3.3.10 ⁷ /kg	26.9% vs 20% p=0.7841

Tableau 25 : Impact de différents seuils cellulaires sur la TRM.

E) Rechute

-Incidence

Le taux de rechute était de 21.4%. Le taux de décès lié à la rechute est de 14.6%.

-Impact des caractéristiques du receveur

L'âge, le sexe du receveur et le type de pathologie maligne ou non, n'ont pas d'impact significatif sur la survenue d'une rechute.

-Impact des caractéristiques du donneur

L'âge, le sexe du donneur et la compatibilité HLA, n'ont pas d'impact significatif sur la survenue d'une rechute.

En analyse univariée et multivariée, une greffe apparentée conduit significativement à plus de rechute ($p=0.0362$ et OR 2.8 [1.04-7.63]).

-Impact du type de conditionnement

Le type de conditionnement et l'injection de SAL n'ont pas d'impact significatif sur la survenue d'une rechute.

-Impact des manipulations du greffon

Que le greffon soit désérythrocyté ou déplasmatisé ou qu'il ait subi une réduction il n'y a pas de retentissement significatif sur la rechute.

-Impact de la composition du greffon

On analyse d'abord le risque de survenue d'une rechute selon que le greffon est plus ou moins riche en CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. Puis on teste le risque de survenue d'une rechute en fonction de différents seuils de CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+.

En analyse univariée et multivariée, la composition du greffon n'a pas d'impact sur la survenue d'une rechute.

On ne note pas de différence significative de survenue de rechute entre les différents seuils testés de CNT, de CD34+, de CFU-GM et de CD3. (Tableau 26)

	Rechute
CNT	
<1.265.10 ⁸ vs >1.265.10 ⁸ /kg	16%vs 23.1% p=0.4525
<2.12.10 ⁸ vs > 2.12.10 ⁸ /kg	17.6% vs 25% p=0.3626
<3.015.10 ⁸ vs >3.015.10 ⁸ /kg	20.8% vs 23.1% p=0.8048
CD34+	
<1.93.10 ⁶ vs >1.93.10 ⁶ /kg	19.2% vs 22.1% p=0.7594
<2.7.10 ⁶ vs >2.7.10 ⁶ /kg	19.6% vs 23.1% p=0.6676
<3.47.10 ⁶ vs >3.47.10 ⁶ /kg	20.5% vs 24% p=0.7112
CFU-GM	
32.215.10 ⁴ vs 32.215.10 ⁴ /kg	19.2% vs 22.1% p=0.7594
53.45.10 ⁴ vs 53.45.10 ⁴ /kg	21.6% vs 21.2% p=0.9590
76.695.10 ⁴ vs 76.695.10 ⁴ /kg	20.8% vs 23.1% p=0.8048
CD3	
<2.015.10 ⁷ vs >2.015.10 ⁷ /kg	23.1% vs 20.8% p=0.8048
<2.53.10 ⁷ vs >2.53.10 ⁷ /kg	23.5% vs 19.2% p=0.5946
<3.3.10 ⁷ vs >3.3.10 ⁷ /kg	21.8% vs 20% p=0.8489

Tableau 26: Impact de différents seuils cellulaires du greffon sur la rechute.

F) Survie

F.1) Survie globale

-Incidence

La survie globale à 5 ans est de 59%.(Figure 29)

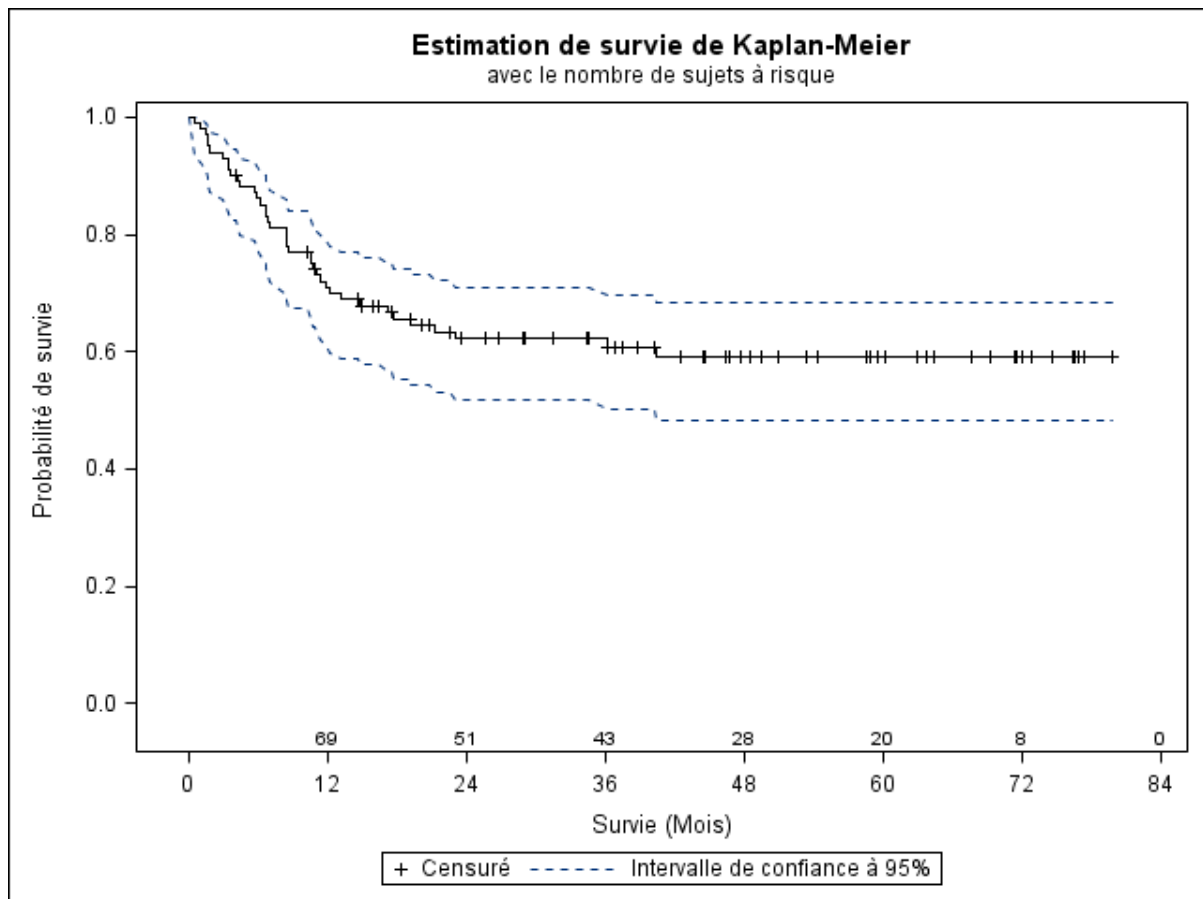


Figure 29 : Survie globale de l'ensemble de la population.

-Impact des caractéristiques du receveur

En analyse univariée et multivariée, l'âge du receveur, diminue significativement la survie globale ($p=0.0034$ et OR 1.021[1.002-1.041]).

Le sexe du receveur et le type de pathologie maligne ou non, n'ont pas d'impact significatif sur la survenue d'une rechute.

-Impact des caractéristiques du donneur

Les caractéristiques du donneur n'ont pas d'impact significatif sur la survie globale.

-Impact du type de conditionnement

Le type de conditionnement et l'injection de SAL n'ont pas d'impact significatif sur la survie globale.

-Impact des manipulations du greffon

Que le greffon soit désérythrocyté ou déplasmatisé ou qu'il ait subi une réduction de volume il n'y a pas de retentissement significatif sur la survie globale. (Figure 30).

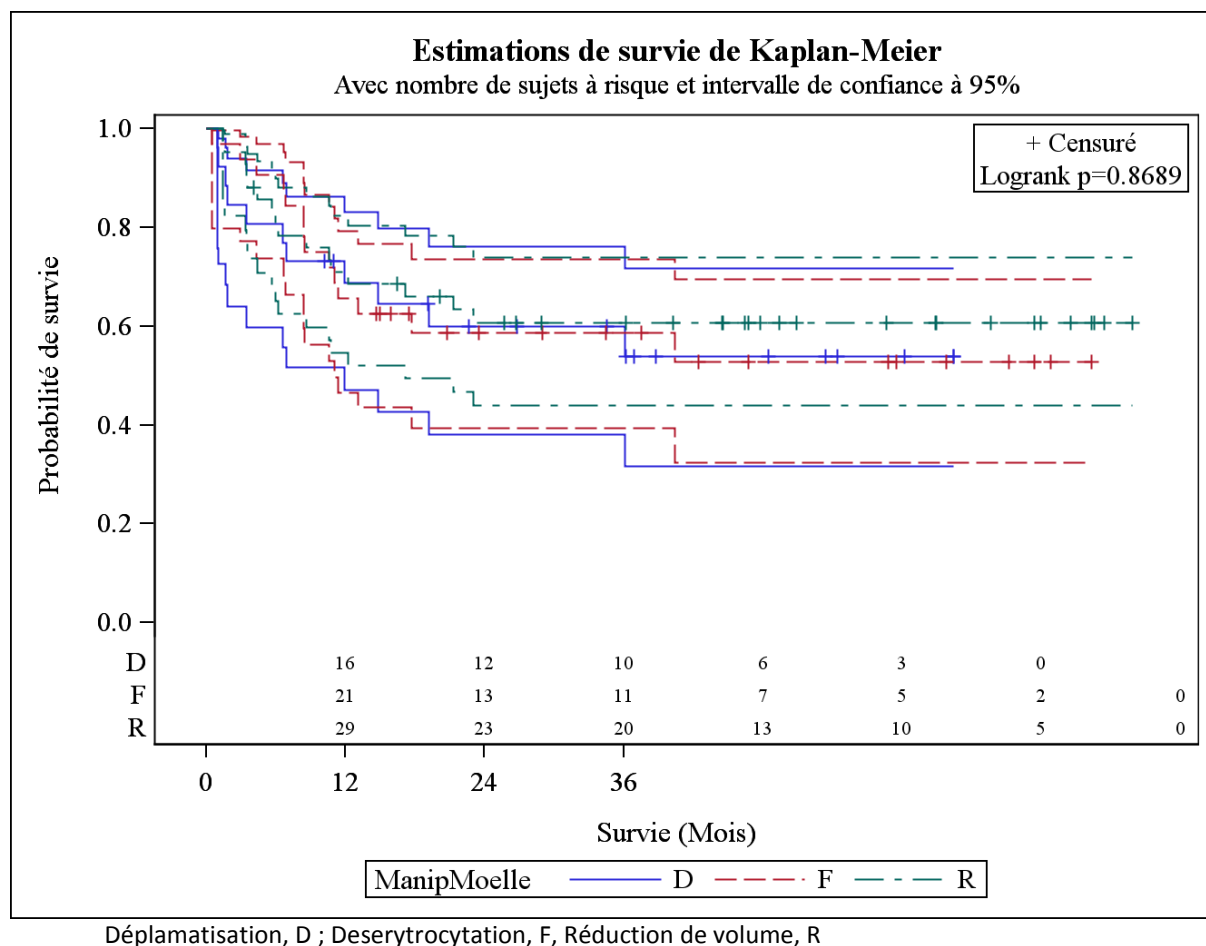


Figure 30 : Survie globale selon les différents types de manipulations du greffon

-Impact de la composition du greffon

On analyse d'abord la survie globale selon que le greffon est plus ou moins riche en CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. Puis on teste la survie globale en fonction de différents seuils de CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. (Tableau 27)

En analyse univariée et multivariée, la composition du greffon n'a pas d'impact significatif sur la survie globale.

On ne note pas de différence significative sur la survie globale entre les différents seuils testés de CNT, de CD34+, de CFU-GM et de CD3.

	Survie globale à 5 ans
CNT <2.12.10 ⁸ vs > 2.12.10 ⁸ /kg	53.65% vs 61.49% p=0.5639
CD34+ <2.7.10 ⁶ vs >2.7.10 ⁶ /kg	50.55% vs 64.01% p=0.3208
CFU-GM 53.45.10 ⁴ vs 53.45.10 ⁴ /kg	50.33% vs 66.13% p=0.2154
CD3 <2.53.10 ⁷ vs >2.53.10 ⁷ /kg	52.72% vs 63.04% p=0.4005

Tableau 27 : Impact de différents seuils cellulaires sur la survie globale à 5 ans

F.2) Survie sans maladie

La survie sans maladie à 5 ans est de 54%. (Figure 31)

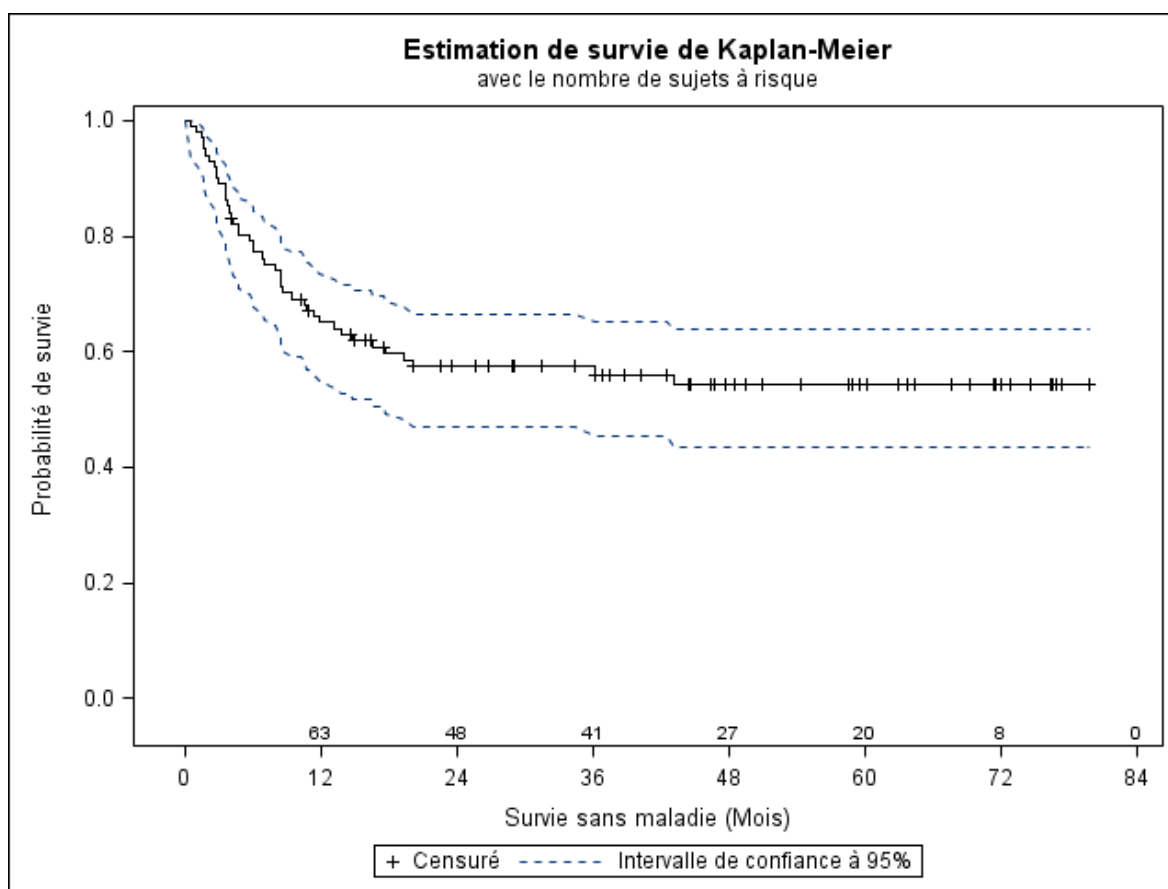


Figure 31 : Survie sans maladie de l'ensemble de la population

-Impact des caractéristiques du receveur

Le sexe du receveur et le type de pathologie maligne ou non, n'ont pas d'impact significatif sur la survie sans maladie.

En analyse univariée et multivariée, être un receveur âgé diminue significativement la survie sans maladie ($p = 0.0166$ et OR 1.022 [1.004-1.04]).

-Impact des caractéristiques du donneur

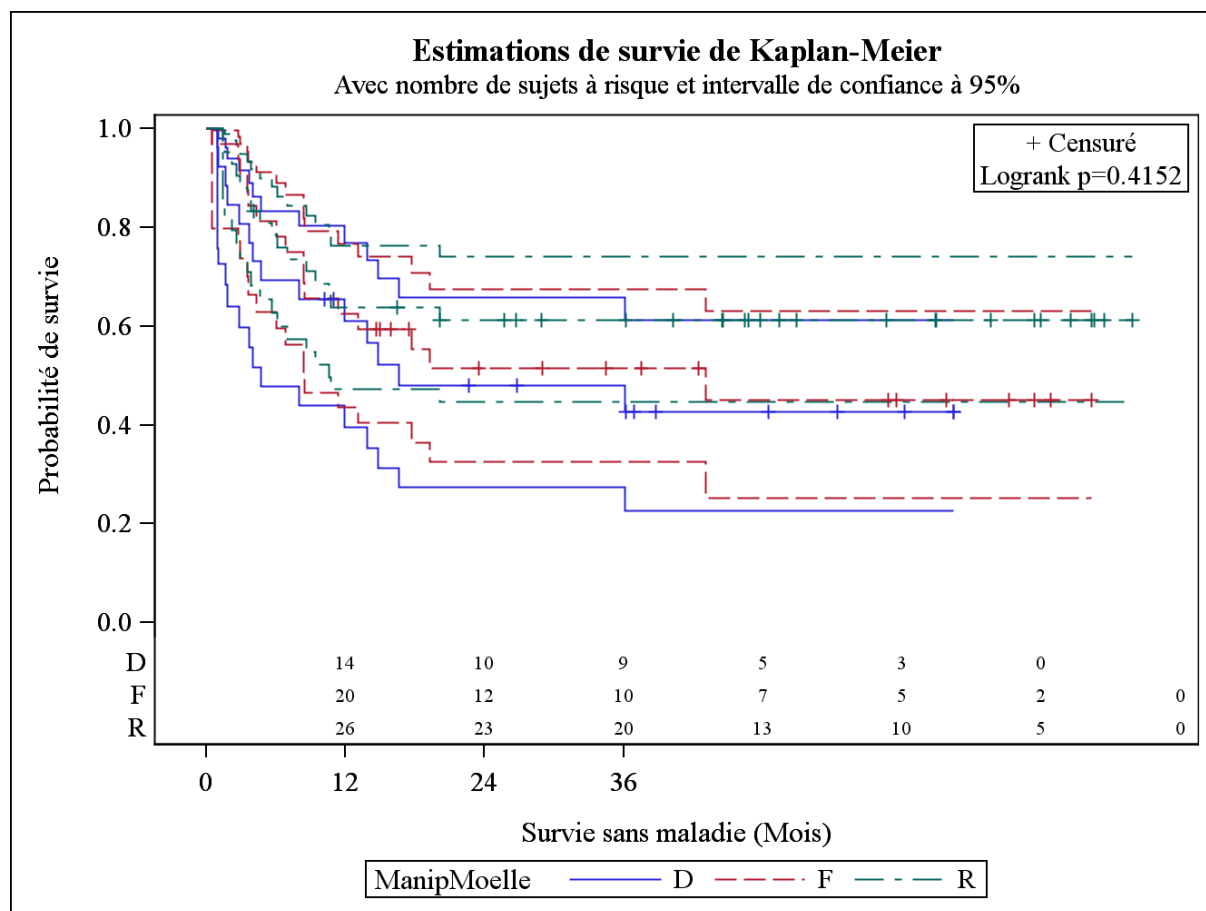
Les caractéristiques du donneur n'ont pas d'impact significatif sur la survie sans maladie.

-Impact du type de conditionnement

Le type de conditionnement et l'injection de SAL n'ont pas d'impact significatif sur la survie sans maladie.

-Impact des manipulations du greffon

Que le greffon soit désérythrocyté ou déplasmatisé ou qu'il ait subi une réduction de volume il n'y a pas de retentissement significatif sur la survie sans rechute. (Figure 32)



Déplasmatisation, D ; Deserytrocytation, F, Réduction de volume, R

Figure 32: Survie sans maladie selon les différents types de manipulations du greffon

-Impact de la composition du greffon

On analyse d'abord la survie sans maladie selon que le greffon est plus ou moins riche en CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. Puis on teste la survie sans maladie en fonction de différents seuils de CNT, CD34+, CFU-GM et CD3+. (Tableau 28)

En analyse univariée et multivariée, la composition du greffon n'a pas d'impact significatif sur la survie sans maladie.

On n'observe pas de différence significative de survie sans maladie à 5 ans entre les différents seuils testés de CNT, de CD34+, de CFU-GM et de CD3.

	Survie sans maladie à 5 ans
CNT <2.12.10 ⁸ vs > 2.12.10 ⁸ /kg	49.22% vs 56.35% p=0.7581
CD34+ <2.7.10 ⁶ vs >2.7.10 ⁶ /kg	46.47% vs 58.56% p=0.4808
CFU-GM 53.45.10 ⁴ vs 53.45.10 ⁴ /kg	48.64% vs 60.47% p=0.2928
CD3 <2.53.10 ⁷ vs >2.53.10 ⁷ /kg	50.3% vs 56.51% p=0.5106

Tableau 28 : Impact de différents seuils cellulaires sur la survie sans rechute à 5 ans

	Univariée	Multivariée
Reconstitution hématopoïétique GB	Donneur homme p=0.0225	Donneur jeune OR 1.09 [1.02-1.16]
PNN	RIC p=0.0073	RIC OR 4.45 [1.34-14.51] Donneur jeune OR 1.08 [1.02-1.14] Pas de SAL OR 9.3 [1.36-62.5]
Plaquettes	Donneur non apparenté p=0.0401 Donneur sexe masculin p=0.0130	Donneur sexe masculin OR 4.52 [1.2-16.95]
Infections Bactériennes	Receveur âgé p=0.0264 Donneur âgé p=0.0055 Pathologie maligne p=0.0265 CNT/kg < 3.015x10 ⁸ p=0.0307 CD34+/kg faible p=0.0025, CD34+ < 1.93x10 ⁶ p=0.0169 CD34+ < 3.47x10 ⁶ p=0.0475 CFU-GM/kg faible p=0.0252 CFU-GM < 53.45x10 ⁴ p=0.0302 CFU-GM < 76.695x10 ⁴ p=0.021	Donneur âgé OR 1.052 [1.015-1.090] CFU-GM/kg faible OR 1.01 [1.0-1.02]
Virales	MAC p=0.0238	MAC OR 2.38 [1.13-5.88]
Fongiques	CNT/kg faible p=0.0098 CNT < 2.12x10 ⁸ p=0.0412 CD34+/kg faible p=0.0102 CD34+ < 2.7x10 ⁶ p=0.0095 CD34+ < 3.47x10 ⁶ p=0.0426 CFU-GM/kg faible p=0.0195 CD3+/kg < 3.3x10 ⁷ p=0.0087	CNT/kg faible OR 1.81 [1.03-3.2]

Tableau 29 : Facteurs de risque de l'évolution post greffe.

	Univariée	Multivariée
GVH		
GVHa	Receveur jeune p=0.0098 HLA 9/10 p=0.0198	
GVHc	CFU-GM/kg<53.45x10 ⁴ p=0.0376	
Pathologies de l'endothélium		
MVO	CD34+/kg>3.47X10 ⁶ p=0.0119 CD3/kg>2.015X10 ⁷ p=0.0424	
MAT	Déplasmatisation p=0.0307 CNT/kg>2.12x10 ⁸ p=0.0412	
Rechute	Donneur apparenté p=0.0362	Donneur apparenté OR 2.8 [1.04-7.63]
Survie globale à 5 ans	Receveur âgé p=0.0034	Receveur âgé OR 1.021[1.002-1.041]
Survie sans rechute à 5 ans	Receveur âgé p=0.0166	Receveur âgé OR 1.022[1.004-1.041]

Tableau 29 : Facteurs de risque de l'évolution post greffe

Discussion

La source de greffon est aujourd'hui le plus souvent de type CSP. Ce choix a été dicté par l'observation que l'augmentation du nombre de CNT améliorait la prise de greffe et diminuait la mortalité liée aux infections (72). Cependant, une étude(7) randomisée récente, comportant 551 patients atteints d'hémopathies myéloïdes dans 48 centres, montre qu'il n'y a pas de différence de survie globale à 2 ans que le greffon soit de type médullaire ou de type CSP en cas de donneur non apparenté. Ainsi, il n'est peut-être pas plus légitime d'opter pour un greffon de type CSP plutôt que médullaire lorsqu'on a le choix. De plus, cette étude rapporte davantage de GVHc extensive pour les patients ayant reçu un greffon de type CSP, à noter que le taux de rechute était similaire que les patients aient reçu des CSP ou de la moelle. Or, cette GVHc extensive a un impact sur la qualité de vie. D'autre part, certains donneurs volontaires refusent l'administration de facteurs de croissance hématopoïétiques ou présentent des contre-indications notamment cardiovasculaires à leur administration. Ainsi, la moelle osseuse conserve toute sa place comme source de CSH allogéniques. Il est donc important d'essayer d'optimiser la qualité de ce type de greffon et notamment d'établir une dose de CD34+, reflétant la quantité de CSH optimale.

1) Impact de la composition cellulaire du greffon

A) Composition du greffon

La quantité médiane de CNT injectée dans notre étude est conforme à ce qui est décrit dans la littérature. En effet, nous rapportons une dose médiane de CNT de 2.12×10^8 /kg (0.53-10.3) alors que d'autres études rapportent une quantité de CNT médiane de 2.34×10^8 /kg (4.33×10^6 - 9.56×10^8) (56) ou de 3.65×10^8 /kg(65).

La quantité médiane de CD34+ injectée dans notre étude de 2.72×10^6 /kg(0.99-16.92) est conforme à la quantité médiane de CD34+ médullaire rapportée par l'EBMT de $2-3 \times 10^6$ /kg.

Enfin, la quantité médiane de CD3+ injectée dans notre étude est de 2.54×10^7 /kg (1.09-9.61), ce qui est conforme à la quantité médiane de CD3+ médullaire rapportée par l'EBMT de $2-2.5 \times 10^7$ /kg.

En analyse multivariée, l'observation, que la quantité de CNT ou de CD34+ n'a pas d'incidence sur la survie, peut être expliquée par le fait que notre étude est biaisée car, on prescrit une dose de CNT de 3×10^8 /kg. En cas de greffon trop pauvre en CNT, nous sommes amenés à demander, si possible, au donneur de redonner en CSP. Notamment, un des patients exclus de cette étude avait reçu seulement 0.28×10^8 /kg CNT et a été greffé rapidement (J7 post greffe) avec des CSP.

B) CNT

Actuellement, la prescription de réinjection d'un greffon médullaire est faite en nombre de CNT/kg.

La comparaison à d'autres études(56,65,66) est difficile, puisque les seuils de CNT/kg sont à chaque fois variables. Ainsi, Sierra et al étudiaient l'impact d'une dose de CNT inférieure ou supérieure à 3.65×10^8 /kg et Dominiotto et al(66) l'impact d'une dose inférieure ou supérieure à 3.4×10^8 /kg or notre seuil maximum (Q3) comparait une dose de CNT inférieure ou supérieure à 3.015×10^8 /kg. Ainsi, ce seuil est donc plus faible et contrairement à ces 2 études, nous n'observons pas de différence en terme de reconstitution hématopoïétique, de survie et de GVH.

Collins et al(56), comparaient l'impact d'une dose de CNT/kg supérieure ou inférieure à 2.34×10^8 /kg et comme nous, ils n'observaient pas de différence significative pour la reconstitution hématopoïétique ni pour la survenue de GVH ni pour la survie globale. Leur seuil de comparaison de CNT (2.34×10^8 /Kg) est proche de notre médiane de CNT (2.12×10^8 /kg) ainsi, il est logique d'observer des résultats comparables aux mêmes seuils de comparaison.

Une quantité de CNT/kg supérieure à 2.12×10^8 /kg permet de diminuer le risque d'infections fongiques ($p=0.0412$), mais conduit à plus de MAT ($p=0.0412$).

Les quantités les plus élevées de CNT/kg (3.105×10^8 CNT/kg) sont obtenues en cas de donneurs significativement plus jeunes ($p=0.0126$), ceci peut être expliqué par le fait, que le volume de moelle prélevée peut être plus important chez les plus jeunes, puisque l'anesthésie générale peut être plus longue.

Il est important de rappeler, qu'en cas de désérythrocytation les cellules nucléées totales correspondent aux cellules mononucléées puisque la séparation par gradient de densité, permet de séparer les cellules d'intérêts correspondant à des cellules mononucléées des globules rouges que l'on souhaite soustraire. Ainsi, en cas de greffon médullaire désérythrocyté, il ne faut pas employer le terme de cellules nucléées totales mais de cellules mononucléées.

C) CD34+

Contrairement à l'autogreffe et l'allogreffe de CSP, en allogreffe de moelle il n'y a pas de consensus sur une dose de CD34+ optimale. Les différentes études (56,69,70,73) étudiant l'impact des doses de CD34+ sur la survie, la reconstitution hématopoïétique et la survenue de complications comparent des seuils variables de CD34+.

En terme de survie globale, de survie sans maladie, de reconstitution hématopoïétique et de GVH nous n'observons pas de différence selon les différents seuils de quantité de CD34+ testés : 1.93×10^6 , 2.7×10^6 , et 3.47×10^6 CD34+/kg. Ces résultats sont similaires à ceux observés par Collins et al(56) qui testaient un seuil de 3.62×10^6 CD34+/kg. Cette étude ne comportait que des greffes non apparentées alors que notre étude comporte des greffes apparentées et non apparentées.

En revanche Bittencourt et al(71), Mavroudis et al(69) et Morariu-Zamfir et al (70)rapportent une meilleure survie et une moindre TRM en cas de quantité de CD34+ supérieure à des seuils variables : 1×10^6 , 3.12×10^6 et 3×10^6 CD34+/kg respectivement. Il est important de noter que ces 3 études comportaient uniquement des greffes apparentées.

Comme Bittencourt et al(71), nous observons davantage d'infections fongiques en cas de greffon comportant moins de CD34+. Nous observons également significativement plus d'infections bactériennes en cas de greffon contenant moins de 1.93×10^6 CD34+/kg ou moins de 3.47×10^6 CD34+/kg. ($p=0.0169$ et $p=0.0475$ respectivement)

A notre connaissance, aucune équipe ne s'était intéressée à l'impact de la quantité de CD34+ greffées et la survenue de pathologies de l'endothélium. Nous observons davantage de MVO en cas de greffon comportant plus de 3.47×10^6 CD34+/kg ($p=0.0119$). On peut penser, que l'atmosphère cytokinique plus intense, liée à la prise de greffe, en cas de greffon comportant plus de CD34+/kg, peut être responsable de dommages sur l'endothélium. Cependant, mais sous réserve que seulement 2% des patients ont présenté un syndrome de prise de greffe, nous n'observons pas de différence en terme de survenue de syndrome de prise de greffe liée à une dose importante de CD34+/kg. On observe, pour le même seuil de 3.47×10^6 CD34+/kg, significativement, moins d'infections bactériennes et fongiques ($p=0.0475$ et $p=0.0436$ respectivement). Il est donc important de faire une synthèse du retentissement de l'ensemble des complications et c'est l'étude de la survie globale qui permet de faire cette synthèse. Ainsi, en terme de survie globale aucun seuil de CD34+ testé ne permet de montrer une différence significative.

Dans cette étude, la quantification des CD34+ est réalisée en double plateforme. Or dans ce cas, la précision de la numération des CD34+ est dépendante de la numération des CNT. Rappelons que la moelle est riche en graisse or, lors de son analyse par l'hématimètre les particules lipidiques sont confondues avec des événements cellulaires dans les 2 canaux de mesures des leucocytes. Ainsi, il y a une surestimation du nombre de CNT(74).

De plus, la double plateforme présente l'inconvénient de 2 mesures successives avec risque de cumulation de biais. En effet, Piedras-Ross et al(75) ont montré que la quantification des CD34+ en simple plateforme est significativement différente par rapport à la double plateforme, avec au final une quantité mesurée de CD34+ moindre en simple plateforme par rapport à la double plateforme. Actuellement, il est recommandé de réaliser une numération des CD34+ en simple plateforme, afin de diminuer les risques d'erreur intra-laboratoire et également inter-laboratoire (76).

Au CHU de Nancy, en 2013 la numération des CD34+ est maintenant réalisée en simple plateforme grâce au kit Stem Cell Enumération™ de BD.

De façon usuelle, la quantité de CD34+ est rapportée au poids du receveur. Or pour être plus juste il faudrait rapporter cette quantité au poids théorique du receveur. En effet, dans notre étude les greffons qui sont les plus pauvres en CNT et en CD34+ sont aussi ceux pour lesquels le poids du receveur est le plus élevé. Les greffons contenant moins de 1.93×10^6 CD34+/kg correspondent à une moyenne de poids chez les receveurs de 74kg contre 51 kg pour les greffons de plus de 1.93×10^6 CD34+/kg. Les greffons les plus riches en CD34+ (supérieure à 3.47×10^6 /kg) ont été reçus par des receveurs dont le poids moyen était de 39kg.

Pour évaluer les CSH, ne tenir compte que de la présence ou non du marqueur CD34+ est approximatif. En effet, il y a différents sous-types parmi les cellules CD34+. En particulier, il a été étudié des sous-fractions de cellules CD34+ telles que les cellules CD34+CD38- et les cellules CD34+HLADR-. Rusten et al(48) ont montré que les cellules CD34+CD38- sont la sous-classe de CD34+ contenant le plus de progéniteurs les plus primitifs et de LTC-IC et ainsi contribuant le plus à la reconstitution hématopoïétique à long terme. Les cellules CD34+HLA-DR- comprennent plutôt des progéniteurs déjà orientés vers la différenciation érythroïde. Ainsi, nous ne connaissons pas dans notre étude la composition en sous-types de CD34+ et il serait peut être intéressant d'étudier l'impact de CD34+CD38- et non simplement de CD34+. A noter, que Collins et al(56) ont étudié l'impact de la dose de CD34+CD38-, ils ne relevaient pas de différence en terme de survie, de reconstitution hématopoïétique et de survenue de GVH, que le greffon comporte plus ou moins de 9.44×10^4 CD34+CD38-/kg.

Ici, nous n'avons étudié qu'une quantité de CD34+ viable or ce qui importe le plus c'est la qualité de ces CD34+. Ainsi, il faudrait également prendre en compte par exemple le pouvoir de clonogénécité de CD34+ qui permet de refléter leur capacité à donner des CFU-GM.

Le greffon comporte également d'autres cellules dont nous n'avons pas tenu compte et qui peuvent interférer dans la reconstitution hématopoïétique, et la survenue de complications après la greffe. On peut citer les cellules souches mésenchymateuses (MSC) et les cellules NK.

D'autre part, il est important de ne pas négliger le fait que le greffon ira s'installer dans une niche hématopoïétique dont la structure et la composition cellulaire varient d'un individu à l'autre. Dans notre étude, nous ne nous intéressons pas à cette niche, alors qu'elle peut elle aussi avoir un impact sur la reconstitution hématopoïétique. En effet, la structure de la niche symétrique ou asymétrique et sa composition cytokinique influencent l'orientation des CSH vers la différenciation ou vers le maintien du caractère souche. Par exemple, en cas de prédominance de l'orientation structurelle et cytokinique de la niche vers la différenciation, les CSH du greffon s'engageront vers l'hématopoïèse, permettant la reconstitution hématopoïétique et ainsi la sortie d'aplasie et la reconstitution immunitaire. En cas de prédominance d'une structure symétrique ou de prédominance des facteurs d'ancrage dans la niche, les CSH resteront quiescentes ou s'orienteront vers des divisions symétriques permettant de maintenir le pool de CSH. Dans ce cas, la sortie d'aplasie et la reconstitution immunitaire peuvent être retardées et on observera davantage d'infections.

Pour observer des différences de survie et de reconstitution hématopoïétique les seuils utilisés ne sont peut-être pas optimaux, il faudrait réaliser une analyse statistique de recherche de seuil, à partir duquel la dose cellulaire influence le devenir post-allogreffe.

Les quantités de CD34+/kg les plus importantes (supérieures à 3.47×10^6 /kg) sont obtenues avec des donneurs significativement plus jeunes ($p=0.0005$). Ce qui peut être expliqué par la possibilité de prélever un volume de moelle plus important en cas de donneur jeune.

D) CFU-GM

Les CFU-GM reflètent la présence de progéniteurs granulocytaires et macrophagiques. Or ce sont les granuleux qui sont associés à la défense anti bactérienne. Ainsi, nous observons en analyse multivariée et pour les tests de seuils, qu'une dose faible de CFU-GM est associée à plus d'infections bactériennes.

Dans notre étude, la quantité de CFU-GM n'a pas d'impact significatif sur la reconstitution hématopoïétique. Ceci est peut être lié à une anomalie au cours de la réalisation des CFU-GM. Pour s'assurer de la qualité de la réalisation des CFU-GM on peut contrôler la clonogénicité correspondant au rapport du nombre de CFU-GM au nombre de CD34+. Ceci permet de s'assurer de la qualité de la réalisation des CFU-GM ainsi sur moelle fraiche la clonogénicité est de 30 à 50%.

$$\frac{\text{Nombre de CFU-GM}}{\text{Nombre de CD34+}} \times 100$$

Or, notre moyenne de clonogénicité est de 24.4 %(+/-21.6) ce qui est inférieure à la valeur cible de clonogénicité à atteindre.

Il faut noter que la quantification des CFU-GM ne peut pas être obtenue au moment de la greffe. En effet, il faut 14 jours pour obtenir ce résultat. Nous avons montré qu'une quantité de CFU-GM inférieure à 53.45×10^4 /kg est un facteur de risque de GVHc ($p=0.0376$). Il pourrait être intéressant de modifier la prophylaxie de la GVH en cas de greffon pauvre en CFU-GM.

E) CD3+

De façon surprenante, nous n'observons pas de différence de survenue de GVHa quel que soit le seuil testé de dose de CD3+/kg. Or, on sait que la physiopathologie de la GVHa implique principalement les lymphocytes T. De même, on pouvait penser, qu'une quantité plus importante de CD3+/kg aurait conduit à moins d'infections virales, puisque la défense immunitaire anti virale implique en priorité les lymphocytes CD3. L'absence d'impact de la quantité de CD3+ sur la survenue, de GVHa et d'infections virales peut être liée au fait que les greffons médullaires comportent environ 10 fois moins de CD3+ qu'un greffon de type CSP.

A la différence des greffons de type CSP, la quantité des CD3+ injectées n'a pas d'impact significatif sur la survenue d'une GVHc. Ceci est lié au fait, que les greffons de type CSP sont obtenus après administration de GCSF ce qui induit une polarisation TH2 qui favorise la GVH chronique. Les greffons médullaires n'ont pas été influencé en terme de polarisation TH1 ou TH2.

Nous observons un lien entre la quantité de CD3+/kg contenue dans le greffon et la survenue de MVO, ce lien n'est statistiquement significatif qu'en cas de greffon comportant plus de 2.015×10^7 CD3/kg ($p=0.0424$). Ce lien était attendu puisque qu'une étude (77) rapporte une diminution de la survenue de MVO en cas de T déplétion.

Une quantité de CD3+ supérieure à $3.3 \times 10^7/\text{kg}$ permet de diminuer significativement le risque de survenue d'infections fongiques ($p=0.0087$). Dans notre étude, le délai médian de survenue d'infections fongiques est de 6.4 mois or, après la greffe il y a 2 périodes de risque d'infections fongiques, une période précoce avant J30 et une période tardive après J100. Les infections fongiques, survenant tardivement sont plutôt liées à un défaut de l'immunité cellulaire spécifique et donc des lymphocytes T mémoires. Ces lymphocytes T mémoires sont en partie composés de l'expansion des lymphocytes mémoires contenus dans le greffon.

II) Impact des manipulations

Un greffon de type médullaire sera le plus souvent manipulé avant réinjection. En effet, des manipulations de désérythrocytation, en cas d'incompatibilité majeure, ou de déplasmatisation, en cas d'incompatibilité mineure, ou de réduction de volume sont réalisées. Dans notre étude, 96% des moelles ont été manipulés. Il est donc important d'apprécier l'impact de ces manipulations.

Nous avons montré que la quantité de CNT/kg du greffon est significativement ($p<0.0001$) moindre en cas de désérythrocytation. Ceci est en partie lié au fait que la désérythrocytation consiste en une séparation des leucocytes par gradient de densité. Ainsi, après désérythrocytation, les cellules nucléées totales correspondent aux cellules mononucléées et ne contiennent plus de polynucléaires. Alors, qu'en absence de désérythrocytation, les CNT restantes après manipulation comprennent toutes les cellules nucléées, y compris, les polynucléaires.

Comme Collins et al(56), nous observons un rendement de CD34+ significativement moins bon, après désérythrocytation par rapport à la déplasmatisation ou à la réduction de volume. ($p<0.0001$).

Ainsi, il semble plus rigoureux en cas de désérythrocytation de recommander une quantité de CD34+ plutôt qu'une quantité de CNT.

D'autre part, comme Larghero et al(78), Braine et al(55), et Rowley et al(79), nous n'observons pas de retentissement sur la reconstitution hématopoïétique après désérythrocytation.

En cas de déplasmatisation, par rapport à la désérythrocytation ou à la réduction de volume, on observe significativement plus de MAT ($p=0.0307$).

III) Impact du conditionnement

De manière surprenante, avoir reçu un conditionnement RIC augmente le risque de ne pas atteindre le seuil de 0.5G/L PNN à J30. Ceci peut être lié au fait que dans notre étude, parmi les RIC le conditionnement le plus fréquent est l'association fludarabine/melphalan. Or cette association est considérée d'intensité intermédiaire et non *stricto sensu* d'intensité réduite.

Dans notre étude, l'injection de SAL n'a pas d'impact significatif sur la survenue d'infections notamment virale. Ceci peut être expliqué par le fait que la majorité (65%) des patients ayant reçu du SAL ont reçu des quantités dites faibles (<40mg/kg au total) et peut être insuffisantes pour observer un impact en terme de survenue d'infections.

IV) Impact des caractéristiques du receveur et du donneur

Concernant la survenue de GVHa, l'âge jeune du receveur est un facteur de risque de GVHa ($p=0.0198$). Ceci est peut être lié au fait que les patients jeunes reçoivent plutôt des conditionnements myéloablatifs. En effet, dans notre étude la moyenne d'âge des patients recevant un conditionnement myéloablatif est de 24 ans contre 30 ans pour les RIC. En effet, les conditionnements myéloablatifs conduisent à plus de dommages tissulaires et ainsi favorise la mise en place d'une atmosphère inflammatoire propice au développement d'une réaction de GVHa.

En n'étudiant, que des greffons médullaires, il était attendu d'observer une population plus jeune, car on utilise plus volontiers des greffons médullaires chez les enfants, en raison du risque moindre de GVHc en comparaison avec un greffon de type CSP. De plus, les greffons de type CSP sont plutôt utilisés en cas de conditionnement d'intensité réduite qui sont le plus souvent préconisés chez une population de receveurs plus âgés.

Notre étude comporte des donneurs apparentés et non apparentés. Or l'analyse multivariée prend en compte le caractère apparenté ou non ce qui permet d'apprécier indépendamment l'impact de la composition cellulaire.

V) Proposition d'un logigramme de prescription

Dans la prescription du greffon médullaire il faut distinguer 2 étapes : la prescription de la dose à prélever et la prescription de la dose à réinjecter.

Pour ce qui est de la dose à prélever, en 2013 avec l'importance du principe de qualité en allogreffe avec notamment JACIE, il peut sembler désuet de prescrire en CNT les greffons médullaires. Ceci, puisqu'on dispose par la prescription en CD34+ d'une appréciation plus fine des CSH et plus standardisée de part les recommandations internationales de mesure des CD34+ en simple plateforme et selon ISHAGE. Cependant, la prescription en CNT reste valable pour estimer la quantité de moelle à prélever chez le receveur. En effet, n'oublions pas que l'obtention d'un greffon médullaire nécessite une anesthésie générale et que la sécurité du donneur est primordiale. Ainsi, il n'est pas légitime de prolonger une anesthésie générale dans l'attente d'un résultat de CD34+ plus long à obtenir qu'un résultat de CNT. Ceci d'autant que le paramètre CNT donne les mêmes résultats en terme de risque d'infections bactériennes et fongiques que la mesure des CD34+.

Cependant pour ce qui est de la dose à réinjecter, en cas de source médullaire de greffon, la manipulation du greffon est quasiment toujours nécessaires soit en raison d'une incompatibilité de groupe ABO soit pour réduire le volume avant

réinjection. Or comme nous l'avons montré, en cas de désérythrocytation il est plus rigoureux de prescrire une dose de CD34+/kg plutôt qu'une dose de CNT/kg.

Ainsi nous proposons en fonction du type d'incompatibilité de groupe ABO, les modalités de prescription suivantes (Figure 33) :

-en cas d'incompatibilité de groupe ABO majeure ou complexe

Pour la prescription de réinjection, on peut prendre pour objectif une dose de CD34+/kg de plus de $3.47 \times 10^6/\text{kg}$ permettant de diminuer le risque d'infections fongiques et bactériennes.

Nous avons un rendement après désérythrocytation de 71.8% pour les CD34+, ce qui pour obtenir $3.47 \times 10^6/\text{kg}$ après manipulation, nécessite une quantité de $4.83 \times 10^6/\text{kg}$ avant manipulation. Or, au moment du prélèvement, on doit prescrire en CNT pour des raisons logistiques. Nous avons montré un lien significatif entre la quantité de CNT et de CD34+ et dans notre étude, la quantité de CD34+ initiales représente 1.14% des CNT initiales. Ainsi, pour obtenir $4.83 \times 10^6/\text{kg}$ CD34+ il faut prélever au moins 4.24×10^8 CNT/kg.

-en cas d'incompatibilité de groupe ABO mineure

Pour la prescription de réinjection, on peut proposer un objectif de CNT/kg de 3.015×10^8 permettant une protection contre les infections bactériennes et fongiques.

Nous avons un rendement de CNT après déplasmatisation de 81.8 %. Ainsi, pour obtenir 3.015×10^8 CNT/kg au final, il faut prélever au moins 3.69×10^8 CNT/kg.

-en absence d'incompatibilité de groupe ABO

Pour la prescription de réinjection, on peut proposer un objectif de CNT/kg de 3.015×10^8 permettant une protection contre les infections bactériennes et fongiques.

Nous avons un rendement après réduction de volume de 88.2%. Ainsi, pour obtenir 3.015×10^8 CNT/kg au final, il faut prélever au moins 3.42×10^8 CNT/kg.

Cette proposition devra être adaptée aux caractéristiques des donneurs disponibles. Ainsi, si on doit choisir entre plusieurs donneurs ayant une incompatibilité de groupe ABO majeure ou complexe, on choisira le donneur chez qui on pourra prélever le volume le plus important de moelle.

Il est important de relever que les manipulations du greffon médullaire ne conduisent pas à un impact en terme de survie globale à 5 ans et de survie sans maladie à 5 ans. Ainsi, dans la procédure de choix d'un donneur, l'incompatibilité de groupe ABO ne devrait pas conduire à réfuter un donneur. En effet, Anasetti et al(80) recommandent de ne pas préférer des CSP à la moelle pour des raisons d'incompatibilité ABO.

Conclusion

En analyse multivariée, le seul paramètre ayant un impact négatif significatif sur la survie globale et la survie sans maladie à 5 ans est l'âge élevé du receveur.

Concernant, la reconstitution hématopoïétique, la faible quantité de CNT/kg dans le greffon est un facteur de risque significatif ($p=0.0482$) pour les patients reconstituants le plus lentement les PNN et les plaquettes. La reconstitution hématopoïétique n'est pas liée significativement à la dose de CD34+, de CFU-GM ou de CD3+.

En analyse univariée, une quantité de CD34+ faible est un facteur de risque significatif de survenue d'infections bactériennes et fongiques ($p=0.0025$ et $p=0.0102$ respectivement). On note, qu'une quantité de CD34+ supérieure à $3.47 \times 10^6/\text{kg}$ est significativement protectrice de survenue d'infections bactériennes et fongiques alors, qu'elle conduit à plus de MVO. ($p=0.0475$, $p=0.0436$ et $p=0.0119$ respectivement). Un seuil de CD34+/kg supérieure à 2.7×10^6 diminue significativement le risque d'infections fongiques ($p=0.0095$). En revanche, les différentes doses de CD34+/kg reçues par les patients de cette étude, ne se traduisent pas par des différences en terme de reconstitution hématopoïétique, de survie globale à 5 ans et de survie sans rechute à 5 ans. Cependant, la survie globale n'est pas le seul paramètre à prendre en compte, il faut aussi apprécier la qualité de vie. Il est évident qu'en ayant moins d'infections bactériennes ou fongiques, la qualité de vie des patients sera meilleure.

De la même manière, en analyse univariée, une quantité de CNT/kg supérieure à 3.015×10^8 protègent des infections bactériennes ($p=0.0307$). Et une quantité de CNT/kg supérieure à 2.12×10^8 protègent des infections fongiques ($p=0.0412$).

Nous proposons une recommandation de prélèvement de CNT/kg initiale de plus de 4.24×10^8 en cas d'incompatibilité de groupe ABO majeure ou complexe, de plus de 3.69×10^8 en cas d'incompatibilité de groupe ABO mineure et de plus de 3.42×10^8 en l'absence d'incompatibilité de groupe ABO. (Figure 33)

Nous proposons une recommandation de réinjection de CD34+/kg de plus de 3.47×10^6 en cas d'incompatibilité de groupe ABO majeure ou en l'absence d'incompatibilité de groupe ABO de plus de 3.015×10^8 CNT/kg. (Figure 33)

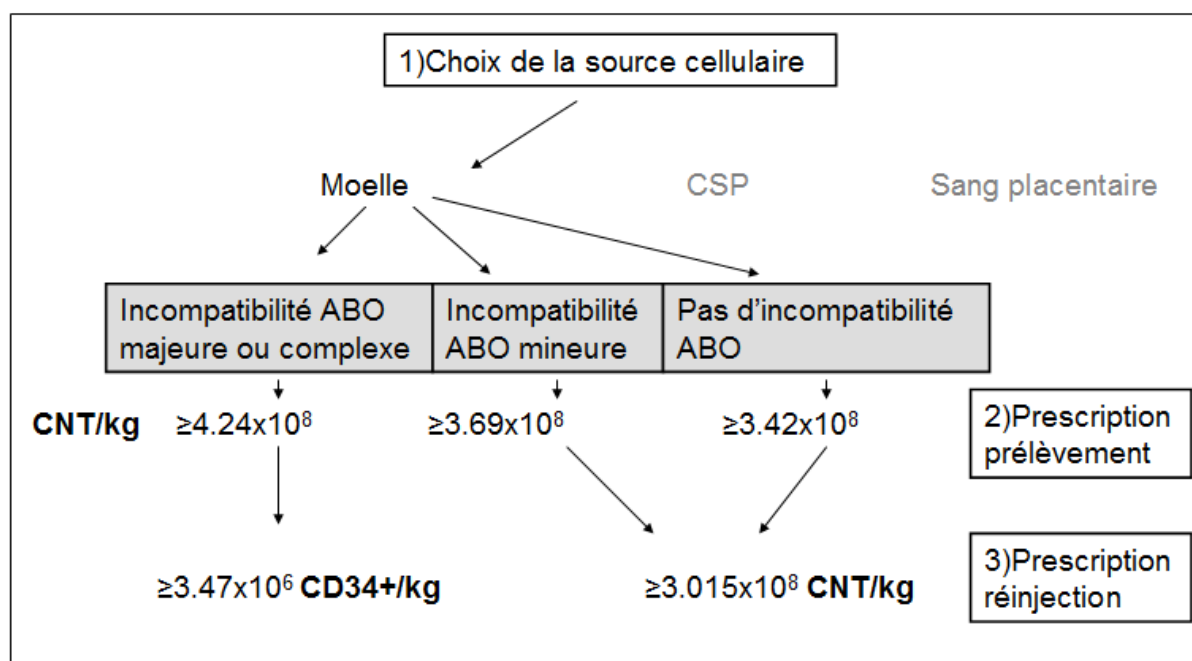


Figure 33 : Proposition prescription quantité cellulaire médullaire en allogreffe

Perspectives

Il faudra mettre en place une étude prospective, prenant en compte les différents sous types de CD34+ et, notamment l'impact des cellules CD34+CD38- correspondants aux cellules les plus immatures, et prenant en compte l'implication des autres composants cellulaires telles que les cellules NK et les MSC. Il serait alors intéressant d'établir un seuil critique de CD34+CD38-, qui aurait un retentissement sur la survie globale. N'oublions pas, cependant, que d'un point de vue éthique et logistique, il n'est pas possible d'augmenter, à chaque fois, cette quantité de cellules CD34+CD38-. En revanche, il serait possible à *posteriori* en cas de dose faible de cellules CD34+CD38- de mettre en place une prise en charge différente du malade en renforçant par exemple les prophylaxies anti-infectieuses, de la GVH, ou des pathologies endothéliales.

Depuis un an, l'évaluation des CD34+ est réalisée en simple plateforme, il faudra donc réévaluer l'impact de cette dose de CD34+, avec ce nouveau mode de mesure.

L'absence de différence en terme de survie globale, liée aux différentes doses de CNT/kg, de CD34+/kg et de CD3+/kg, devrait nous conduire, en cas de greffe pour une pathologie maligne à congeler systématiquement des cellules, en vue de réaliser des DLI. Dans cette étude, seulement 30% des patients ont eu des congélations de cellules. Or, il est évident que posséder des DLI congelées permet, si une injection de DLI est envisagée, et notamment en cas de donneur non apparenté, de gagner du temps et d'éviter toutes les démarches administratives accompagnant un second recrutement du donneur.

Annexes

- Annexe 1 : Score de risque EBMT

Facteur de risque	Points
Âge du patient en année	
<20	0
20-40	1
>40	2
Stade de la pathologie¹	
Précoce	0
Intermédiaire	1
Tardive	2
Délais diagnostic-greffe en mois²	
<12	0
>12	1
Type de donneur	
Apparenté	0
Non apparenté, autres	1
Combinaison sexe donneur/receveur	
Tous les autres cas	0
Donneur femme, receveur homme	1
Non totalement validé	
Receveur CMV seropositif	1
Score de performans de Karnofsky >3	1
Score de comorbidité >3	1
Surcharge en fer	1
Pour les donneurs non apparenté	
HLA matching ≥10/10	-1
Haplotype fréquent/haute probabilité de trouver donneur	-1

¹Pas applicable pour aplasie. ²pas applicable pour patient en RC1.

D'après EBMT handbook : Haematopoietic Stem Cell Transplantation, édition 2012(12).

- Annexe 2 : Quantification des cellules CD34+ en cytométrie : fenêtrage ISHAGE

D'après Sutherland et al (51).

Tube CD34+

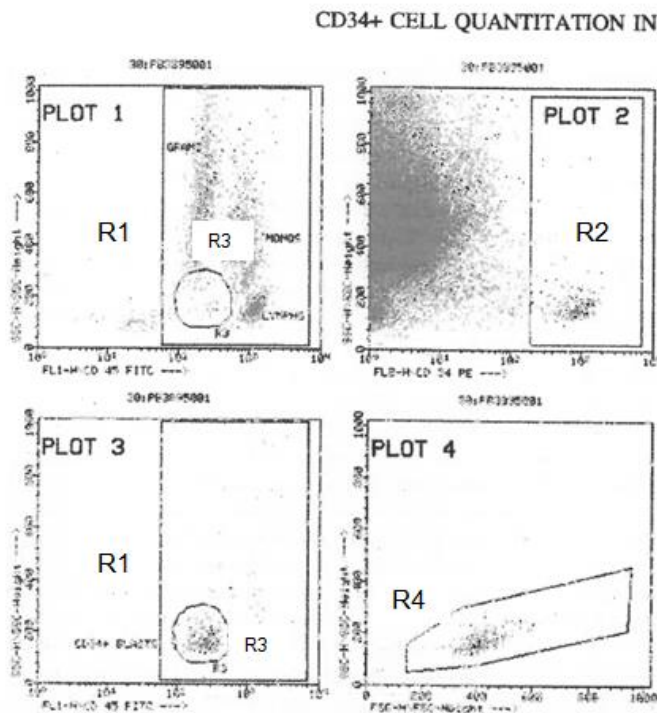


FIG. 1. Enumeration of CD34+ cells in apheresis sample cells using CD45 FITC/CD34 PE. Precise details of gating strategy are described in the text.

Tube CD34+ : Acquisition de tube sang total avec anticorps anti-CD45 FITC et anticorps anti-CD34 PE

SSC correspond à right angle scatter soit à la granularité cellulaire.

FSC correspond à forward angle scatter soit à la taille cellulaire.

PLOT1 : CD45 en abscisse et SSC en ordonnée. L'ensemble des cellules sanguines est analysé.

R1 correspond aux événements CD45+

PLOT2 : CD34 en abscisse et SSC en ordonnée. On n'analyse que les cellules de R1 (CD45+).

R2 correspond aux cellules CD45+CD34+.

PLOT3 : CD45 en abscisse et SSC en ordonnée. On n'analyse que les cellules R2, soit R1∩R2(CD45+CD34+).

R3 correspond aux cellules faiblement granuleuses et faiblement à intermédiaire CD45. Cela permet d'éliminer les événements non spécifiques (débris, agrégats plaquette...)

PLOT4 : FSC en abscisse et SSC en ordonnées. On n'analyse que les cellules R3, soit R1∩R2∩R3 (CD45+CD34+ sans débris).

R4 correspond aux cellules CD45+CD34+ sans débris légèrement plus grandes que les petits lymphocytes et de granularité homogène.

Tube isotype

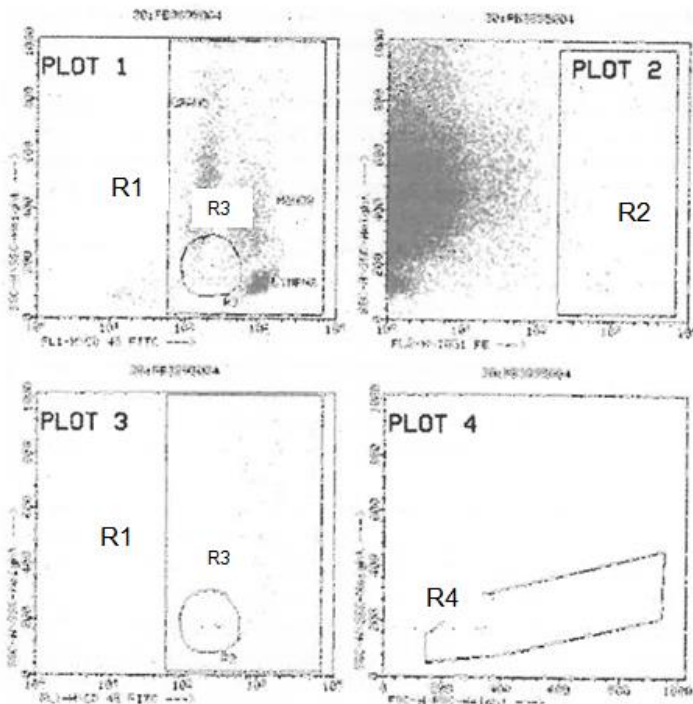


FIG. 2. Enumeration of events from apheresis sample stained by CD45 FITC/Isotype IgG1 PE. Identical gating regions to those shown in Figure 1 were used to analyze the staining of the same apheresis sample with the control reagents.

Tube isotype : Acquisition de tube sang total avec anticorps anti-CD45 FITC et anticorps isotype contrôle IgG1 PE

SSC correspond à right angle scatter soit à la granularité cellulaire.

FSC correspond à forward angle scatter soit à la taille cellulaire.

PLOT1 : CD45 en abscisse et SSC en ordonnée. L'ensemble des cellules sanguines est analysée.

R1 correspond aux événements CD45+

PLOT2 : CD34 en abscisse et SSC en ordonnée. On n'analyse que les cellules de R1 (CD45+).

R2 correspond aux cellules CD45+CD34+.

PLOT3 : CD45 en abscisse et SSC en ordonnée. On n'analyse que les cellules R2, soit R1∩R2(CD45+CD34+).

R3 correspond aux cellules faiblement granuleuses et faiblement à intermédiaire CD45. Cela permet d'éliminer les événements non spécifiques (débris, agrégats plaquette...)

PLOT4 : FSC en abscisse et SSC en ordonnées. On n'analyse que les cellules R3, soit R1∩R2∩R3 (CD45+CD34+ sans débris).

R4 correspond aux cellules CD45+CD34+ sans débris légèrement plus grandes que les petits lymphocytes et de granularité homogène. Ces événements du tube isotype contenus dans R4 sont à déduire du nombre d'événements obtenus dans R4 tube CD34+.

Le pourcentage de CD34+ correspond au nombre d'événement dans R4 tube CD34 rapporté au nombre d'événements CD45+ du tube CD34 moins le nombre d'événement dans R4 tube isotype rapporté au nombre d'événements CD45+ tube isotype.

$$\% \text{ CD34} = \frac{\text{Nombre événements R4 tube CD34} - \text{Nombre événements R4 tube isotype}}{\text{Nombre événements CD45 dans tube CD34} - \text{Nombre événements CD45 dans tube isotype}}$$

Le nombre absolu de CD34+ correspond au pourcentage de CD34+ multiplié par le nombre de cellules nucléées totales obtenues par l'automate à hémogramme.

Nombre absolu de CD34+ = %CD34 x CNT

• Annexe 3 : Logigramme procédés moelles

Procédés moelles		
Etapes	Commentaires	Documents référents
<pre> graph TD A[Demande de greffe +/- demande de prélèvement (si donneur familial)] --> B[Prélèvement (seulement en cas de donneur familial)] B --> C[Réception par UTCT] C --> D[Incompatibilité érythrocytaire] D --> E[majeure] D --> F[mineure] D --> G[aucune] E --> H[Contrôle qualité] F --> H G --> H H --> I[Vol GR < 90ml] H --> J[Vol GR > 90ml] H --> K[Déplasmatisation] H --> L["+/- réduction de volume"] I --> M[Séparation par gradient de densité] M --> N[Contrôle qualité] J --> O[Buffy coat] O --> P[Contrôle qualité] K --> Q[Contrôle qualité] L --> R[Contrôle qualité] </pre>	- Transcription du RV sur l'agenda - Validation de l'ordonnance par le responsable Production -Vérification et contrôle des documents nécessaire (sérologie receveur et donneur, aptitude du donneur si DVMO et comptabilité ABO) Demande de greffe + demande de prélèvement (en situation familiale) -Prélèvement -Prise en charge du produit par l'UTCT si prélèvement réalisé sur Nancy transfert de la poche dans une glacière isotherme dès la fin du prélèvement par une technicienne de l'UTCT si prélèvement réalisé dans un centre extérieur transport par coordinatrice de greffe documents France greffe de moëlle Service hématologie-biologie Numération CNT Service bactériologie Service UTCT : CFU	-Dossier procédé désérythrocytation -Dossier procédés déplasmatisation -Dossier procédé réduction de volume

- Annexe 4 : Définitions des infections

Infections fongiques invasives

Candidose disséminées : signe clinique ou radiologique d'infection fongique et une ou plusieurs hémocultures positives à candida.

Aspergilloses invasives :

Selon les critères de l'EORTC "European Organization for Research and Treatment of Cancer/Mycoses Study Group(EORTC/MSG)"

1. Aspergilloses **prouvées**: biopsie tissulaire: hyphes+culture positive

2. Aspergilloses **probables**: combinaison d'un facteur hôte + un critère clinique et un critère microbiologique

- Hôte: neutropénie, Immunosuppresseur, corticoïdes, GVH
- Clinique: signe du halo, "air-crescent", cavité dans une zone de consolidation
- Microbiologie: 2 expectorations positives ou Lavage bronco alvéolaire, galactomannan, B-D glucan

3. Aspergilloses **possibles**: 1 facteur hôte + 1 clinique

- hémoptysie, douleurs thoraciques
- signes radiologiques (cf ci-dessus+nouveaux infiltrats)
- critères microbiologiques généralement absents

Bibliographie

1. BARNES DW, CORP MJ, LOUTIT JF, NEAL FE. Treatment of murine leukaemia with X rays and homologous bone marrow; preliminary communication. *Br Med J.* 15 sept 1956;2(4993):626-627.
2. THOMAS ED, LOCHTE HL Jr, LU WC, FERREBEE JW. Intravenous infusion of bone marrow in patients receiving radiation and chemotherapy. *N Engl J Med.* 12 sept 1957;257(11):491-496.
3. Mathé G, Amiel JL, Schwarzenberg L, Cattani A, Schneider M. Adoptive immunotherapy of acute leukemia: experimental and clinical results. *Cancer Res.* oct 1965;25(9):1525-1531.
4. DAUSSET J. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol.* oct 1958;20(1-4):156-166.
5. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, 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.* 26 oct 1989;321(17):1174-1178.
6. McSweeney PA, Niederwieser D, Shizuru JA, Sandmaier BM, Molina AJ, Maloney DG, et al. Hematopoietic cell transplantation in older patients with hematologic malignancies: replacing high-dose cytotoxic therapy with graft-versus-tumor effects. *Blood.* 1 juin 2001;97(11):3390-3400.
7. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, et al. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *N Engl J Med.* 18 oct 2012;367(16):1487-1496.
8. A.Bacigalupo, A.Dominietto, C Di Grazia, T.Lamperelli, F.Gualandi,A.Ibatici,S.Greante,M.T.vanLint, R.Varaldo, M.Gobbi, A.M.Carella, A.M.Raiola. Unmanipulated haploidentical transplants compared with other alternative donors and matched sibling graft: a single centre experience in 488 patients. EBMT,London; 2013.
9. Kassim AA, Chinratanalab W, Ferrara JLM, Mineishi S. Reduced-intensity allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for acute leukemias: « what is the best recipe? » *Bone Marrow Transplant.* oct 2005;36(7):565-574.
10. Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood.* 1 févr 1990;75(3):555-562.
11. Dickinson AM, Wang X-N, Sviland L, Vyth-Dreese FA, Jackson GH, Schumacher TNM, et al. In situ dissection of the graft-versus-host activities of cytotoxic T cells specific for minor histocompatibility antigens. *Nat Med.* avr 2002;8(4):410-414.
12. Haematopoietic Stem Cell Transplantation, EBMT Handbook. 2012.

13. Filipovich AH, Weisdorf D, Pavletic S, Socie G, Wingard JR, Lee SJ, et al. National Institutes of Health consensus development project on criteria for clinical trials in chronic graft-versus-host disease: I. Diagnosis and staging working group report. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. déc 2005;11(12):945-956.
14. Ferrara JL, Cooke KR, Pan L, Krenger W. The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. *Stem Cells Dayt Ohio*. sept 1996;14(5):473-489.
15. Ferrara JLM, Reddy P. Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin Hematol*. janv 2006;43(1):3-10.
16. Sackstein R. A revision of Billingham's tenets: the central role of lymphocyte migration in acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. janv 2006;12(1 Suppl 1):2-8.
17. Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*. oct 1974;18(4):295-304.
18. Martin PJ, Rizzo JD, Wingard JR, Ballen K, Curtin PT, Cutler C, et al. First- and second-line systemic treatment of acute graft-versus-host disease: recommendations of the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. août 2012;18(8):1150-1163.
19. Martin PJ. Biology of chronic graft-versus-host disease: implications for a future therapeutic approach. *Keio J Med*. déc 2008;57(4):177-183.
20. Chu Y-W, Gress RE. Murine models of chronic graft-versus-host disease: insights and unresolved issues. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. avr 2008;14(4):365-378.
21. Bergeron A, Feuillet S, Meignin V, Socie G, Tazi A. [Late onset, non-infectious pulmonary complications after haematological stem cell transplantation]. *Rev Mal Respir*. févr 2008;25(2):173-183.
22. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, McDonald GB, Striker GE, Sale GE, et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *Am J Med*. août 1980;69(2):204-217.
23. Wolff D, Gerbitz A, Ayuk F, Kiani A, Hildebrandt GC, Vogelsang GB, et al. Consensus conference on clinical practice in chronic graft-versus-host disease (GVHD): first-line and topical treatment of chronic GVHD. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. déc 2010;16(12):1611-1628.
24. Wolff D, Schleuning M, von Harsdorf S, Bacher U, Gerbitz A, Stadler M, et al. Consensus Conference on Clinical Practice in Chronic GVHD: Second-Line Treatment of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. janv 2011;17(1):1-17.

25. Pérez-Simón JA, Encinas C, Silva F, Arcos MJ, Díez-Campelo M, Sánchez-Guijo FM, et al. Prognostic factors of chronic graft-versus-host disease following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation: the national institutes health scale plus the type of onset can predict survival rates and the duration of immunosuppressive therapy. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* oct 2008;14(10):1163-1171.
26. Peffault de Latour R, Xhaard A, Fremeaux-Bacchi V, Coppo P, Fischer AM, Helley D, et al. Successful use of eculizumab in a patient with post-transplant thrombotic microangiopathy. *Br J Haematol.* avr 2013;161(2):279-280.
27. Auletta JJ, Lazarus HM. Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. *Bone Marrow Transplant.* mai 2005;35(9):835-857.
28. Dulphy N, Haas P, Busson M, Belhadj S, Peffault de Latour R, Robin M, et al. An unusual CD56(bright) CD16(low) NK cell subset dominates the early posttransplant period following HLA-matched hematopoietic stem cell transplantation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1 août 2008;181(3):2227-2237.
29. Zlotoff DA, Zhang SL, De Obaldia ME, Hess PR, Todd SP, Logan TD, et al. Delivery of progenitors to the thymus limits T-lineage reconstitution after bone marrow transplantation. *Blood.* 18 août 2011;118(7):1962-1970.
30. Weinberg K, Blazar BR, Wagner JE, Agura E, Hill BJ, Smogorzewska M, et al. Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 1 mars 2001;97(5):1458-1466.
31. Gratwohl A, Brand R, Frassoni F, Rocha V, Niederwieser D, Reusser P, et al. Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant.* nov 2005;36(9):757-769.
32. Tomblyn M, Chiller T, Einsele H, Gress R, Sepkowitz K, Storek J, et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplantation recipients: a global perspective. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* oct 2009;15(10):1143-1238.
33. Godin IE, Garcia-Porrero JA, Coutinho A, Dieterlen-Lièvre F, Marcos MA. Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature.* 1 juill 1993;364(6432):67-70.
34. Tavian M, Biasch K, Sinka L, Vallet J, Péault B. Embryonic origin of human hematopoiesis. *Int J Dev Biol.* 2010;54(6-7):1061-1065.
35. Tavian M, Cortés F, Charbord P, Labastie MC, Péault B. Emergence of the haematopoietic system in the human embryo and fetus. *Haematologica.* juin 1999;84 Suppl EHA-4:1-3.

36. BECKER AJ, McCULLOCH EA, TILL JE. Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells. *Nature*. 2 févr 1963;197:452-454.
37. LEWIS JP, TROBAUGH FE Jr. HAEMATOPOIETIC STEM CELLS. *Nature*. 7 nov 1964;204:589-590.
38. Lewis JP, Passovoy M, Freeman M, Trobaugh FE Jr. The repopulating potential and differentiation capacity of hematopoietic stem cells from the blood and bone marrow of normal mice. *J Cell Physiol*. avr 1968;71(2):121-132.
39. MCCULLOCH EA, TILL JE. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat Res*. juill 1960;13:115-125.
40. Purton LE, Scadden DT. Limiting factors in murine hematopoietic stem cell assays. *Cell Stem Cell*. 13 sept 2007;1(3):263-270.
41. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science*. 1 juill 1988;241(4861):58-62.
42. Uchida N, Weissman IL. Searching for hematopoietic stem cells: evidence that Thy-1.1lo Lin- Sca-1+ cells are the only stem cells in C57BL/Ka-Thy-1.1 bone marrow. *J Exp Med*. 1 janv 1992;175(1):175-184.
43. Ikuta K, Weissman IL. Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 févr 1992;89(4):1502-1506.
44. Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 12 juill 1996;273(5272):242-245.
45. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med*. 1 avr 1996;183(4):1797-1806.
46. Civin CI, Strauss LC, Brovall C, Fackler MJ, Schwartz JF, Shaper JH. Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J Immunol Baltim Md* 1950. juill 1984;133(1):157-165.
47. Civin CI. CD34 stem cell stories and lessons from the CD34 wars: the Landsteiner Lecture 2009. *Transfusion (Paris)*. sept 2010;50(9):2046-2056.
48. Rusten LS, Jacobsen SE, Kaalhus O, Veiby OP, Funderud S, Smeland EB. Functional differences between CD38- and DR- subfractions of CD34+ bone marrow cells. *Blood*. 1 sept 1994;84(5):1473-1481.

49. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1 janv 1996;87(1):1-13.
50. Fackler MJ, Krause DS, Smith OM, Civin CI, May WS. Full-length but not truncated CD34 inhibits hematopoietic cell differentiation of M1 cells. *Blood*. 1 juin 1995;85(11):3040-3047.
51. Sutherland DR, Anderson L, Keeney M, Nayar R, Chin-Yee I. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering. J Hematother*. juin 1996;5(3):213-226.
52. Shiozawa Y, Havens AM, Pienta KJ, Taichman RS. The bone marrow niche: habitat to hematopoietic and mesenchymal stem cells, and unwitting host to molecular parasites. *Leukemia*. mai 2008;22(5):941-950.
53. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol*. févr 2006;6(2):93-106.
54. Petz LD. Immunohematologic problems associated with bone marrow transplantation. *Transfus Med Rev*. août 1987;1(2):85-100.
55. Braine HG, Sensenbrenner LL, Wright SK, Tutschka PJ, Saral R, Santos GW. Bone marrow transplantation with major ABO blood group incompatibility using erythrocyte depletion of marrow prior to infusion. *Blood*. août 1982;60(2):420-425.
56. Collins NH, Gee AP, Durett AG, Kan F, Zhang M-J, Champlin RE, et al. The effect of the composition of unrelated donor bone marrow and peripheral blood progenitor cell grafts on transplantation outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. févr 2010;16(2):253-262.
57. Faucher C, Le Corroller AG, Chabannon C, Viens P, Stoppa AM, Bouabdallah R, et al. Autologous transplantation of blood stem cells mobilized with filgrastim alone in 93 patients with malignancies: the number of CD34+ cells reinfused is the only factor predicting both granulocyte and platelet recovery. *J Hematother*. déc 1996;5(6):663-670.
58. Weaver CH, Hazelton B, Birch R, Palmer P, Allen C, Schwartzberg L, et al. An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. *Blood*. 15 nov 1995;86(10):3961-3969.
59. Dercksen MW, Rodenhuis S, Dirkson MK, Schaasberg WP, Baars JW, van der Wall E, et al. Subsets of CD34+ cells and rapid hematopoietic recovery after peripheral-blood stem-cell transplantation. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. août 1995;13(8):1922-1932.
60. Lanza F, Campioni D, Hellmann A, Milone G, Wahlin A, Walewski J, et al. Individual Quality Assessment Of Autografting By Probability Estimation For Clinical End-Points: A Prospective Validation Study Of The European Blood And Marrow Transplantation (Ebmt). *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant*. 26 août 2013;

61. Gorin N-C, Labopin M, Reiffers J, Milpied N, Blaise D, Witz F, et al. Higher incidence of relapse in patients with acute myelocytic leukemia infused with higher doses of CD34+ cells from leukapheresis products autografted during the first remission. *Blood*. 28 oct 2010;116(17):3157-3162.
62. Gianni AM. Where do we stand with respect to the use of peripheral blood progenitor cells? *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. nov 1994;5(9):781-784.
63. Siena S, Schiavo R, Pedrazzoli P, Carlo-Stella C. Therapeutic relevance of CD34 cell dose in blood cell transplantation for cancer therapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. mars 2000;18(6):1360-1377.
64. Storb R, Prentice RL, Thomas ED. Treatment of aplastic anemia by marrow transplantation from HLA identical siblings. Prognostic factors associated with graft versus host disease and survival. *J Clin Invest*. avr 1977;59(4):625-632.
65. Sierra J, Storer B, Hansen JA, Bjerke JW, Martin PJ, Petersdorf EW, et al. Transplantation of marrow cells from unrelated donors for treatment of high-risk acute leukemia: the effect of leukemic burden, donor HLA-matching, and marrow cell dose. *Blood*. 1 juin 1997;89(11):4226-4235.
66. Dominietto A, Lamparelli T, Raiola AM, Van Lint MT, Gualandi F, Berisso G, et al. Transplant-related mortality and long-term graft function are significantly influenced by cell dose in patients undergoing allogeneic marrow transplantation. *Blood*. 1 déc 2002;100(12):3930-3934.
67. Mohty M, Bilger K, Jourdan E, Kuentz M, Michallet M, Bourhis JH, et al. Higher doses of CD34+ peripheral blood stem cells are associated with increased mortality from chronic graft-versus-host disease after allogeneic HLA-identical sibling transplantation. *Leukemia*. mai 2003;17(5):869-875.
68. Urbano-Ispizua A, Carreras E, Marín P, Rovira M, Martínez C, Fernández-Avilés F, et al. Allogeneic transplantation of CD34(+) selected cells from peripheral blood from human leukocyte antigen-identical siblings: detrimental effect of a high number of donor CD34(+) cells? *Blood*. 15 oct 2001;98(8):2352-2357.
69. Mavroudis D, Read E, Cottler-Fox M, Couriel D, Molldrem J, Carter C, et al. CD34+ cell dose predicts survival, posttransplant morbidity, and rate of hematologic recovery after allogeneic marrow transplants for hematologic malignancies. *Blood*. 15 oct 1996;88(8):3223-3229.
70. Morariu-Zamfir R, Rocha V, Devergie A, Socié G, Ribaud P, Esperou H, et al. Influence of CD34(+) marrow cell dose on outcome of HLA-identical sibling allogeneic bone marrow transplants in patients with chronic myeloid leukaemia. *Bone Marrow Transplant*. mars 2001;27(6):575-580.

71. Bittencourt H, Rocha V, Chevret S, Socié G, Espérou H, Devergie A, et al. Association of CD34 cell dose with hematopoietic recovery, infections, and other outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 15 avr 2002;99(8):2726- 2733.
72. Russell NH, Hunter A, Rogers S, Hanley J, Anderson D. Peripheral blood stem cells as an alternative to marrow for allogeneic transplantation. *Lancet*. 5 juin 1993;341(8858):1482.
73. Bittencourt H, Rocha V, Chevret S, Socié G, Espérou H, Devergie A, et al. Association of CD34 cell dose with hematopoietic recovery, infections, and other outcomes after HLA-identical sibling bone marrow transplantation. *Blood*. 15 avr 2002;99(8):2726- 2733.
74. Geneviève F, Godon A, Marteau-Tessier A, Zandecki M. [Automated hematology analysers and spurious counts Part 2. Leukocyte count and differential]. *Ann Biol Clin (Paris)*. avr 2012;70(2):141-154.
75. Piedras-Ross J, León-Rodríguez E, Sánchez-Guerrero S, López-Karpovitch X. Comparison of single- and dual-platform approaches to enumerate CD34(+) cells in bone marrow and mobilized peripheral blood stem cells. *Arch Med Res*. févr 2003;34(1):16-19.
76. Gratama JW, Braakman E, Kraan J, Lankheet P, Levering WH, Van Den Beemd MW, et al. Comparison of single and dual-platform assay formats for CD34+ haematopoietic progenitor cell enumeration. *Clin Lab Haematol*. oct 1999;21(5):337-346.
77. Moscardó F, Urbano-Ispizua A, Sanz GF, Brunet S, Caballero D, Vallejo C, et al. Positive selection for CD34+ reduces the incidence and severity of veno-occlusive disease of the liver after HLA-identical sibling allogeneic peripheral blood stem cell transplantation. *Exp Hematol*. juin 2003;31(6):545-550.
78. Larghero J, Rea D, Esperou H, Biscay N, Maurer M-N, Lacassagne M-N, et al. ABO-mismatched marrow processing for transplantation: results of 114 procedures and analysis of immediate adverse events and hematopoietic recovery. *Transfusion (Paris)*. mars 2006;46(3):398-402.
79. Rowley SD, Liang PS, Ulz L. Transplantation of ABO-incompatible bone marrow and peripheral blood stem cell components. *Bone Marrow Transplant*. oct 2000;26(7):749-757.
80. Anasetti C, Logan BR, Confer DL, Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network. Peripheral-blood versus bone marrow stem cells. *N Engl J Med*. 17 janv 2013;368(3):288.

VU

NANCY, le **18 septembre 2013**

Le Président de Thèse

NANCY, le **26 septembre 2013**

Le Doyen de la Faculté de Médecine

Professeur P. FEUGIER

Professeur H. COUDANE

AUTORISE À SOUTENIR ET À IMPRIMER LA THÈSE N°6646

NANCY, le 15/10/2013

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Professeur P. MUTZENHARDT

RÉSUMÉ DE LA THÈSE

L'allogreffe permet d'exercer un effet allogénique, en cas de pathologies hématologiques malignes, ou de pallier une hématopoïèse défailante. La source historique de greffon de cellules souches hématopoïétiques est médullaire. Actuellement, une des méthodes d'évaluation des cellules souches hématopoïétiques est la quantification en cytométrie en flux de l'antigène CD34+. Or, contrairement à l'autogreffe et à l'allogreffe avec greffon de type cellules souches périphériques, il n'y a pas de consensus sur une quantité minimale de CD34+ optimale dans le greffon médullaire. De plus, en cas d'incompatibilité de groupe sanguin, il est nécessaire de réaliser des manipulations sur le greffon qui peuvent entraîner une perte de CD34+.

Matériels et méthodes : Nous avons étudié rétrospectivement toutes les allogreffes réalisées à Nancy de 2006 à 2011, afin de déterminer l'impact des caractéristiques du donneur (âge, sexe, compatibilité HLA, apparenté ou non), des caractéristiques du receveur (âge, sexe, pathologie maligne ou non), de la composition du greffon en cellules nucléées totales, CD34+, CFU-GM, CD3+ et des manipulations sur le greffon, sur la reconstitution hématopoïétique, la survie globale à 5 ans, la survie sans maladie, la rechute, les complications (GVH, infections et pathologies de l'endothélium). La quantité de CD34+ est évaluée selon les recommandations internationales (ISHAGE) en double plateforme.

Résultats : En cas de greffon comportant plus de 3.47×10^6 CD34+/kg, on observe significativement plus de maladie veino-occlusive ($p=0.0119$) mais moins d'infection bactériennes et fongiques ($p=0.0475$ et $p=0.0436$). Un seuil de CD34+/kg supérieur à 2.7×10^6 diminue significativement le risque d'infections fongiques ($p=0.0095$). Nous n'observons pas de différence significative liée à la composition cellulaire en termes de survie globale à 5 ans et sans maladie à 5 ans, de rechute et de mortalité liée à la transplantation. Concernant, la reconstitution hématopoïétique, la faible quantité de CNT/kg dans le greffon est un facteur de risque significatif ($p=0.0482$) pour les patients reconstituants le plus lentement les PNN et les plaquettes. La reconstitution hématopoïétique n'est pas liée significativement à la dose de CD34+, de CFU-GM ou de CD3+. Les manipulations du greffon liées aux incompatibilités de groupe ABO n'ont pas d'impact significatif sur la survie globale et sans rechute à 5 ans.

Conclusion : En analyse multivariée, le seul paramètre, ayant un impact négatif significatif sur la survie globale et la survie sans maladie à 5 ans, est un âge élevé du receveur. En cas d'incompatibilité de groupe ABO majeure ou complexe, nous proposons de prélever au moins 4.24×10^8 CNT/kg en vue de réinjecter au moins 3.47×10^6 CD34+/kg.

Dans la procédure de choix d'un donneur, l'incompatibilité ABO ne devrait pas conduire à réfuter un donneur.

TITRE EN ANGLAIS

Impact of the composition of graft on transplantation outcomes after bone marrow transplantation.

THÈSE : MÉDECINE SPÉCIALISÉE – ANNÉE 2013

MOTS CLEFS :

Allogreffe-Moelle-Composition greffon-Complications-Reconstitution hématopoïétique
Manipulation du greffon

INTITULÉ ET ADRESSE :

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

Faculté de Médecine de Nancy
9, avenue de la Forêt de Haye
54505 VANDOEUVRE LES NANCY Cedex
