

Université de Limoges
Faculté de Pharmacie

Année 2018

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

présentée et soutenue publiquement
le 10 septembre 2018
par

SCHUPPE Laurie

née le 20 juin 1989, à Carcassonne

**Etude des marqueurs biologiques influençant le recueil de cellules
souches hématopoïétiques dans le cadre de l'autogreffe.**

Examineurs de la thèse :

M^{me} le Professeur Sylvie ROGEZ

M^{me} le Professeur Véronique DE MAS-MANSAT

M le Professeur Hervé AVET-LOISEAU

M^{me} le Docteur Cécile BOREL

M le Docteur François VERGEZ

M le Docteur Jean-Baptiste RIEU

Présidente

Juge

Juge

Membre invité

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse





Université de Limoges
Faculté de Pharmacie

Année 2018

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'Etat de docteur en Pharmacie

présentée et soutenue publiquement
le 10 septembre 2018
par

SCHUPPE Laurie

née le 20 Juin 1989, à Carcassonne

**Etude des marqueurs biologiques influençant le recueil de cellules
souches hématopoïétiques dans le cadre de l'autogreffe.**

Examineurs de la thèse :

M^{me} le Professeur Sylvie ROGEZ

M^{me} le Professeur Véronique DE MAS-MANSAT

M le Professeur Hervé AVET-LOISEAU

Mme le Docteur Cécile BOREL

M le Docteur François VERGEZ

M le Docteur Jean-Baptiste RIEU

Président

Juge

Juge

Membre invité

Directeur de thèse

Co-directeur de thèse



Liste des enseignants

PROFESSEURS :

BATTU Serge	CHIMIE ANALYTIQUE
CARDOT Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
DESMOULIERE Alexis	PHYSIOLOGIE
DUROUX Jean-Luc	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
FAGNERE Catherine	CHIMIE THERAPEUTIQUE - CHIMIE ORGANIQUE
LIAGRE Bertrand	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MAMBU Lengo	PHARMACOGNOSIE
ROUSSEAU Annick	BIOSTATISTIQUE
TROUILLAS Patrick	CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
VIANA Marylène	PHARMACOTECHNIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES – PRATICIENS HOSPITALIERS DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

MOESCH Christian	HYGIENE HYDROLOGIE ENVIRONNEMENT
PICARD Nicolas	PHARMACOLOGIE
ROGEZ Sylvie	BACTERIOLOGIE ET VIROLOGIE
SAINT-MARCOUX Franck	TOXICOLOGIE

ASSISTANT HOSPITALIER UNIVERSITAIRE DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES :

CHAUZEIX Jasmine	HEMATOLOGIE
-------------------------	-------------

MAITRES DE CONFERENCES :

BASLY Jean-Philippe	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
BEAUBRUN-GIRY Karine	PHARMACOTECHNIE
BILLET Fabrice	PHYSIOLOGIE



CALLISTE Claude	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE
CLEDAT Dominique	CHIMIE ANALYTIQUE ET BROMATOLOGIE
COMBY Francis	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
COURTIOUX Bertrand	PHARMACOLOGIE, PARASITOLOGIE
DELEBASSEE Sylvie	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
DEMIOT Claire-Elise	PHARMACOLOGIE
FROISSARD Didier	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
GRIMAUD Gaëlle	CHIMIE ANALYTIQUE ET CONTROLE DU MEDICAMENT
JAMBUT Anne-Catherine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
LABROUSSE Pascal	BOTANIQUE ET CRYPTOLOGIE
LEGER David	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MARION-THORE Sandrine	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
MARRE-FOURNIER Françoise	BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLECULAIRE
MERCIER Aurélien	PARASITOLOGIE
MILLOT Marion	PHARMACOGNOSIE
MOREAU Jeanne	MICROBIOLOGIE-PARASITOLOGIE-IMMUNOLOGIE
MUSUAMBA TSHINANU Flora	PHARMACOLOGIE
PASCAUD Patricia	PHARMACIE GALENIQUE – BIOMATERIAUX CERAMIQUES
POUGET Christelle	CHIMIE ORGANIQUE ET THERAPEUTIQUE
VIGNOLES Philippe	BIOPHYSIQUE, BIOMATHEMATIQUES ET INFORMATIQUE

ATTACHE TEMPORAIRE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

FABRE Gabin	(01.09.2016 au 31.08.2017) CHIMIE PHYSIQUE - PHYSIQUE
--------------------	--



LAVERDET Betty

(1.09.2016 au 31.08.2017)
PHARMACIE GALENIQUE

PHAM Thanh Nhat

(1.09.2016 au 31.08.2017)
CHIMIE ORGANIQUE - BIOCHIMIE

PROFESSEURS EMERITES :

BUXERAUD Jacques

DREYFUSS Gilles

LOUDART Nicole



Remerciements

A Madame le Professeur Sylvie ROGEZ,

Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez bien voulu porter à mon travail. Soyez assurée de ma plus sincère gratitude et veuillez accepter l'expression de mon plus grand respect.

A mes directeurs de thèse,

Monsieur le Docteur François VERGEZ,

Je te suis très reconnaissante de m'avoir fait confiance et de m'avoir confié ce travail. Je te remercie pour tes conseils, ta bonne humeur et ton expertise en statistiques.

Monsieur le Docteur Jean-Baptiste RIEU,

Je te remercie également de m'avoir proposé ce sujet. Ta disponibilité et ta pédagogie ont été d'une aide précieuse tout au long de la réalisation de ce travail.

A Madame le Professeur Véronique DE MAS-MANSAT,

Je vous remercie chaleureusement d'avoir accepté d'être membre de ce jury et pour votre bienveillance durant tous ces semestres. Soyez assurée de mon respect et de ma profonde gratitude.

A Monsieur le Professeur Hervé AVET-LOISEAU,

Je vous suis très reconnaissante d'avoir accepté d'être membre de ce jury et de participer à la critique de ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance et de mon plus profond respect.

A Madame le Docteur Cécile BOREL,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury et d'y apporter votre expertise clinique. Je vous remercie également de l'enthousiasme dont vous avez fait preuve vis-à-vis de ce projet. Je vous prie d'accepter mes considérations respectueuses.

A Catherine ADAM et tout le service de greffe, merci de m'avoir accueillie et permis de comprendre le parcours complexe de l'autogreffe dont je n'avais pas idée avant de commencer.

A Pauline SOLER, merci pour ton accueil à l'antenne EFS de l'IUC.

A Elina, toi qui continues le travail que j'ai commencé sur l'autogreffe. Je te remercie pour ces longues heures passées au téléphone et ton soutien.



A tous les biologistes qui m'ont accueillie au cours de ces quatre années d'internat à Limoges, Toulouse et Castres. Je vous remercie pour votre participation immense à ma formation. Merci à tous les techniciens et à toutes les équipes.

Un merci tout particulier à l'équipe du CH de Castres, grâce à vous je ne perdrai plus jamais le Nord 😊 et je retrouve encore des confettis dans ma voiture.

A tous les internes et amis, merci à vous pour les supers soirées et la bonne ambiance qui ont rendues cet internat incroyable : Elodie, Marion, Tiphaine, Anthony, Alice-Anne, Jules, M-F, Isabelle, Jessica, Jérémie, Grégoire, Lucie, Damien, Céline, Laure, Louis-tho, Romain, Barny, Audrey, Pauline, Camille C., Julien, Agnès, Jean, Camille M., Noémie O. , Karen, Sarah, Hélène, Hadrien, Etienne, Claudia, Thibaut, Imane, Ali, Manu, Pierre-Yves, Noémie G. Ines, Thomas, Vuthy, Bastien, Alizée.

A Morgane, un grand merci pour tout ce que tu as fait pour moi. Tu m'as rendu au centuple l'aide que j'avais pu t'apporter.

A Raph P. et Dan, j'ai adoré le temps passé dans votre coloc et vos séances de révisions infernales pour l'internat.

A tous les pompiers de la caserne de Cournonterral (Emilie, Justine, Aldric, Zézé, ...). Vous m'avez vu grandir : arrivée aux JSP à 12 ans, pompier volontaire à 18 ans, je ne vous ai quitté que pour commencer mon internat à Limoges. Ça en fait des années à se faire réveiller en pleine nuit par le doux son du « bip » pour des interventions en tout genre !! et des soirées de folie (et oui être pompier ne se résume pas qu'aux interventions). Je vous dois par la même occasion mes plus profonds sommeils en cours le lendemain matin.

A mon lolo, tu es le meilleur ami que l'on puisse souhaiter avoir. Une thèse entière ne suffirait pas pour résumer notre amitié.

A Raph V., j'ai bien au moins 23 bonnes raisons qui font que je t'apprécie hormis le fait que tu supportes lolo, mais je n'en citerai qu'une : tes jeux de mots pourris.

A ma famille, vous êtes adorables mais non je n'ouvrirai pas de pharmacie à la fin de mes études, je fais de la biologie maintenant.

A mes frères et sœur,

Merci de votre soutien pendant ces 11 années d'études. Je suis un peu nostalgique, c'est fini maintenant je n'aurai plus d'excuses pour être insupportable. Je n'ai pas les mots pour vous dire à quel point vous êtes importants pour moi. Je vais donc partager avec vous ce qui me revient en mémoire quand je pense à vous en écrivant ces mots :

Adam, tes barbecues gigantesques allumés au chalumeau me font beaucoup rire. Avec assez de bois pour faire rôtir un sanglier, on t'avait dit pourtant qu'il n'y avait qu'un camembert à faire. Au passage, la Porsche tu peux oublier, c'est de la triche ça ne vaut pas le même prix qu'une calculatrice même scientifique.



Jérémy, avoir qu'un an de différence avec toi n'a pas toujours été un cadeau, surtout au collège, le kangourou a laissé des traces. On est quand même resté très proches et j'en suis fière. Je voulais juste te dire : le canoë avec toi c'est top. Enfin ça c'était avant que tu décides d'arrêter de pagayer alors qu'on allait s'écraser contre un rocher.

Nellou (tu seras toujours Nellou pour moi, même dans les remerciements de ma thèse) : Traïtresse, tu m'as fait tomber du toboggan, l'eau de la piscine était gelée. Même 10 ans après, je me vengerais !! Plus sérieusement, être la marraine de Talya est le plus beau cadeau que tu pouvais me faire.

A mon papoun,

Tu as toujours été présent pour moi et tu l'es encore. Sans toi, je n'en serais certainement pas là. Tu es mon pilier et mon moteur. Tu m'as accompagnée pour tous les concours et je n'oublierai jamais la fierté que j'ai lu dans ton regard à chaque fois.

Tu as vécu les derniers jours de la rédaction de ce manuscrit intensément. Avec Michèle vous avez été au top comme d'habitude.

Je te remercie pour tout et tu le sais mais ça fait du bien de l'entendre et encore plus de le voir : Je t'aime mon petit papoun.

A ma mamoun,

J'ai commencé l'internat de la pire des manières. Te perdre est la chose la plus difficile que j'ai eu à affronter. Tu m'as donné envie de faire de longues études, et plus particulièrement dans le médical.

Tu as relu tellement de mes devoirs, je te vois encore restée jusqu'au bout de la nuit pour les corriger. Celui-là malheureusement, tu n'as pas eu le temps.

Je te dédie cette thèse et bien plus encore.

Je t'aime



Table des matières

Liste des abréviations.....	15
Introduction	17
I. L'hématopoïèse.....	19
I.1. La cascade hématopoïétique	19
I.2. Le microenvironnement médullaire	20
II. L'Autogreffe.....	23
II.1. Indications.....	23
II.1.1. Le myélome multiple.....	25
II.1.2. Lymphomes.....	26
II.2. Les critères de qualité de recueil de cellules souches périphériques.....	26
II.2.1. Numération des cellules CD34+	26
II.2.2. Numération des CFU-GM.....	28
II.2.3. Autres critères de qualité	29
II.3. Les protocoles de stimulation.....	29
II.3.1. Le « Steady-state » ou Etat basal.....	29
II.3.2. La chimio-mobilisation	31
II.3.3. Le plerixafor.....	33
II.4. Définition des patients mauvais mobilisateurs	35
II.5. Le circuit de l'autogreffe	36
II.5.1. Mobilisation et recueil	36
II.5.2. Conservation, décongélation et autogreffe	37
III. Etude.....	38
III.1. Patients et méthode	38
III.1.1. Patients	38
III.1.2. Méthode	38
III.1.2.1 Recueil des données.....	38
III.1.2.2 Analyse des données.....	40
III.2. Les données de recueil de cellules souches périphériques.....	41
III.2.1. Description des données	41
III.2.2. Résultats	43
III.2.2.1 Paramètres sanguins avant cytophérèse	43
III.2.2.2 Paramètres biologiques en post-aphérèse avant transformation	45
III.2.2.3 Relation entre les paramètres de pré-aphérèse et de post-aphérèse avant transformation.....	47
III.2.2.3.1. Leucocytes sanguins avant le recueil et CD34+ contenus dans les produits de cytophérèse	47
III.2.2.3.2. CD34+ circulants avant recueil et CD34+ contenus dans les produits de cytophérèse.....	48
III.2.2.4 Mauvais mobilisateurs.....	52
III.2.2.4.1. Définitions des patients mauvais mobilisateurs.....	52
III.2.2.4.2. Facteurs prédictifs de mauvaise mobilisation.....	53
III.2.2.5 Etape de transformation	56
III.2.2.6 Corrélation CFU-GM et cellules CD34+ après transformation	58
III.3. Les données de décongélation de cellules souches périphériques	59
III.3.1. Description des données	59

III.3.2. Résultats	60
III.3.2.1 Facteurs influençant la récupération à la décongélation des progéniteurs.....	61
III.3.2.1.1. Données générales	61
III.3.2.1.2. Marqueurs biologiques de post-aphérèse	63
III.3.2.1.3. Numération des cellules CD34+ circulantes en pré-aphérèse.....	69
III.4. Les données de sortie d'aplasie	71
III.4.1. Description des données	71
III.4.2. Résultats	73
III.4.2.1 Richesse en progéniteurs des autogreffes et sortie d'aplasie, toutes pathologies confondues	73
III.4.2.2 Richesse en progéniteurs des autogreffes et sortie d'aplasie, étude par groupe de pathologies	74
III.4.2.2.1. Influence de la pathologie	74
III.4.2.2.2. Influence de la richesse en progéniteurs du greffon sur la récupération des polynucléaires neutrophiles par groupes de pathologies.....	75
III.4.2.2.2.1. Les pathologies de cinétique rapide de récupération des polynucléaires neutrophiles	76
III.4.2.2.2.2. Les pathologies de cinétique lente de récupération des polynucléaires neutrophiles	77
Discussion et perspectives	80
Conclusion	89
Références bibliographiques	90
Annexes	95
Serment de Galien	110



Table des illustrations

Figure 1 : Hématopoïèse et rôle des cytokines <i>in vivo</i> [7]	19
Figure 2: CSH dans le microenvironnement médullaire[9]	21
Figure 3 : Evolution de l'activité de cytophères en vue d'autogreffe (Bilan 2015) [10].	23
Figure 4 : Répartition des diagnostics chez les patients ayant eu une autogreffe en 2015 pour les hémopathies [10].	24
Figure 5: Répartition des diagnostics chez les patients ayant eu une autogreffe en 2015 pour les tumeurs solides [10].	25
Figure 6: Culture de CFU-GM de 14 jours	28
Figure 7 : Mécanisme d'action du G-CSF dans la mobilisation des CSH [9]	30
Figure 8 : Stratégies actuelles de mobilisation en autogreffe [34].	32
Figure 9: Les différentes chimiothérapies de mobilisation en fonction des pathologies [34]..	33
Figure 10: Mécanisme d'action de l'AMD3 100 (Plerixafor) [35].	34
Figure 11: Répartition des indications des cycles de recueils de CSP de la cohorte sur les 3 années étudiées	42
Figure 12 : Taux de CD34+ en pré-aphérèse en fonction de l'indication	44
Figure 13 : Taux de CD34+ collectées avant transformation en fonction du jour de cytophères	45
Figure 14 : Taux de CD34+ recueillis en fonction des leucocytes sanguins.	48
Figure 15 : Cellules CD34+ collectées dans les produits de cytophères en fonction de la concentration des CD34+ sanguins en pré-aphérèse (μL)	49
Figure 16 : Cellules CD34+ contenues dans les produits de cytophères en fonction du pourcentage de cellules CD34+ en pré-aphérèse	50
Figure 17 : Seuil de CD34+ circulants permettant des recueils $> 2 \times 10^6/\text{kg}$ et $>3 \times 10^6/\text{kg}$...	51
Figure 18 : Facteur prédictif de mauvaise mobilisation : la pathologie.	53
Figure 19 : Facteur prédictif de mauvaise mobilisation : le sexe	54
Figure 20 : Facteur prédictif de mauvaise mobilisation : l'âge du patient	54
Figure 21 : Facteur prédictif de mauvaise mobilisation : numération plaquettaire au premier jour du cycle.	55
Figure 22 : Numération des cellules CD34+ après transformation en fonction de leur numération avant transformation.	56
Figure 23 : CFU-GM après transformation en fonction des cellules CD34+ après transformation	58
Figure 24 : Récupération à la décongélation des cellules CD34+ en fonction de la pathologie	62
Figure 25 : Récupération à la décongélation des cellules CD34+ en fonction du délai entre le recueil de CSP et l'autogreffe	63

Figure 26 : Récupération à la décongélation des cellules CD34+ en fonction de la numération des cellules CD34+ après transformation	64
Figure 27 : Récupération à la décongélation des cellules CD34+ en fonction de la numération des leucocytes après transformation	65
Figure 28 : Récupération à la décongélation des cellules CD34+ en fonction de la numération des polynucléaires neutrophiles après transformation	66
Figure 29 : Récupération à la décongélation des cellules CD34+ en fonction de la numération des granuleux immatures (IG) après transformation	67
Figure 30 : Récupération à la décongélation des cellules CD34+ en fonction de la numération des plaquettes avant congélation	67
Figure 31 : Récupération des cellules CD34+ en fonction du nombre de cellules CD34+ sanguines au premier jour de cycle toutes pathologies confondues	69
Figure 32 : Récupération des cellules CD34+ en fonction du nombre de cellules CD34+ sanguines au premier jour de cycle pour les myélomes multiples.....	70
Figure 33 : Répartition des indications d'autogreffe d'octobre 2014 à février 2017	72
Figure 34 : Récupération des PNN en fonction de la richesse du greffon en CD34+, toutes pathologies.....	73
Figure 35 : Délai de récupération des polynucléaires neutrophiles en fonction de la pathologie.....	75
Figure 36 : Délai de récupération des pathologies de cinétique rapide de sortie d'agranulocytose en fonction de la richesse de l'autogreffe en cellules CD34+	76
Figure 37 : Délai de récupération des pathologies de cinétique lente de sortie d'agranulocytose en fonction de la richesse de l'autogreffe en cellules CD34+	78



Table des tableaux

Tableau 1 : Acteurs cellulaires de la mobilisation des CSH par le G-CSF [9].....	30
Tableau 2 : Nombre de recueils par cycle de cytophérèse et par pathologie	43
Tableau 3: Patients « mauvais mobilisateurs »	52
Tableau 4 : Indices de récupération des polynucléaires en fonction de la pathologie	75
Tableau 5 : Influence de la richesse en cellules CD34+ du greffon sur les pathologies de cinétique rapide de récupération des polynucléaires neutrophiles	76
Tableau 6 : Influence de la richesse en cellules CD34+ du greffon sur les pathologies de cinétique lente de récupération des polynucléaires neutrophiles	78



Liste des abréviations

ABM : agence nationale de la biomédecine

ADN : acide désoxyribonucléique

ALDH : aldehyde deshydrogenase

AMM : autorisation de mise sur le marché

ARS : agence régionale de santé

CD : cluster of differentiation

CCR5 : C-C chemokine receptor type 5

CHU : centre hospitalo-universitaire

CSH : cellule souche hématopoïétique

CSP : cellule souche périphérique

CXCL12 : C-X-C motif chemokine ligand 12

CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4

G-CSF : granulocyte colony-stimulating factor

CFU-G : colony forming unit-granulocyte

CFU-M : colony forming unit-macrophage

CFU-GM : colony forming unit-granulo-monocytic

EFS : établissement français de sang

GM-CSF : granulocyte macrophage colony-stimulating factor

GMP : granulocyte macrophage progenitor

GP : glycoprotéine

IL-3 : interleukin -3

IR : indice de récupération

IUC : institut universitaire du cancer

LA : leucémie aiguë

LNH : lymphome non hodgkinien

MM : myélome multiple

M-CSF : macrophage colony-stimulating factor

PNN : polynucléaire neutrophile

POEMS syndrome : Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy, Monoclonal protein, Skins changes syndrome

RCP : réunion de concertation pluridisciplinaire

SDF-1 (= CXCL12): stromal cell-derived factor 1

SCF : stem cell factor



TPO : thrombopoïétine

VCAM-1 : vascular cell adhesion molecule 1

VLA-4 : very late antigen-4



Introduction

Le terme d'« autogreffe de cellules souches hématopoïétiques » est employé comme synonyme de « greffe autologue de cellules souches hématopoïétique » ou « autogreffe de moelle osseuse ». Il fait référence à la provenance des cellules souches utilisées. Le patient est son propre donneur, par opposition à la greffe « allogénique » où le donneur et le receveur sont deux personnes distinctes.

Les chimiothérapies anticancéreuses classiques ont pour but de réduire voire d'éradiquer la masse tumorale. L'activité antitumorale est proportionnelle à la dose de médicament administrée. Pour obtenir une activité optimale et détruire les cellules tumorales résiduelles résistantes aux chimiothérapies classiques, des doses plus élevées sont souvent nécessaires : c'est ce que l'on appelle les traitements d'intensification. Parallèlement à l'augmentation de l'efficacité, il y a aussi une augmentation de la toxicité, qui limitait initialement l'utilisation des traitements d'intensification.

L'autogreffe de cellules souches hématopoïétique (CSH) a révolutionné l'approche thérapeutique des hémopathies. En effet, conjointement à ces chimiothérapies intensives myéloablatives qui entraînent une aplasie par arrêt de production des lignées médullaires, le greffon de CSH vient remplacer les cellules médullaires déficitaires et permet une meilleure tolérance hématologique. L'autogreffe ne guérit donc pas la pathologie ciblée contrairement à la chimiothérapie mais c'est un élément support essentiel permettant de rétablir une hématopoïèse normale.

C'est au cours des années 1980 que l'autogreffe trouve sa place dans l'arsenal thérapeutique des hémopathies. Les cellules souches du patient sont prélevées au moment où ce dernier est en rémission ou lorsque sa maladie résiduelle est minime. Ce type de greffe est envisageable pour des patients jeunes, avant l'âge de 65 ans. Cette limite d'âge peut être repoussée jusqu'à 70 ans pour les patients en bon état de santé [1].

Historiquement, les CSH étaient prélevées par ponction médullaire directe au niveau des crêtes iliaques ou du sternum au bloc opératoire et sous anesthésie générale. Progressivement, ce mode de recueil a été supplanté par le recueil de cellules souches périphériques (CSP) [2]. A l'état basal, une très faible quantité de CSH est présente dans la circulation sanguine [3]. La production et la libération de ces CSH peut être stimulée de manière artificielle afin de les recueillir par cytaphérèse.

Il a été démontré que le recueil de CSP pouvait être utilisé de manière équivalente à la ponction médullaire et qu'il présentait même des avantages par rapport à celui-ci : la facilité de recueil, le confort du patient avec un prélèvement moins douloureux ne nécessitant pas d'anesthésie



générale. D'autre part, la richesse accrue en CSH permet une sortie d'aplasie plus précoce[4]. Ces avantages font de ce procédé de recueil le seul utilisé actuellement hormis en cas d'échec de mobilisation où la ponction médullaire reste la dernière alternative.

L'intérêt du traitement d'intensification associé à une autogreffe est d'augmenter la survie globale et la survie sans progression[5] [6]. L'intérêt de la qualification du greffon repose sur le fait qu'un greffon de bonne qualité permet une sortie d'aplasie plus précoce, limitant ainsi les besoins transfusionnels, les complications liées à l'aplasie et réduisant la durée d'hospitalisation.

Le contrôle de la qualité des poches de cytophérèse est indispensable pour s'assurer d'une quantité suffisante de progéniteurs nécessaire à la greffe. Il n'existe pas de test de routine *in vitro* capable d'identifier avec certitude les CSH. Le marqueur choisi pour estimer leur quantité est la numération des cellules exprimant l'antigène CD34.

Ce travail a pour but d'étudier les données biologiques au cours du processus d'autogreffe au CHU de Toulouse. L'ensemble des étapes sont analysées : le recueil des CSP ainsi que la transformation des produits d'aphérèse, la décongélation des greffons et enfin la sortie d'aplasie.

Dans un premier temps, les données biologiques seront explicitées et dans un second temps, nous tenterons d'identifier les facteurs pouvant influencer la qualité de chacune des phases individuellement.



I. L'hématopoïèse

L'hématopoïèse désigne l'ensemble des étapes menant à la fabrication des cellules sanguines : globules rouges, globules blancs et plaquettes, qui ont des durées de vie très différentes (de quelques jours pour les polynucléaires neutrophiles à quelques mois pour les globules rouges). Les besoins de l'organisme sont très importants : environ 10^{13} cellules doivent être fabriquées par jour pour maintenir l'homéostasie sanguine. Chez l'adulte, l'hématopoïèse a lieu dans la moelle osseuse et les cellules matures migrent vers la circulation sanguine.

I.1. La cascade hématopoïétique

Toutes les cellules sanguines sont issues d'une seule et même cellule appelée cellule souche hématopoïétique. Présente en très faible quantité dans la moelle osseuse, cette cellule possède des capacités particulières. Elle s'auto-renouvelle ce qui lui permet, à partir d'un pool de cellules limité, d'assurer l'hématopoïèse durant toute la vie d'un individu. Elle est également multipotente, c'est-à-dire qu'elle permet d'aboutir à la formation de n'importe quelle cellule hématopoïétique mature.

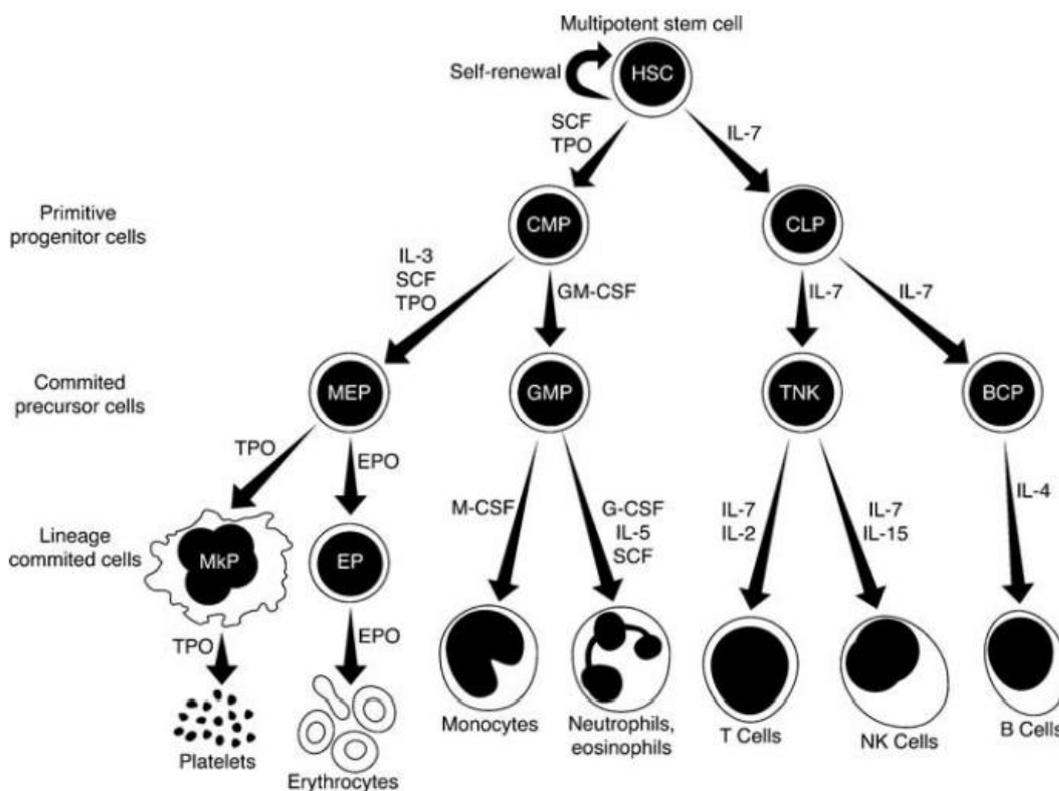


Figure 1 : Hématopoïèse et rôle des cytokines *in vivo* [7]



BCP, B-cell progenitor; CLP, common lymphoid progenitor; CMP, common myeloid progenitor; EP, erythroid progenitor; HSC, hematopoietic stem cell; GMP, granulocyte–macrophage progenitor; MEP, megakaryocyte erythroid progenitor; MkP, megakaryocyte progenitor; TNK, T-cell natural killer cell progenitor.

La CSH se différencie en un progéniteur multipotent de plus courte durée de vie (exprimant tous deux le CD34).

Dans la vision classique de l'hématopoïèse humaine, il est estimé que le progéniteur multipotent peut se différencier en deux types cellulaires : les progéniteurs communs myéloïdes (CMP) et les progéniteurs communs lymphoïdes (CLP) qui sont engagés dans une voie de différenciation et ont une capacité d'autorenouveau beaucoup plus limitée. Suivant un enchaînement de signaux extrinsèque et intrinsèques, la différenciation de ces progéniteurs aboutit à la fabrication de toutes les cellules sanguines (Figure 1).

A chaque stade de différenciation, il y a une multiplication des cellules (de 3 à 5 divisions par stade) permettant ainsi d'assurer les besoins de l'organisme en cellules hématopoïétiques matures.

Cette définition de l'hématopoïèse est actuellement remise en question, en faveur d'une évolution moins dichotomique de la CSH [8].

I.2. Le microenvironnement médullaire

L'hématopoïèse se réalise dans des cavités spécifiques de la moelle osseuse : les microenvironnements médullaires ou stroma. L'ensemble constitue ce que l'on appelle les niches hématopoïétiques. Les cellules souches trouvent dans ces niches les éléments essentiels pour adhérer aux cellules stromales et à la matrice extracellulaire (molécules d'adhésion), survivre, se différencier (facteurs de croissance), et migrer par un phénomène de « homing » (chimiokines) (Figure 2).

Les cellules souches adhèrent au stroma par plusieurs molécules d'adhésion dont les principales : l'intégrine VLA-4 et la N-cadhérine. La plupart des CSH sont sous une forme quiescente (G0 du cycle cellulaire). Elles vont ensuite pouvoir proliférer et se différencier sous l'action de facteurs de croissance hématopoïétiques.



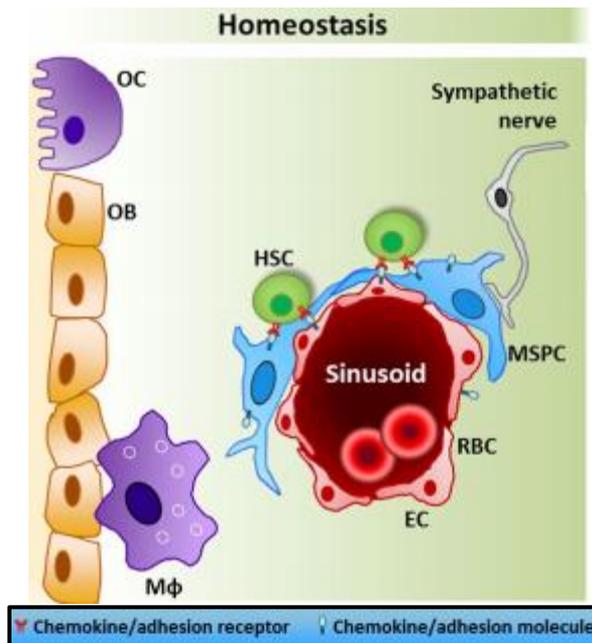


Figure 2: CSH dans le microenvironnement médullaire[9]

OC : ostéoclaste ; OB : ostéoblaste ; Mφ : macrophage ; HSC : cellule souche hématopoïétique ; MSPC : cellule mésenchymateuse ; RBC : érythrocyte ; EC : cellule endothéliale

Les cellules stromales ont également pour rôle de synthétiser les facteurs de croissance hématopoïétiques. Ce sont des glycoprotéines qui agissent comme des cytokines, capables de se fixer à des récepteurs membranaires avec une très forte affinité. Leur action reste locale, à la différence des hormones, et leur affinité pour leur récepteur est telle que de très faibles quantités suffisent pour être efficace.

Il existe plusieurs types de facteurs de croissance hématopoïétiques. Les facteurs multipotents, agissant à tous les stades de différenciation de la lignée myéloïde, permettent la survie cellulaire et la différenciation (GM-CSF, IL-3). Les facteurs de promotion stimulent l'autorenouveau cellulaire et sensibilisent les cellules à l'action des autres facteurs de croissance (SCF et IL-1, 4, 6). Les facteurs restreints agissent sur les étapes tardives de l'hématopoïèse, la multiplication et la maturation des précurseurs et des cellules matures (G-CSF, M-CSF, TPO).

Enfin, une dernière phase importante durant la vie des CSH est le phénomène de « homing ». Les CSH sont attirées dans la moelle osseuse grâce à un gradient de chimiokine : SDF-1 (stroma derived factor-1) synthétisée par les ostéoblastes. En effet, les CSH possèdent le récepteur spécifique de cette chimiokine : le CXCR-4. Le couple SDF-1/CXCR-4 permet non seulement d'attirer les CSH dans le compartiment médullaire mais également, une fois la localisation atteinte, de les maintenir dans la moelle osseuse.

Le couple SDF-1/CXCR-4 intervient dans deux phases du processus d'autogreffe :

- La phase de stimulation en vue du recueil de CSP, une des stratégies de mobilisation consiste à inhiber cette liaison SDF1/CXCR-4 afin de libérer les CSH dans le sang périphérique.
- Lors de la greffe, le « homing » permet aux CSH administrées par voie intraveineuse, de retourner dans la moelle osseuse pour relancer une hématopoïèse fonctionnelle après l'intensification thérapeutique.



II. L'Autogreffe

L'agence nationale de la biomédecine recueille chaque année et publie régulièrement les chiffres des activités de greffe en France.

En 2015, 3 135 greffes autologues ont été réalisées sur 3 023 patients. Les cellules souches hématopoïétiques proviennent de recueils sur sang périphérique de manière quasiment exclusive (99.9%). Ces chiffres restent stables depuis une dizaine d'années.

L'âge moyen des patients bénéficiant d'une autogreffe est de 53 ans, l'âge médian de 57 ans et 12% ont plus de 65 ans [10].

L'activité de cytophérèse, permettant de recueillir les cellules souches périphériques en vue d'une autogreffe, reste également stable au niveau national. Durant l'année 2015, 5 316 cytophérèses ont été réalisées sur 3 292 patients, soit une moyenne de 1,6 cytophérèses par patient [10] (Figure 3).

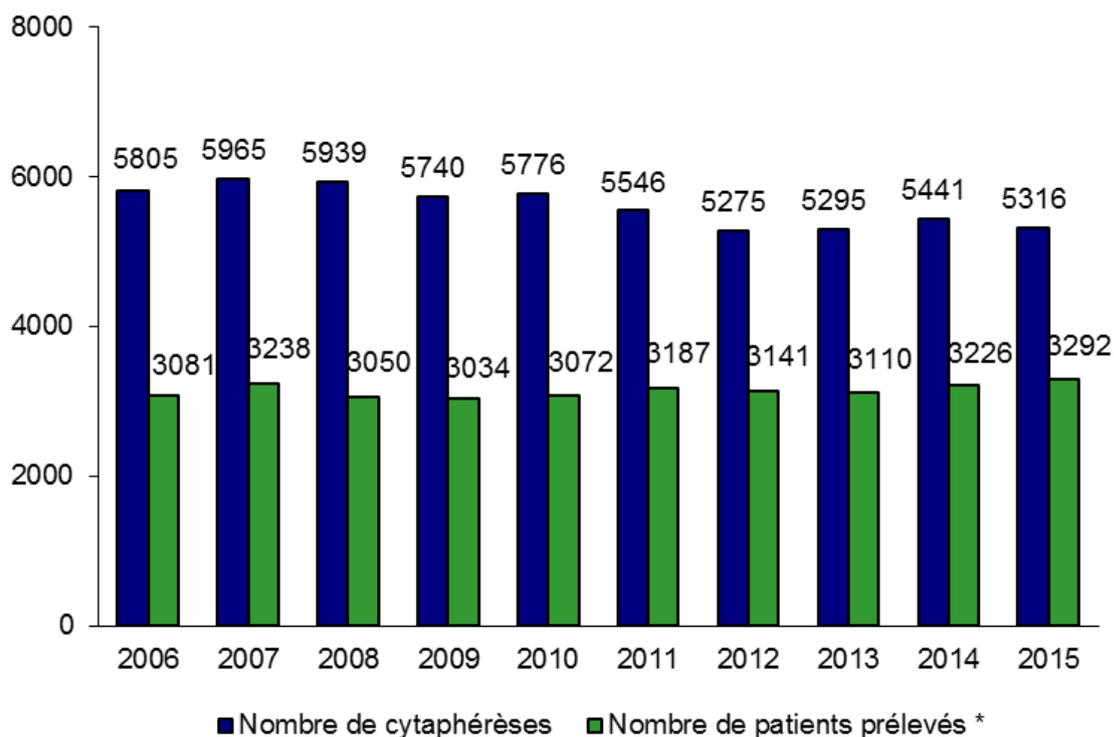


Figure 3 : Evolution de l'activité de cytophérèse en vue d'autogreffe (Bilan 2015) [10].

II.1. Indications

Dans 93% des cas, l'indication de l'autogreffe est une hémopathie maligne. Les syndromes lymphoprolifératifs sont largement majoritaires avec en premier lieu le myélome multiple (MM)



qui représente plus de la moitié des autogreffes pratiquées. Viennent ensuite la maladie de Hodgkin et les lymphomes non hodgkiniens (Figure 4).

Les cancers solides représentent uniquement 6,1% des indications d'autogreffe. Les tumeurs du système nerveux et les tumeurs germinales prédominent dans ce groupe. Les autres indications sont très minoritaires et regroupent essentiellement des pathologies auto-immunes (Figure 5).

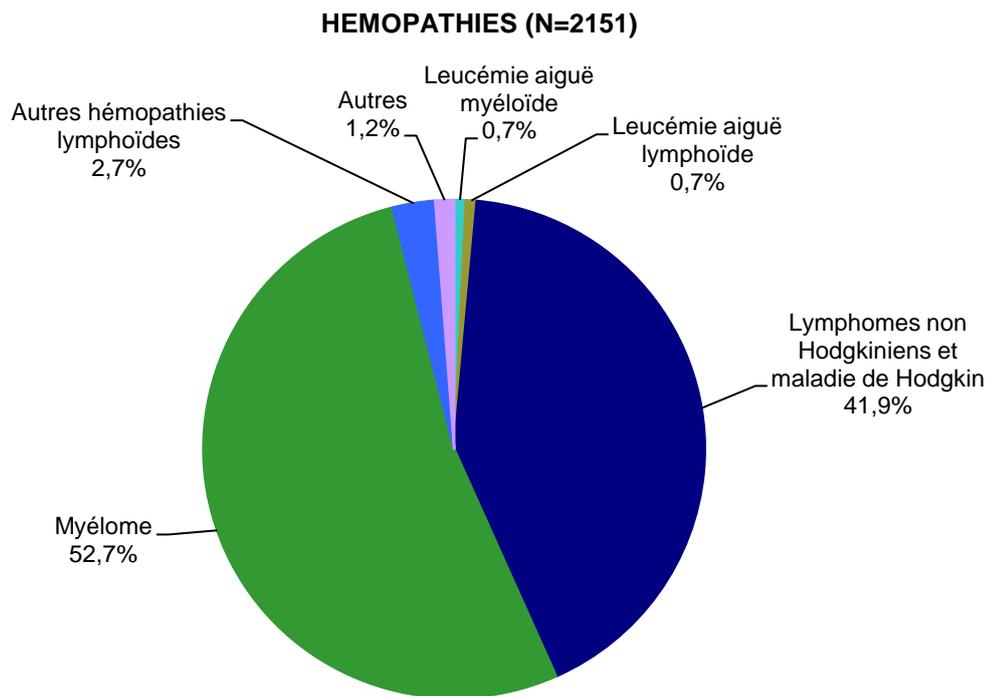


Figure 4 : Répartition des diagnostics chez les patients ayant eu une autogreffe en 2015 pour les hémopathies [10].

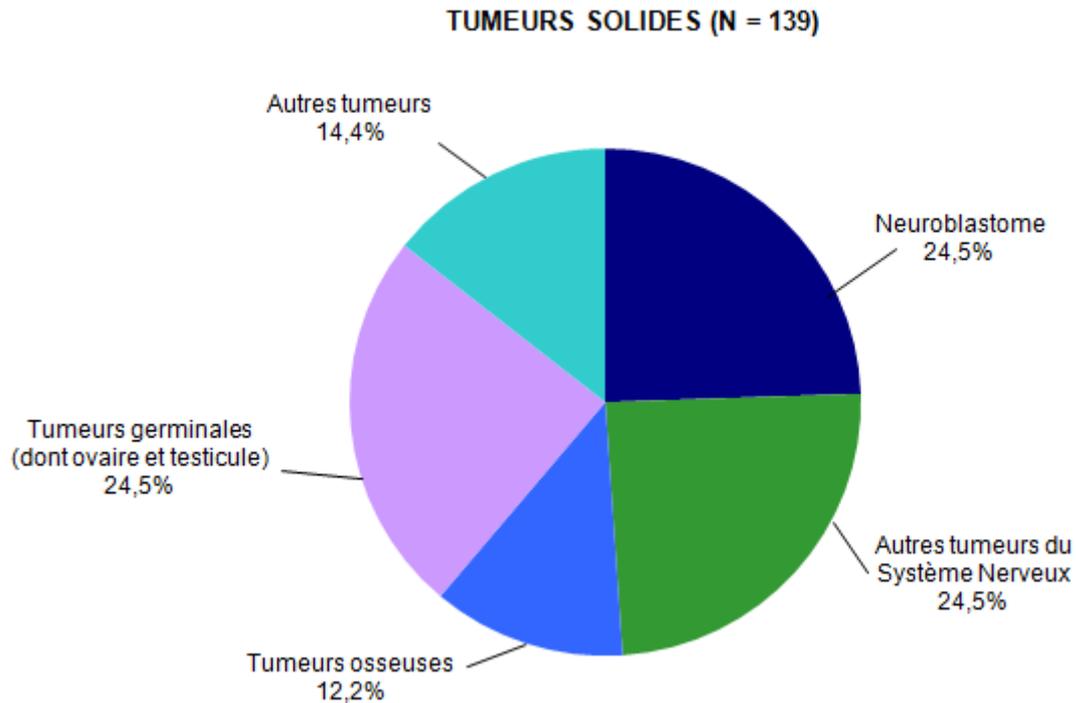


Figure 5: Répartition des diagnostics chez les patients ayant eu une autogreffe en 2015 pour les tumeurs solides [10].

II.1.1. Le myélome multiple

Dans le myélome multiple, l'autogreffe était initialement un traitement de rattrapage chez des patients en rechute ou réfractaires à la première ligne de traitement. Mais l'efficacité limitée des traitements conventionnels lui a permis de rapidement trouver une place importante dans cette indication [1][2]. Depuis les années 1990, le traitement de première ligne des patients jeunes (< 65 ans) atteints d'un myélome multiple, repose sur l'utilisation de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Elle fait suite à un traitement d'induction et d'un conditionnement par une chimiothérapie intensive : le cyclophosphamide à forte dose.

Ces dernières années, de nouvelles molécules ont été mises sur le marché dans le traitement du myélome multiple. Elles appartiennent aux familles des inhibiteurs du protéasome comme le bortezomib, et des immuno-modulateurs comme le thalidomide et le lenalidomide. Ces nouveaux traitements ont permis d'améliorer significativement le pronostic du myélome multiple et on fait remettre en question la place centrale de l'autogreffe dans le traitement de première ligne. Dans ce sens, deux essais cliniques de phase 3 ont mis en évidence une meilleure survie sans progression dans le bras utilisant l'autogreffe associée au traitement en première ligne par rapport à celui utilisant uniquement le traitement [11][12].



Ces essais cliniques ont permis de réaffirmer, malgré l'arrivée de ces nouvelles molécules, la place centrale occupée par l'autogreffe dans le traitement de cette pathologie.

II.1.2. Lymphomes

Selon le type de lymphome, l'autogreffe peut être indiquée en traitement de première ligne ou lors des rechutes.

Le lymphome à cellules du manteau (LCM) et le lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC) sont les seuls lymphomes pouvant bénéficier d'une autogreffe en première ligne de traitement (LCM du patient jeune [13], LBDGC de mauvais pronostic chez le sujet jeune [14]).

Dans les autres types de lymphomes, hodgkiniens ou non hodgkiniens, l'autogreffe trouve sa place lors des rechutes chimiosensibles ou en consolidation des lymphomes réfractaires à la première ligne de traitement.

II.2. Les critères de qualité de recueil de cellules souches périphériques

Des critères de qualité sont utilisés pour prédire une meilleure reconstitution hématologique, c'est-à-dire une sortie d'aplasie la plus précoce possible. Elle est objectivée sur l'hémogramme par une numération des polynucléaires neutrophiles supérieure à $0.5 \times 10^9/L$ et des plaquettes supérieure à $20 \times 10^9/L$.

II.2.1. Numération des cellules CD34+

La numération des cellules CD34+ est le critère le plus important durant tout le circuit d'autogreffe. C'est le marqueur phénotypique de choix des cellules progénitrices hématopoïétiques capables de relancer l'hématopoïèse. Cependant ce n'est pas un marqueur spécifique, le CD34 est également exprimé dans des cellules déjà engagées dans un processus de différenciation. Il permet néanmoins d'obtenir l'estimation la plus fiable des CSH.

La numération des cellules CD34+ est réalisée à plusieurs étapes du procédé :

- dans le sang du patient, avant le recueil, elle permet d'évaluer si la stimulation a été efficace et conditionne la réalisation de la cytophérèse
- dans la poche de cytophérèse issue du recueil, elle permet de déterminer si le prélèvement est suffisamment riche pour constituer un greffon
- dans le greffon décongelé, avant l'injection au patient, elle permet de vérifier que la richesse du produit est suffisante pour permettre une reconstitution hématologique optimale

La numération des cellules CD34+ se fait par cytométrie en flux. Cette technique a l'avantage d'être rapide et standardisée selon les recommandations de l'ISHAGE (the International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) [15][16].

Trois marqueurs sont utilisés : (1) le CD34, marqueur de population riche en cellules progénitrices, (2) le CD45, marqueur de tous les leucocytes, (3) le 7-AAD (7-Amino Actinomycine D), agent intercalant de l'ADN marqueur de la viabilité cellulaire. Des billes calibrées fluorescentes sont ajoutées à l'échantillon permettant d'obtenir directement le nombre de cellules CD34+ en valeur absolue (technique simple plateforme).

La population d'intérêt exprime le CD34, faiblement le CD45 et présente des caractéristiques de taille et de structure proche de celles des lymphocytes. Les cellules non viables, incapables de reconstitution hématologique, sont marquées par le 7-AAD et sont soustraites de cette population.

Le résultat est rendu en nombre de cellules CD34+ viables/ μL pour les prélèvements sanguins en pré-aphérèse. Pour les prélèvements des produits d'aphérèse, le résultat est normalisé par le poids du patient selon la formule suivante :

$$CD34 \text{ viables } \times 10^6 / \text{kg} = \frac{CD34 \text{ viables } (\mu\text{L}^{-1}) \times \text{volume de la poche } (\mu\text{L})}{\text{poids du patient } (\text{kg})}$$

Des seuils sont communément admis pour qualifier un recueil de bonne qualité. Il a été démontré qu'il existait une bonne corrélation entre le nombre de cellules CD34+ sanguines en pré-aphérèse et la quantité de cellules CD34+ collectées dans les produits d'aphérèse [17].

- Un taux de cellules CD34+ sanguines de 20/ μL paraît minimal pour débiter la cytaphérèse.

C'est la valeur nécessaire pour obtenir suite à une unique cytaphérèse de 2 à 2.5 x10⁶ cellules CD34+/kg, quantité minimum requise pour permettre une reconstitution hématologique satisfaisante suite à une autogreffe [18][19].

- Un greffon optimum contient entre 3 et 5 x10⁶ CD34+/kg. Pour le myélome, la valeur cible est de 6 x10⁶ CD34+/kg dans l'éventualité d'une double autogreffe.
- En pratique, la cytaphérèse peut être débutée à partir d'un taux supérieur à 10 CD34+/ μL mais ce taux n'est pas prédictif d'un recueil suffisant pour une autogreffe.
- Un taux inférieur à 10 CD34+/ μL est insuffisant pour programmer un recueil.



II.2.2. Numération des CFU-GM

La numération des CFU-GM (Colony Forming Unit-Granulo-Monocytic) peut aussi être utilisée, en complément de la numération des cellules CD34+, pour qualifier le greffon.

Les CFU-GM sont des colonies cellulaires issues de progéniteurs CD34+ capables de différenciations monocyttaire et/ou granulocytaire. Elles permettent de mettre en évidence la capacité des progéniteurs à se multiplier et à donner des cellules plus matures formant les colonies. Cette approche fonctionnelle représente des progéniteurs plus engagés dans la cascade de l'hématopoïèse que la CSH, donc potentiellement responsables d'une reprise plus précoce de l'hématopoïèse.

La numération des CFU-GM est réalisée par un test clonogénique en milieu semi-solide dans des conditions nutritives adaptées. Elle repose sur la capacité de ces cellules à produire, après une incubation de 14 jours à 37°C, avec 5% de CO₂, en atmosphère humide, une colonie de cellules matures définie comme un amas de plus de 50 cellules.

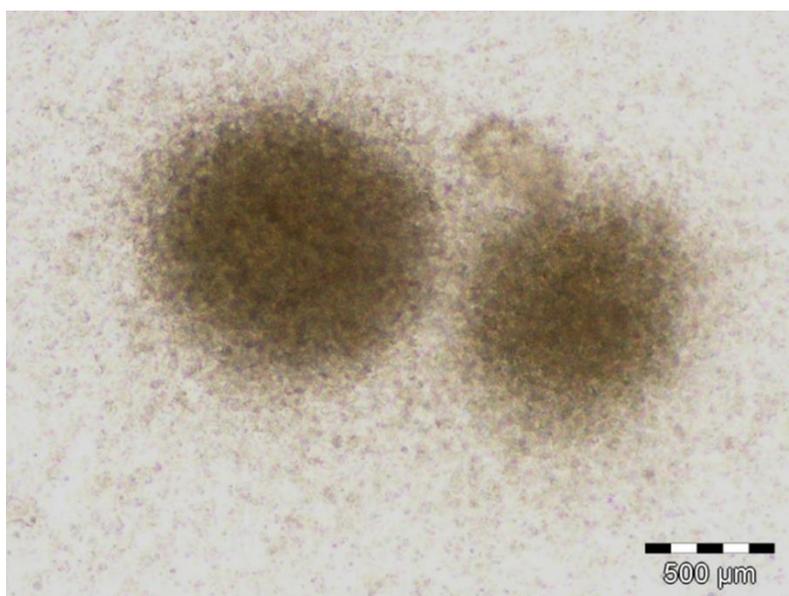


Figure 6: Culture de CFU-GM de 14 jours

Comme pour la numération des cellules CD34+, un seuil d'acceptabilité est établi ; il est de 45×10^4 CFU-GM/kg de poids corporel [19].

L'inconvénient majeur de ce critère de qualité est que le résultat de la culture de progéniteurs ne peut être disponible extemporanément pour débiter le recueil ni pour qualifier un greffon avant la réinjection des CSP lors de l'autogreffe.

II.2.3. Autres critères de qualité

- **Numération des produits de cytophérèse**

La numération des globules blancs, la formule leucocytaire et la numération plaquettaire sont également réalisées sur le greffon. Certaines études rapportent que ces paramètres peuvent avoir un impact sur la survie des CSH lors de la décongélation et sur la prise du greffon. Les marqueurs cités dans ces études sont les plaquettes, le nombre total de cellules nucléées et plus particulièrement les granulocytes [20][21].

- **Contrôle microbiologique, bactériologique et fongique des poches.**

Le prélèvement d'une paire d'hémocultures, aérobie et anaérobie, incubées pendant 10 jours permet de vérifier la stérilité du greffon afin d'assurer sa réinjection sans sur-risque infectieux chez le patient en aplasie.

II.3. Les protocoles de stimulation

Le protocole de mobilisation idéal est celui qui permet de recueillir les cellules souches périphériques en un minimum de cytophérèses, avec un rapport coût/efficacité optimal et entraînant le moins de complications possibles.

Il existe différents protocoles qui tendent à libérer les CSH de la moelle osseuse vers la circulation sanguine en modifiant de manière fugace le profil d'expression de protéines d'adhésion et les interactions entre les CSH et le microenvironnement médullaire. Le G-CSF est la molécule communément utilisée quel que soit le protocole.

II.3.1. Le « Steady-state » ou Etat basal

C'est le protocole standard de stimulation chez les donneurs sains dans le cadre des allogreffes faisant intervenir l'administration de facteur de croissance seul. En France, le G-CSF est utilisé. L'administration de facteur de croissance se fait à distance de la chimiothérapie. La dose administrée est de 10µg/kg/j en sous-cutané. Le pic de CSP est atteint le 5^{ème} jour, moment où le recueil est débuté [22].

L'augmentation de la posologie de G-CSF n'est pas préconisée du fait du surcoût et du risque de survenue d'effets indésirables comme un syndrome polyalgique ou, beaucoup plus rarement, une splénomégalie (pouvant aller jusqu'à une rupture de la rate) [23]. Cependant, des études ont démontré son intérêt chez les patients mauvais mobilisateurs en augmentant le rendement du recueil.[24].

Le moment de l'administration du G-CSF semble aussi avoir son importance dans la qualité de la cytophérèse. En effet, des études montrent que le rendement du recueil de CSP est



meilleur lorsque le G-CSF est administré trois heures avant la cytophérèse plutôt que la veille au soir [25].

Le G-CSF agit directement sur les CSH en augmentant leur prolifération et leur maturation. Il agit également sur le microenvironnement médullaire, favorisant le passage des CSH dans la circulation sanguine. Le mécanisme d'action du G-CSF au sein du microenvironnement médullaire est résumé dans la figure 7 et dans le tableau 1.

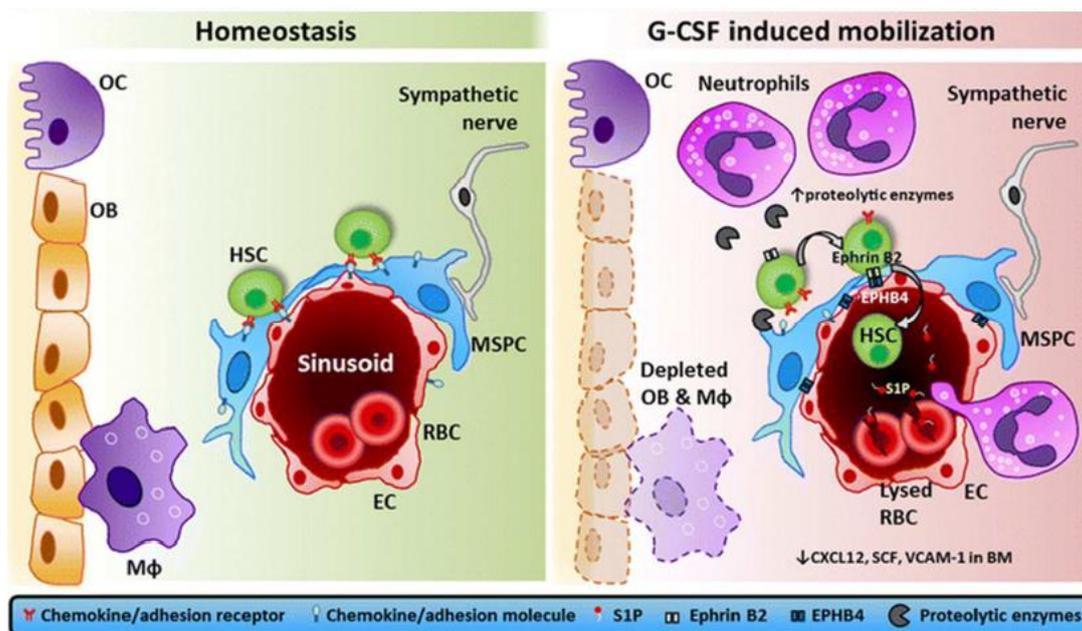


Figure 7 : Mécanisme d'action du G-CSF dans la mobilisation des CSH [9]

OC : ostéoclaste ; OB : ostéoblaste ; Mφ : macrophage ; HSC : cellule souche hématopoïétique ; MSPC : cellule mésenchymateuse ; RBC : érythrocyte ; EC : cellule endothéliale

Tableau 1 : Acteurs cellulaires de la mobilisation des CSH par le G-CSF [9]

Type cellulaire	A l'homéostasie	Lors de la mobilisation par G-CSF
Neutrophiles	Générés dans la moelle osseuse, action dans le sang et les tissus	Expansion dans la moelle osseuse. Relargage d'enzymes protéolytiques clivant les facteurs de rétention des CSH
Macrophages	Interaction directe avec les MSPC, EC, HSC.	Déplétion des macrophages, réduction de l'expression de CXCL12, SCF et VCAM-1 dans la moelle osseuse

	Induisent l'expression de CXCL12 (SDF-1), SCF et VCAM-1 sur les MSC	
<i>Ostéoclastes</i>	Assure le renouvellement osseux	Augmentation de la résorption osseuse
<i>Ostéoblastes</i>	Participe à la niche hématopoïétique, retient les CSH dans la moelle osseuse	Déplétion des ostéoblastes
<i>Cellules mésenchymateuses</i>	Retiennent les CSH dans la moelle osseuse. Sécrétion de CXCL12	Déplétion des cellules mésenchymateuses. Diminution de l'expression de CXCL12, SCF et VCAM-1
<i>Cellules endothéliales</i>	Contrôle le passage des cellules au travers de la barrière moelle osseuse/sang	Principales cellules productrices de G-CSF en réponse à un stress. Régule la migration trans-endothéliale par l'expression de EPHB4 et de l'ephrin B2
<i>Neurones sympathiques</i>	Régule l'expression de CXCL12 et VCAM-1 des cellules osseuses	Diminution de l'expression de CXCL12 et VCAM-1
<i>Globules rouges</i>	Apport d'oxygène, de nutriments et de molécules de signalisation dans la moelle osseuse	Hémolyse par activation du complément. Relargage sanguin de S1P (Sphingosine-1-Phosphate), lipide chimio-attractif pour les CSH

II.3.2. La chimio-mobilisation

Avant la découverte des facteurs de croissance et la synthèse de produits recombinants, la chimiothérapie était le seul moyen de mobilisation utilisé. En effet, il a été mis en évidence, dans le traitement des leucémies aiguës, une phase transitoire suivant la sortie d'aplasie durant laquelle le nombre de CSH dans la circulation sanguine augmentait. Ces CSH pouvaient donc être récupérées, conservées et être réinjectées ultérieurement. C'était les débuts de l'autogreffe [26][27].



De nos jours, la chimiothérapie est utilisée en association au G-CSF pour la mobilisation dans des protocoles définis en fonction des pathologies. L'addition d'une chimiothérapie de mobilisation présente des avantages par rapport à la mobilisation en « steady state » : elle maintient une activité antitumorale qui permet de réduire la contamination du greffon par des cellules malignes et elle potentialise l'action du G-CSF. Ceci se traduit par une augmentation du nombre de CSP mobilisées [28]. Une étude sur des souris déficientes en récepteur au G-CSF a démontré que les deux classes de molécules agissent selon le même type de mécanisme [29]. La stimulation par G-CSF consiste en un apport exogène en facteur de croissance, et la chimiothérapie aplasante, quant à elle, entraîne une sécrétion endogène de G-CSF. Ces deux mécanismes agissent donc en synergie pour favoriser la libération des CSH dans la circulation sanguine.

La chimio-mobilisation présente toutefois des inconvénients. Tout d'abord, le pic de CSH dans la circulation sanguine est moins prévisible qu'en « steady-state ». Il survient environ 12 jours après le début de la chimiothérapie en fonction des molécules utilisées, ce qui peut être gênant pour déterminer le début de la phase de recueil. Enfin, elle augmenterait le risque de neutropénie et d'infection [30].

Pour les patients atteints d'un myélome multiple, la molécule utilisée est le cyclophosphamide à forte dose [31]. Pour les lymphomes, l'utilisation d'une polychimiothérapie ciblée a montré sa supériorité face au cyclophosphamide [32][33].

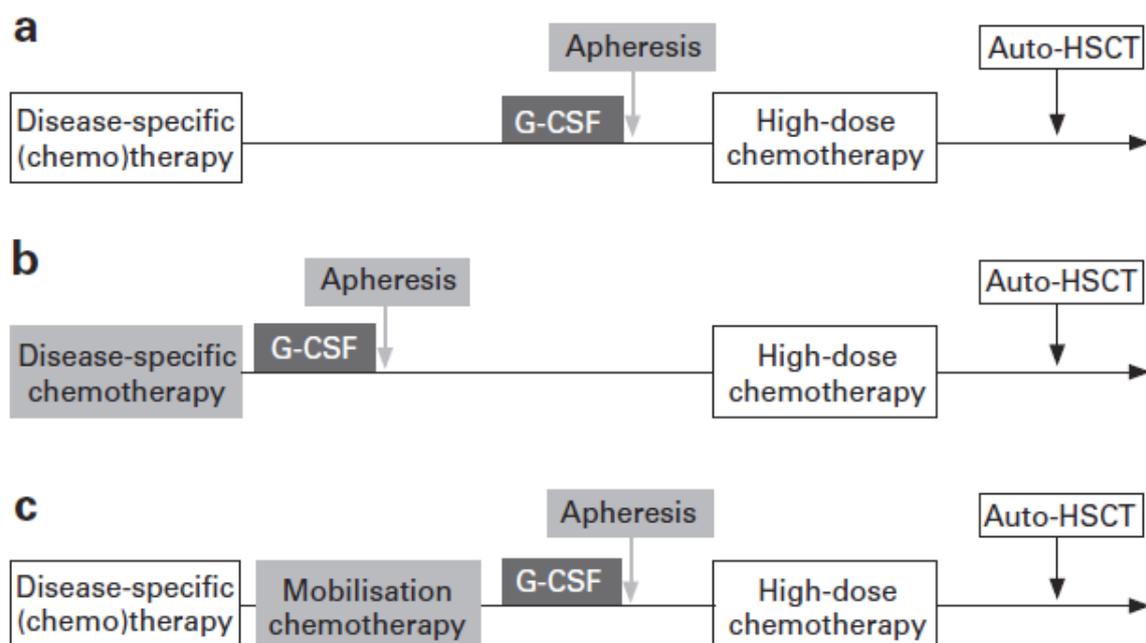


Figure 8 : Stratégies actuelles de mobilisation en autogreffe [34].

a/ Steady-state : Cytokines seules

b/ et c/ mobilisation basée sur la chimiothérapie spécifique d'une maladie ou chimiothérapie de mobilisation séparée.

Mobilisation/chimio spécifique de la maladie	Mobilisation / chimio séparée /traitement maladie	
Myélome multiple	cyclophosphamide	CAD: Cyclophosphamide, Doxorubicine, Dexaméthasone DPACE: Dexaméthasone, Cisplatine, Doxorubicine, Cyclophosphamide, Etoposide VTD-PACE: Bortézomib, Thalidomide, Dexaméthasone - Cisplatine, Doxorubicine, Cyclophosphamide, Etoposide ABVD: Doxorubicine, Bléomycine, Vinblastine, Dacarbazine. BEACOPP: Bléomycine, Etoposide, Doxorubicine, Cyclophosphamide, Vincristine, Procarbazine, Prednisone CHOP: Doxorubicine, Cyclophosphamide, Vincristine, Prednisone DA-EPOCH: Etoposide, Prednisone, Vincristine, Cyclophosphamide, Doxorubicine DHAP: Dexaméthasone, Ara-C, Cisplatine Dexa-BEAM: BCNU, Etoposide, Ara-C, Melphalan ESHAP: Etoposide, Méthyl prednisone, Ara-C, Cisplatine ICE: Ifosfamide, Carboplatine, Etoposide. IVE: Ifosfamide, Epirubicine, Etoposide. R-ACVBP: Doxorubicine, Bléomycine, Vindésine, cyclophosphamide, Bléomycine, Prednisone VIM: Etoposide, Ifosfamide, Mitoxantrone
CAD, DPACE, VTD-PACE		
Lymphome (LMNH, Hodgkin)	Etoposide	
ABVD, BEACOPP, (R)-CHOP, DA-EPOCH, (R)-DHAP, Carbo-DHAP, dexa-Beam, (R)-ESHAP, (R)-ICE, IVE, R-ACVBP, R-bendamustine, VIM		

Figure 9: Les différentes chimiothérapies de mobilisation en fonction des pathologies [34]

II.3.3. Le plerixafor

Le plerixafor est un antagoniste compétitif et sélectif du CXCR-4, récepteur de chimiokine présent à la surface des CSH. Il bloque sa liaison au SDF-1, chimiokine exprimée dans la moelle osseuse. En bloquant cette interaction, le plerixafor inhibe le phénomène de « homing » et favorise le passage des CSH de la moelle osseuse vers la circulation sanguine (Figure 10).



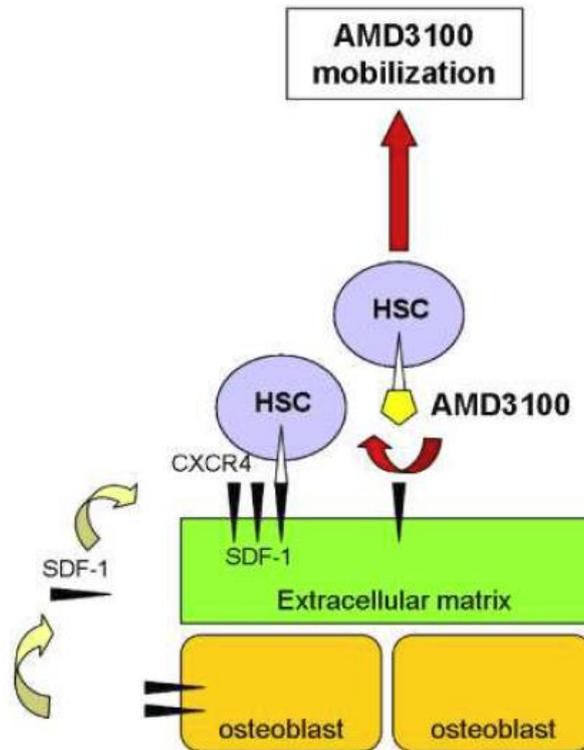


Figure 10: Mécanisme d'action de l'AMD3 100 (Plerixafor) [35].

Il a initialement été développé pour le traitement de l'infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). La GP-120 virale interagit avec le CD4 mais également avec un de ses corécepteurs (CCR5 et/ou CXCR4) afin de rentrer dans les cellules. En fonction du(des) co-récepteur(s) utilisé(s), des phénotypes viraux sont définis : virus R5, X4 ou R5/X4. Le plerixafor était donc une molécule envisagée dans le traitement du VIH pour les virus de phénotype X4 et R5/X4.

Dans les essais de phase 1, il a été mis en évidence une leucocytose et une augmentation du nombre de cellules CD34+ circulantes dans les 4 à 6 heures suivant l'injection [36]. Ceci a conduit à envisager son utilisation dans la stimulation pour le recueil de CSP.

Des essais cliniques de phase 3 ont démontré une synergie d'action avec le G-CSF dans la mobilisation de patients atteints de myélome multiple et de lymphomes, permettant ainsi d'augmenter le rendement de mobilisation et donc l'efficacité des cytophèreses. L'ajout du plerixafor permettrait de tripler le nombre de cellules CD34+ recueillies dix heures après son administration [37].

Le plerixafor possède une autorisation de mise sur le marché (AMM) depuis 2009 dans les autogreffes. Il a permis une réelle avancée dans le domaine en diminuant le pourcentage de

patients mauvais mobilisateurs comparé au G-CSF seul [38]. Il est également envisagé de l'utiliser associé au G-CSF et à une chimiothérapie de mobilisation [39].

Le plerixafor permet de recueillir des patients qui jusque-là se trouvaient en échec de mobilisation et ne pouvaient donc plus bénéficier d'une autogreffe. Cette molécule peut être utilisée en deuxième ligne chez les patients mauvais mobilisateurs ou en première intention chez les patients pour lesquels le risque d'échec de mobilisation est élevé avec les protocoles conventionnels. Son coût élevé impose cependant un rationnel d'utilisation.

II.4. Définition des patients mauvais mobilisateurs

Les patients mauvais mobilisateurs peuvent être définis de deux manières [40] :

- Nombre de cellules CD34+ circulantes inférieur à 10/ μ L avant l'aphérèse (échec de mobilisation) avec un protocole de mobilisation adapté
- Nombre de cellules CD34+ collectées inférieur à 2×10^6 /kg après trois cytophères consécutives (échec de recueil) [41].

Des facteurs prédictifs de mauvaise mobilisation ont été mis en évidence [42][43][40].

- Trois critères sont considérés comme majeurs :
 - antécédent d'échec lors d'une précédente mobilisation,
 - antécédent de radiothérapie étendue touchant un territoire médullaire.

La radiothérapie est toxique pour les CSH et le microenvironnement médullaire. Si une radiothérapie est nécessaire, il est préconisé de réaliser le recueil de CSP avant l'irradiation.

- antécédent de chimiothérapie affectant la mobilisation de CSH.

Une chimiothérapie myélotoxique est en cause dans la majorité des mauvaises mobilisations par altération des CSH et des niches hématopoïétiques. Les principaux agents impliqués sont les agents alkylants (melphalan, carmustine) et les analogues des purines (fludarabine). Le lenalidomide est également décrit comme facteur de mauvaise mobilisation après quatre cycles de chimiothérapie.

- D'autres critères dits mineurs, individuellement non prédictifs mais dont l'association peut être responsable d'une mauvaise mobilisation, sont également décrits. C'est le cas de l'âge supérieur à 65 ans, et du nombre de plaquettes inférieur à 150×10^9 /L au moment de la mobilisation. Viennent ensuite les facteurs liés à la maladie et à son traitement comme un envahissement médullaire par des cellules malignes, une pathologie réfractaire ou déjà traitée par au moins deux lignes de chimiothérapie.



Les facteurs prédictifs de mauvaise réponse sont donc liés à l'état de santé du patient et à sa pathologie. Cependant, même chez les donneurs sains, une mauvaise mobilisation est observée à hauteur de 5%, sans facteur de risque apparent. Cela peut être dû à un polymorphisme génétique d'une molécule d'adhésion (VCAM-1) ou d'une chimiokine (SDF-1) impliquée dans les interactions des CSH avec le stroma médullaire [44].

II.5. Le circuit de l'autogreffe

L'indication de l'autogreffe est posée au cours d'une réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP). Le calendrier ainsi que les modalités de l'autogreffe sont fixés lors d'une RCP spécifique de l'autogreffe.

Deux consultations préalables, avec un médecin du service de greffe (consultation pré-greffe) et un médecin de l'établissement français du sang (EFS) (consultation pré-aphérèse), sont nécessaires pour expliquer au patient le parcours et le principe de l'autogreffe. Lors de ces consultations, des bilans biologique et cardiaque sont réalisés afin d'exclure toute contre-indication à la cytophérèse. Le capital veineux est également vérifié pour définir les voies d'abord possibles pour la pose des cathéters. La voie périphérique est privilégiée car présente le moins de risques infectieux.

II.5.1. Mobilisation et recueil

Le protocole de mobilisation est choisi en fonction de la pathologie, des comorbidités du patient et des pratiques du service de greffe.

Le matin du recueil, la numération des cellules CD34+ dans le sang du patient permet de déterminer si la mobilisation a été efficace et si les paramètres hématologiques permettent la réalisation du recueil. La cytophérèse entraîne la perte d'éléments cellulaires associés, il est donc nécessaire d'avoir des seuils transfusionnels pour prévenir une défaillance circulatoire ou hémorragique.

La cytophérèse permet de prélever le sang du patient, de séparer les différents éléments constitutifs en fonction de leurs propriétés physiques par une centrifugation en flux continu, d'extraire la couche leuco-plaquettaire riche en éléments d'intérêt et d'extraire des éléments d'intérêts. Après avoir recueilli ces derniers dans une poche (produit de cytophérèse), le sang est finalement réinjecté au patient. Dans l'autogreffe, le but est d'obtenir des produits de cytophérèse riches en CSH.

Si tous les paramètres sont corrects, la cytophérèse peut débuter. La durée de la procédure est d'environ 4 heures. Elle se termine par l'obtention d'une poche contenant les produits du recueil. Un échantillon de ce produit de cytophérèse est analysé pour estimer la richesse en CSH (numération des cellules CD34+ dans le produit de cytophérèse avant transformation).



En moyenne, la cytophérèse permet de recueillir 50% des cellules CD34+ circulantes. Si la richesse est suffisante, la procédure de recueil prend fin. Si ce n'est pas le cas, cette opération peut être réitérée jusqu'à 4 jours consécutifs selon le même principe.

II.5.2. Conservation, décongélation et autogreffe

Les poches contenant les produits de cytophérèse sont traitées par centrifugation pour :

- Diminuer leur volume et ainsi permettre une meilleure conservation des CSH. Elles peuvent également être fractionnées en fonction de la quantité de cellules CD34+.
- Diminuer le nombre de plaquettes (déplaquettisation) pour les recueils contenant plus de 400×10^9 de plaquettes par poche de cytophérèse selon un protocole adapté [45]. La réduction du contenu en plaquettes permettrait de réduire les pertes de cellules CD34+ viables à la décongélation.

Les CSH sont mises en suspension dans du diméthylsulfoxyde (DMSO), agent cryoconservateur qui permet de maintenir la viabilité des cellules à la décongélation en empêchant la formation de cristaux de glace.

Les greffons ainsi obtenus sont cryoconservés dans des cuves d'azote liquide jusqu'à l'étape d'autogreffe proprement dite. Les produits de recueil sont séparés au minimum en deux poches pour être conservés dans des cuves différentes.

Le délai entre le recueil et l'autogreffe est variable, de quelques jours à quelques mois. Si cette période est assez longue, le patient peut recevoir une chimiothérapie additionnelle pour prévenir une évolution de la maladie.

Une fois la date de l'autogreffe fixée, un protocole d'intensification est programmé. Une chimiothérapie à forte dose est ainsi débutée avant l'autogreffe. Les greffons sont décongelés extemporanément et directement réinjectés par perfusion au patient. Des contrôles de qualités sont réalisés en parallèle pour vérifier la teneur en cellules CD34+ et l'absence de contamination microbiologique sur le produit décongelé.

Ce traitement d'intensification avec autogreffe entraîne une aplasie nécessitant une hospitalisation en secteur protégé et une surveillance médicale rapprochée jusqu'à la sortie d'aplasie.



III. Etude

L'objectif de ce travail est d'analyser les paramètres biologiques suivis au cours des différentes étapes du processus d'autogreffe afin d'identifier les facteurs influençant la mobilisation, le rendement à la décongélation des progéniteurs (cellules CD34+ et CFU-GM) contenus dans les produits de cytophérèse et la sortie d'aplasie.

III.1. Patients et méthode

III.1.1. Patients

Cette étude est rétrospective, monocentrique, menée au laboratoire d'Hématologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Toulouse sur le site de l'Institut Universitaire du Cancer (IUC). Deux cohortes sont analysées :

- **Une cohorte de recueil** : constituée de patients d'âge supérieur ou égal à 18 ans pour lesquels au moins un recueil de CSP a été réalisé en vue d'une autogreffe entre janvier 2014 et décembre 2016.
- **Une cohorte de décongélation et de réinjection des CSP** : constituée de patients d'âge supérieur ou égal à 18 ans pour lesquels un ou plusieurs greffons ont été décongelés pour autogreffe entre octobre 2014 et février 2017.

III.1.2. Méthode

III.1.2.1 Recueil des données

Les extractions de données ont été réalisées à partir du système informatique de laboratoire (MOLIS).

Les données de recueil ont été extraites à partir des demandes de numération de cellules CD34+ sanguines. Au sein de cette cohorte, les numérations de cellules CD34+ prescrites à visée diagnostique (myélofibrose primitive) ainsi que les données de recueils d'allogreffe ont été exclues. Les données de décongélation ont été extraites à partir des échantillons de greffons décongelés envoyés par le service de thérapie cellulaire de l'EFS. Les données des greffons d'allogreffe ont été exclues de notre cohorte.

L'ensemble des données biologiques des cycles de cytophérèse, de décongélation et de sortie d'aplasie ont été extraites à l'aide du logiciel MOLIS. Ces données ont ensuite été colligées dans le logiciel Excel.

Pour chaque patient, nous avons recueilli les données suivantes :

- L'âge



- Le sexe,
- La pathologie divisée en 5 groupes :
 - Myélome : regroupant les myélomes multiples mais également les plasmocytomes, les leucémies à plasmocytes et les syndromes « Polyneuropathy, Organomegaly, Endocrinopathy, Monoclonal protein, Skins changes » (POEMS Syndrome),
 - LNH : les lymphomes non hodgkiniens,
 - Maladie de Hodgkin,
 - LA : regroupant les leucémies aiguës myéloïdes et lymphoblastiques,
 - Autres : cancers solides (tumeurs germinales ou neuroendocrines), sclérodermies,
- Le délai entre le recueil de CSP et l'autogreffe. Lorsque pour une même greffe, les produits de cytophérèse de plusieurs recueils sont utilisés le délai retenu est celui entre l'autogreffe et le recueil le plus ancien,
- Les données de recueils :
 - Les données de pré-aphérèse (paramètres sanguins avant le recueil de CSP) : Leucocytes (/ μ L), numération des cellules CD34+ en % et en valeur absolue (/ μ L),
 - Les données de post-aphérèse (paramètres biologiques des poches de cytophérèse) :
 - avant la transformation de la poche de cytophérèse : numération des cellules CD34+ ($\times 10^6$ /kg), volume de la poche de cytophérèse numération formule leucocytaire et numération plaquettaire,
 - après transformation de la poche de cytophérèse : numération des cellules CD34+ ($\times 10^6$ /kg), numération des CFU-GM ($\times 10^4$ /kg), volume de la poche et numération leucocytaire et plaquettaire,
- Les données de décongélation :
 - Numération des cellules CD34+ ($\times 10^6$ /kg) du greffon et leur pourcentage de récupération à la décongélation,
 - Numération des CFU-GM ($\times 10^4$ /kg) du greffon et leur pourcentage de récupération à la décongélation,



- Numération leucocytaire et plaquettaire.

Pour certaines autogreffes, le greffon étant de richesse insuffisante pour une reconstitution hématologique optimale, un autre greffon a dû être décongelé le jour même ou le lendemain de la première réinjection. Les résultats sont alors analysés de la manière suivante :

- Dans la partie décongélation : les greffons sont analysés de manière indépendante afin de caractériser la décongélation de chaque produit de cytophérèse,
- Dans la partie sortie d'aplasie : les données de décongélation des greffons sont regroupées de la manière suivante :
 - Somme des numérations des paramètres biologiques étudiés (cellules CD34+, CFU-GM, plaquettes, leucocytes, ...),
 - Moyenne des pourcentages de récupération des progéniteurs (cellules CD34+ et CFU-GM).
- Les données de sortie d'aplasie :
 - Délai nécessaire (en nombre de jours) pour obtenir un taux de polynucléaires neutrophiles $> 0,5 \times 10^9/L$ dans le sang,
 - Délai nécessaire (en nombre de jours) pour obtenir un taux de plaquettes $> 20 \times 10^9/L$.

III.1.2.2 Analyse des données

Les cohortes ont tout d'abord été caractérisées à l'aide de statistiques descriptives.

Nous avons ensuite utilisé des tests statistiques univariés afin d'étudier la significativité des différents paramètres étudiés (seuil de significativité $p=0.05$). Les différents tests utilisés sont :

- Pour les données de recueils et de décongélation des CSP
 - Test de Kruskal-Wallis : variables continues analysées par catégories. Si le test est significatif, il est suivi d'un test post hoc de Dunn de comparaisons multiples afin d'identifier les groupes statistiquement différents.
 - Test de Fisher : comparaison de la répartition de deux groupes de données non quantitatives
 - Test de Mann Withney : comparaison de deux groupes de données quantitatives
- Pour les données de sortie d'aplasie
 - Test du Logrank : comparaison des courbes de sortie d'agranulocytose

III.2. Les données de recueil de cellules souches périphériques

III.2.1. Description des données

Les données générales de recueil de cellules souches périphériques sont présentées en Annexe 1.1.

Un cycle de cytophérèse débute dès lors qu'un dosage de cellules CD34+ dans le sang périphérique en pré-cytophérèse est demandé, même si aucune cytophérèse n'est réalisée par la suite.

Un cycle de recueil comprend au maximum quatre cytophérèses réalisées sur quatre jours consécutifs.

323 patients ont été inclus dans la cohorte de recueil : 194 hommes et 129 femmes (sexe ratio de 1.50 H/F).

L'âge moyen est de 53 ans (extrêmes : 18-69 ans, âge médian : 56 ans). Les patients atteints de maladie de Hodgkin et de leucémie aiguë sont en moyenne plus jeunes, respectivement 33 et 40 ans.

La majorité des cycles de recueils sont réalisés pour la catégorie des myélomes multiples : 194 cycles (50%) pour 164 patients, suivis par les lymphomes non hodgkiniens : 116 cycles (30%) pour 101 patients et hodgkiniens : 32 cycles (8%) pour 25 patients. Ensuite, avec 22 cycles (6%) pour chacune des deux catégories restantes, nous retrouvons les leucémies aiguës et les indications « Autres » (Figure 5).

La répartition au cours des 3 années étudiées est la suivante (Annexe 1.2) :

- **2014** : 129 cycles de recueil : 53 (41%) pour des myélomes multiples, 51 (40%) pour des lymphomes non hodgkiniens, 11 (8%) pour des maladies de Hodgkin, 9 (7%) pour des leucémies aiguës et 5 (4%) pour des pathologies de la catégorie « Autres ».
- **2015** : 139 cycles de recueil : 71 (51%) pour des myélomes multiples, 40 (29%) pour des lymphomes non hodgkiniens, 13 (9%) pour des maladies de Hodgkin, 10 (7%) pour des leucémies aiguës et 5 (4%) pour des pathologies de la catégorie « Autres ».
- **2016** : 118 cycles de recueil : 70 (59%) pour des myélomes multiples, 25 (21%) pour des lymphomes non hodgkiniens, 8 (7%) pour des maladies de Hodgkin, 3 (3%) pour des leucémies aiguës et 12 (10%) pour des pathologies de la catégorie « Autres ».



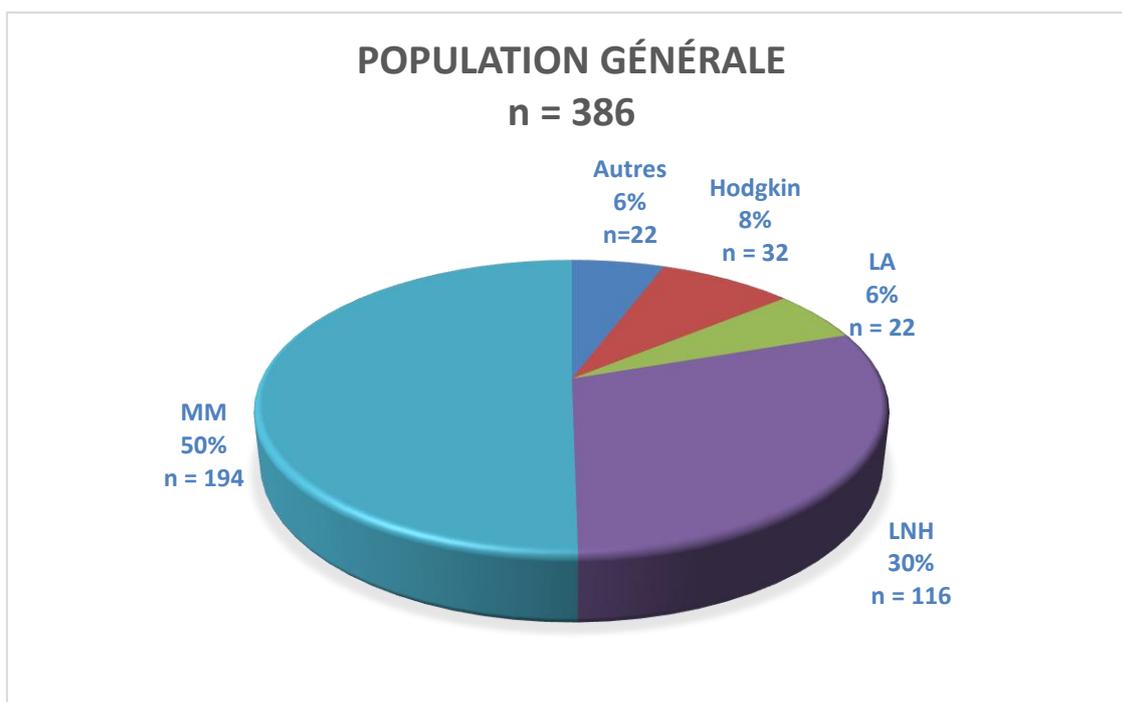


Figure 11: Répartition des indications des cycles de recueils de CSP de la cohorte sur les 3 années étudiées

Au total, sur l'ensemble de la période, 595 procédures de recueil ont été réalisées pour 386 cycles de recueil.

Soit en moyenne 1.84 recueils par patient (extrêmes : 0 à 6 recueils) répartis au cours de 1 à 3 cycles de recueil, soit 1.19 cycles par patient en moyenne.

Ces variations s'expliquent par l'existence de patients mauvais mobilisateurs, nécessitant plusieurs cycles de recueil pour obtenir un greffon, mais aussi par la nécessité de réaliser plusieurs autogreffes sur la période étudiée chez certains patients (rechutes).

Dans le cas où la numération des cellules CD34+ sanguines en pré-aphérèse est inférieure à 10 / μ L, le recueil ne peut être réalisé. Certains patients difficilement mobilisables nécessiteront jusqu'à 6 recueils de CSP répartis sur 2 à 3 cycles différents de cytophérèse. D'autres, ne sont pas mobilisables malgré les différentes stratégies employées, aucun recueil n'est alors possible.

Quelle que soit la pathologie pour laquelle l'autogreffe est indiquée, un ou deux recueils de CSP sont suffisants pour atteindre l'objectif fixé dans la majorité des cas (78% des cycles). En revanche, 10% des stimulations ne peuvent pas donner lieu à un recueil (Tableau 2).

Tableau 2 : Nombre de recueils par cycle de cytophèrese et par pathologie

		<i>Total</i>	<i>MM</i>	<i>LNH</i>	<i>Hodgkin</i>	<i>LA</i>	<i>Autres</i>
		<i>n = 386</i>	<i>n = 194</i>	<i>n = 116</i>	<i>n = 32</i>	<i>n = 22</i>	<i>n = 22</i>
		<i>(100%)</i>	<i>(100%)</i>	<i>(100%)</i>	<i>(100%)</i>	<i>(100%)</i>	<i>(100%)</i>
Nombre de recueils par cycle de cytophèrese	0	39 (10%)	18 (9%)	8 (7%)	5 (16%)	7 (32%)	1 (5%)
	1	147 (38%)	63 (33%)	63 (54%)	8 (25%)	4 (18%)	9 (41%)
	2	154 (40%)	86 (44%)	37 (32%)	14 (44%)	8 (36%)	9 (41%)
	3	44 (11%)	25 (13%)	8 (7%)	5 (15%)	3 (14%)	3 (14%)
	4	2 (1%)	2 (1%)	/	/	/	/

III.2.2. Résultats

III.2.2.1 Paramètres sanguins avant cytophèrese

Les paramètres sanguins avant cytophèrese sont présentés en Annexe 1.3.

La numération moyenne globale des cellules CD34+ est de 53/ μ L (médiane : 31/ μ L) (Figure 12).

L'analyse de ces paramètres sanguins avant le recueil de CSP (en pré-aphèrese) montre une hétérogénéité importante au sein de la population, plus particulièrement pour la numération des cellules CD34+ circulantes.



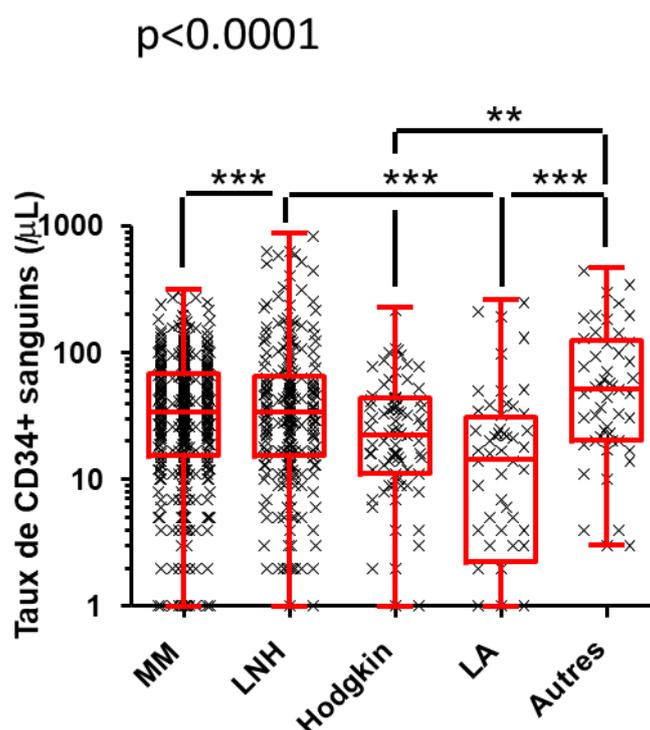


Figure 12 : Taux de CD34+ en pré-aphérèse en fonction de l'indication

Les 595 recueils de notre étude ont été classés en fonction de l'indication. Les moyennes par groupe de pathologies sont les suivantes : groupe MM (n=318) : 47/µL (médiane : 33/µL) ; groupe LNH (n=161) : 70/µL (médiane : 33/µL) ; groupe Hodgkin (n=51) : 32/µL (médiane : 22/µL) ; groupe LA (n=29) : 29/µL (médiane : 14/µL) ; groupe des indications « Autres » (n=36) : 83/µL (médiane : 50/µL).

Test de Kruskal-Wallis p<0.0001 test post-hoc de Dunn pour comparaisons multiples : * p<0.05 ; ** p<0.01 ; *** p<0.001

Des patients que nous qualifierons de « super-mobilisateurs », très sensibles à la mobilisation, atteignent des numérations de cellules CD34+ circulantes bien supérieures à la moyenne générale. De ce fait, les médianes sont plus appropriées pour refléter les résultats de la cohorte et seront utilisées pour la suite des résultats.

Les leucémies aiguës présentent des taux de cellules CD34+ significativement plus bas que les autres hémopathies avec une médiane de 14 cellules CD34+/µL (sous le seuil optimal de recueil : 20/µL) (Figure 12).

La médiane des concentrations sanguines en leucocytes est de 29.64 x10⁹/L. Dans le groupe des leucémies aiguës, la médiane est également plus basse : 18.81 x10⁹/L.

Ainsi, selon les données recueillies, les leucémies aiguës sont les indications d'autogreffe présentant les paramètres biologiques les moins favorables pour un recueil de CSP.

III.2.2.2 Paramètres biologiques en post-aphérèse avant transformation

Les paramètres biologiques des produits de cytophérèse sont présentés en Annexe 1.4.

- **Cellules CD34+ collectées dans les produits de cytophérèse en fonction du jour de cycle**

Le jour 1 du cycle correspond au jour du premier dosage de cellules CD34+ dans le sang. Dans la plupart des cas, c'est également le jour du premier recueil. Cependant, pour certains patients, le recueil ne peut avoir lieu le premier jour, soit à cause d'un taux de CD34+ circulants insuffisant, soit pour une raison autre.

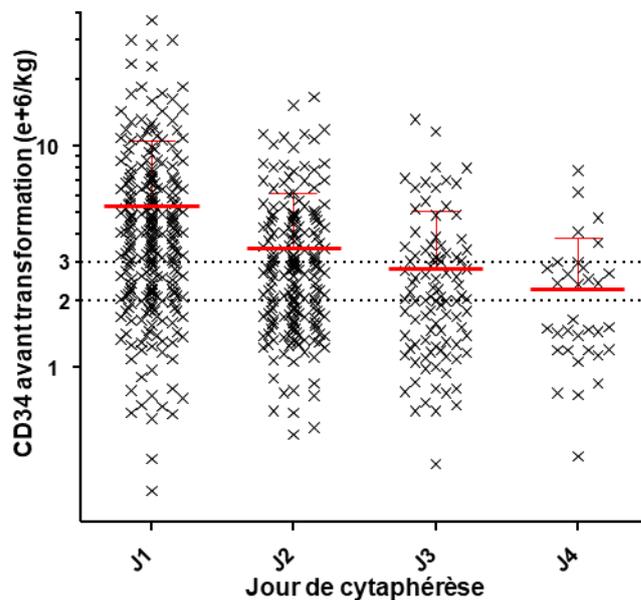


Figure 13 : Taux de CD34+ collectées avant transformation en fonction du jour de cytophérèse.

Au sein de la cohorte de 323 patients étudiés (595 recueils au cours de 386 cycles), 35% de cycles ont nécessité un recueil à J2, 16% un recueil à J3 et 6% un recueil à J4.

La numération des cellules CD34+ semble diminuer au fur et à mesure des jours de recueils. (Figure 13). Ceci est essentiellement artéfactuel et lié à la combinaison de plusieurs mécanismes aboutissant à la chute du taux de CD34+ au cours du temps :

- les meilleurs donneurs n'ont besoin que d'une cytophérèse pour atteindre l'objectif et ne sont donc plus comptabilisés les autres jours
- les patients peuvent voir leur recueil du dernier jour raccourci lorsqu'il ne manque qu'une petite quantité de CD34+ pour atteindre l'objectif



- seuls les plus mauvais donneurs nécessitent 4 jours de recueils

A J1 du cycle de recueil, le taux moyen de CD34+ est de $5.5 \times 10^6/\text{kg}$ (médiane : $4 \times 10^6/\text{kg}$). A J4, il n'est plus que de $2.15 \times 10^6/\text{kg}$ (médiane à $1.95 \times 10^6/\text{kg}$).

La numération des cellules CD34+ sur les produits de cytophérèse avant transformation n'est par conséquent pas dépendante du jour de cycle durant lequel la cytophérèse est réalisée mais dépend des caractéristiques propres au patient [46].

- **Description des données biologiques des produits de cytophérèse avant transformation (Annexe 1.4.1)**

- *Cellules CD34+*

- *Par recueil*

La valeur médiane de la concentration de cellules CD34+ dans les produits de cytophérèse avant transformation est de $2.90 \times 10^6/\text{kg}$.

- Par cycle de recueil

La valeur médiane de la concentration en cellules CD34+ collectées sur l'ensemble des recueils d'un cycle de cytophérèse est de $5.56 \times 10^6/\text{kg}$.

Pour la majorité des pathologies, l'objectif optimal de recueil par cycle est de 3 à $5 \times 10^6/\text{kg}$ à l'exception des myélomes multiples ($6 \times 10^6/\text{kg}$ en vue d'une double autogreffe). Dans notre cohorte, ces objectifs sont respectés : pour les myélomes multiples, la médiane est de $6.41 \times 10^6/\text{kg}$ (Annexe 2).

- Leucocytes

La concentration médiane de leucocytes contenus dans les produits de cytophérèse est de $86 \times 10^9/\text{L}$. La médiane la plus basse est retrouvée pour les lymphomes non hodgkinien ($76.41 \times 10^9/\text{L}$) et la plus haute pour les maladies de Hodgkin et les pathologies « Autres » ($101 \times 10^9/\text{L}$).

- Formule leucocytaire

Une formule leucocytaire est également réalisée au microscope, à partir d'un frottis du produit de cytophérèse. Quel que soit la pathologie, la formule leucocytaire est comparable, avec en moyenne : 7% de polynucléaires neutrophiles, 12% de myélémie (granuleux immatures), 35% de monocytes et 46% de lymphocytes.

- Plaquettes

La concentration médiane de plaquettes contenues dans les produits de cytophérèse est de $847 \times 10^9/L$. La médiane varie cependant du simple au double en fonction de la pathologie : $555 \times 10^9/L$ pour les lymphomes non hodgkiniens et $1130 \times 10^9/L$ pour les myélomes multiples.

III.2.2.3 Relation entre les paramètres de pré-aphérèse et de post-aphérèse avant transformation

La relation entre les paramètres sanguins en pré-aphérèse et la numération des cellules CD34+ des produits de cytophérèse est également étudiée sur l'ensemble des recueils.

III.2.2.3.1. Leucocytes sanguins avant le recueil et CD34+ contenus dans les produits de cytophérèse

Nous n'avons pas observé de corrélation entre la numération des leucocytes sanguins avant le recueil et celle des cellules CD34+ sur les produits de cytophérèse ($r^2 = 6 \times 10^{-3}$).

De plus, nous observons un effet dépendant du taux de leucocytes (Figure 14) :

- Valeurs basses de leucocytes (de 1 à $49 \times 10^9/L$) : plus les leucocytes sanguins augmentent, plus la moyenne de cellules CD34+ collectées diminue : de 6 à $3 \times 10^6/kg$.
- Valeurs élevées de leucocytes ($\geq 50 \times 10^9/L$) : plus les leucocytes augmentent, plus la moyenne de cellules CD34+ collectées est élevée : de 3 jusqu'à $5 \times 10^6/kg$.

La moyenne de recueil de cellules CD34+collectées est d'ailleurs significativement plus élevée dans le groupe des leucocytes sanguins de 1 à $9.9 \times 10^9/L$ comparée à celles des groupes de 20 à $69.99 \times 10^9/L$.

Les leucocytes sanguins, pourtant utilisés historiquement pour signer l'efficacité de la mobilisation, ne représentent pas à eux seuls un bon marqueur pour prédire le nombre de cellules CD34+ collectées dans les produits de cytophérèse.



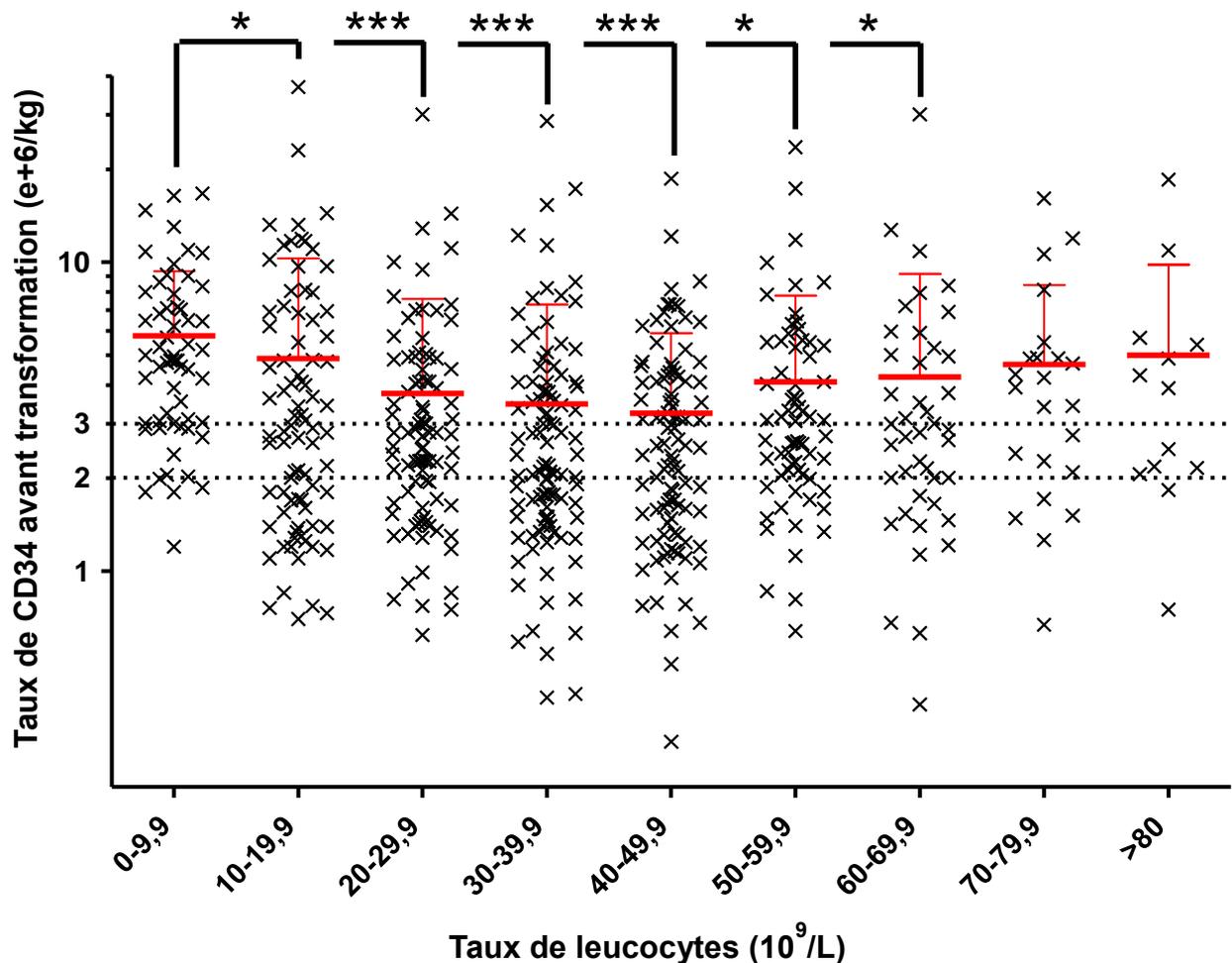


Figure 14 : Taux de CD34+ recueillis en fonction des leucocytes sanguins.

Les 595 recueils de la cohorte d'étude ont été classés selon le taux de leucocytes sanguins mesuré le jour du recueil. 10% des recueils réalisés avec une numération de leucocytes avant le recueil $<10 \times 10^9/L$, 6% réalisés avec une numération des leucocytes avant le recueil $\geq 70 \times 10^9/L$ (les barres rouges représentent la moyenne et l'écart-type de chaque groupe).

Test de Kruskal-Wallis $p < 0.0001$ test post-hoc de Dunn pour comparaisons multiples : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

III.2.2.3.2. CD34+ circulants avant recueil et CD34+ contenus dans les produits de cytophèrese.

Contrairement à ce que nous avons pu observer avec les leucocytes sanguins en pré-aphérèse, il existe une corrélation entre la numération des cellules CD34+ sur les produits de cytophèrese et la numération des cellules CD34+ circulantes en pré-aphérèse.

- **CD34+ en pré-aphérèse (valeur absolue)**

La corrélation est significative ($r^2 = 0.736$) entre la numération des cellules CD34+ circulantes en pré-aphérèse ($/\mu L$) et celles contenues dans les produits de cytophèrese (Figure 15).

Cette corrélation a permis, dans la littérature, de définir le seuil de 20 cellules CD34+/ μL en pré-aphérèse, souhaitable pour obtenir un produit de cytophérèse d'une richesse en cellules CD34+ de 2 à 2.5×10^6 /kg [47].

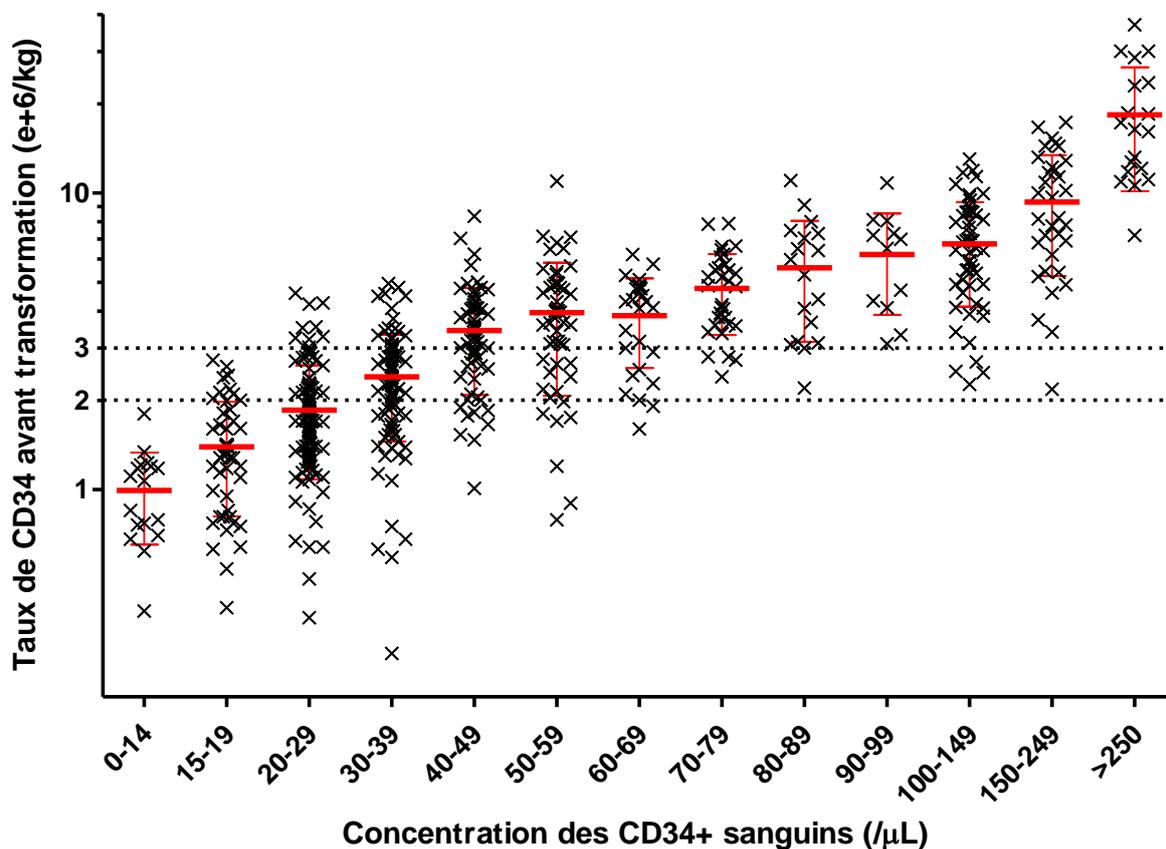


Figure 15 : Cellules CD34+ collectées dans les produits de cytophérèse en fonction de la concentration des CD34+ sanguins en pré-aphérèse (μL)

Les 595 recueils de la cohorte d'étude ont été groupés selon la concentration sanguine des cellules CD34+ (μL) mesurée le jour du recueil.

18% réalisés avec une concentration $\geq 100/\mu\text{L}$,

48% des recueils sont de richesse en cellules CD34+ supérieure à $3 \times 10^6/\text{kg}$, 31% sont de richesse inférieure à $2 \times 10^6/\text{kg}$.

11% des recueils réalisés avec une concentration avant le recueil $< 20/\mu\text{L}$,

Test de Kruskal-Wallis $p < 0.001$ test post-hoc de Dunn pour comparaisons multiples : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Annexe 3).

- **CD34+ en pré-aphérèse (%)**

La corrélation est plus faible avec les cellules CD34+ circulantes (%) en pré-aphérèse ($r^2 = 0.367$) (Figure 16).

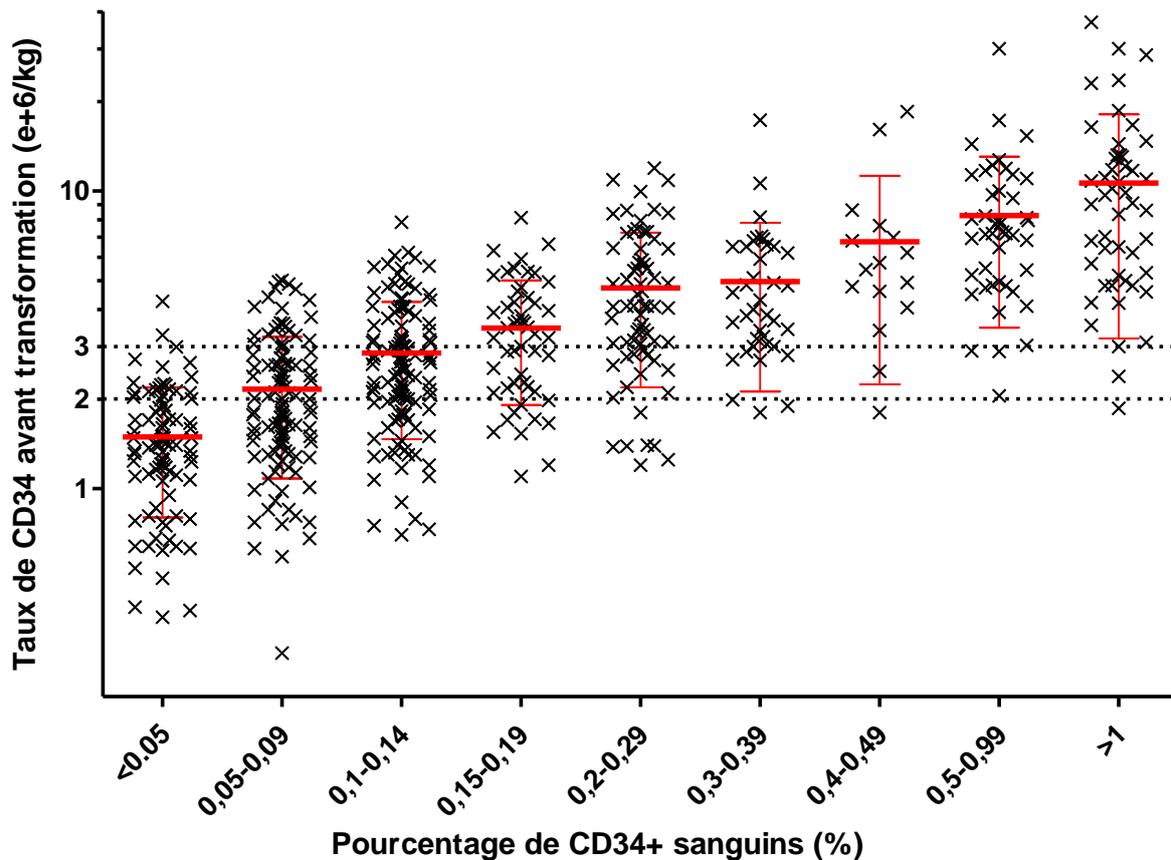


Figure 16 : Cellules CD34+ contenues dans les produits de cytophèrese en fonction du pourcentage de cellules CD34+ en pré-aph rese

Test de Kruskal-Wallis $p < 0.001$ test post-hoc de Dunn pour comparaisons multiples : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ (Annexe 3).

- **CD34+ circulants permettant de recueillir un produit de cytophèrese de $2 \times 10^6/kg$**
 - Seuil de $20/\mu L$

Les recueils réalisés avec une numération supérieure à cette valeur seuil ($n=516$) permettent d'obtenir des produits de cytophèrese contenant en moyenne $4.46 \times 10^6/kg$ cellules CD34+ (médiane : $3.16 \times 10^6/kg$). En revanche, les recueils réalisés avec une numération proche du seuil (20 et 29 cellules CD34+ / μL) ne permettent pas d'obtenir des produits de cytophèrese de richesse suffisante (moyenne : $1.88 \times 10^6/kg$) (Figure 17).

Avec ce seuil, 76% des recueils sont de richesse suffisante ($>2 \times 10^6/kg$) et 55% de richesse optimale ($>3 \times 10^6/kg$).



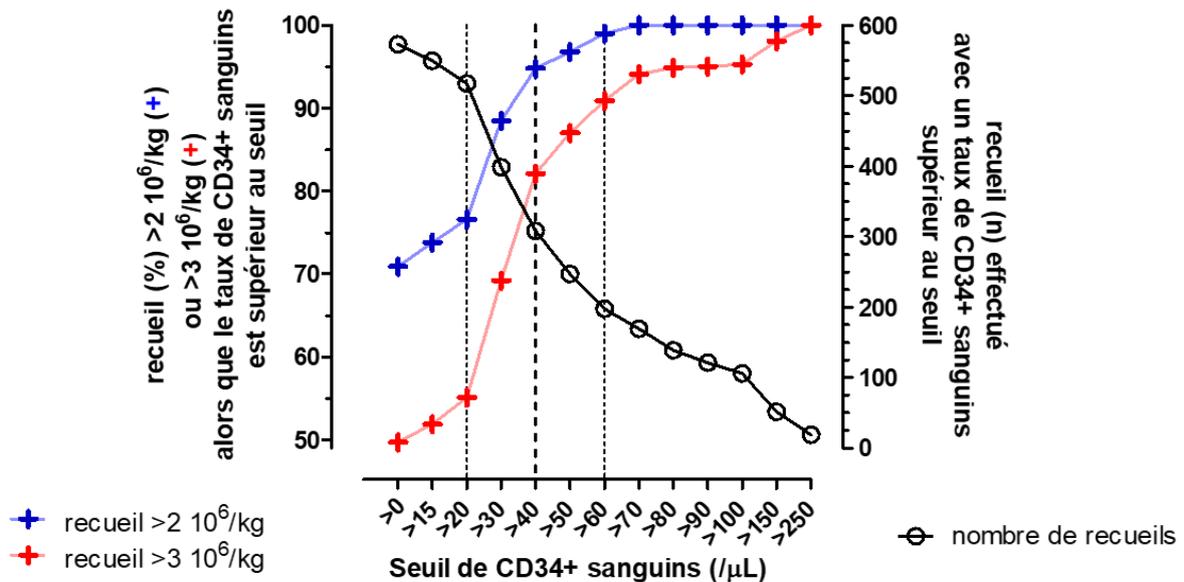


Figure 17 : Seuil de CD34+ circulants permettant des recueils > 2 x10⁶/kg et >3 x10⁶/kg

Seuil 20/μL (n=517) : 76% (n=396) des recueils >2 x10⁶/kg (richesse suffisante pour une autogreffe) ; 55% (n=285) des recueils >3 x10⁶/kg (richesse optimale)

Seuil 40/μL (n=308) : 95% (n=308) des recueils de richesse suffisante ; 82% (n=253) de richesse optimale.

- Seuil de 40/μL

Avec ce seuil, ce sont 95% des recueils qui sont de richesse suffisante et 82% de richesse optimale. C'est-à-dire qu'il y a une forte probabilité pour qu'un seul recueil de CSP soit nécessaire en vue d'une autogreffe.

De plus, quand le taux de CD34+ circulants est supérieur à 40/μL, le lendemain, il est toujours supérieur à 20/μL, permettant si nécessaire un second recueil.

- **CD34+ en pré-aphérèse < 20/μL**

63 recueils ont été réalisés à des taux faibles de CD34+ circulants, seulement 8 (12%) ont permis d'obtenir une richesse suffisante. Lorsque la numération des cellules CD34+ en pré-aphérèse est inférieure à 15/μL, le nombre de cellules CD34+ collectées ne dépasse jamais la valeur seuil de recueil de 2 x10⁶ /kg.

Outre le critère de bonne mobilisation de 20 cellules CD34+/μL, les valeurs que l'on peut considérer comme prédictives sont :

- 15/μL : valeur prédictive d'un recueil insuffisant
- 40/μL : valeur prédictive d'un recueil suffisant (95%)

III.2.2.4 Mauvais mobilisateurs

III.2.2.4.1. Définitions des patients mauvais mobilisateurs

Les patients mauvais mobilisateurs peuvent être définis de deux façons :

- **Echec de mobilisation** = patients « mauvais mobilisateurs » : numération de cellules CD34+ sanguines en pré-aphérèse insuffisante pour permettre un recueil de cellules souches périphériques.
- **Echec de recueil** = patients « mauvais donneurs » : quantité de cellules CD34+ contenues dans les produits de cytophérèse après un cycle de recueil insuffisante en vue d'une autogreffe.

La définition la plus complète des patients « mauvais mobilisateurs » tient compte des deux paramètres : les patients n'ayant jamais eu de numération des cellules CD34+ circulantes $\geq 20/\mu\text{L}$ et pour lesquels la somme des cellules CD34+ collectées au cours d'un cycle est $< 2 \times 10^6/\text{kg}$.

Les patients peuvent être classés de la manière suivante :

- Cellules CD34+ circulantes $< 10/\mu\text{L}$: mauvais mobilisateurs
- $10/\mu\text{L} \leq$ Cellules CD34+ circulantes $< 20/\mu\text{L}$: potentiels mauvais mobilisateurs (valeur des cellules CD34+ circulantes non prédictive)
- CD34 $> 20/\mu\text{L}$: bon mobilisateurs

Pour les potentiels mauvais mobilisateurs, le nombre de cellules CD34+ totales contenues dans les produits de cytophérèse en fin de cycle définira s'il s'agit d'un bon ou d'un mauvais mobilisateur :

- $\geq 2 \times 10^6/\text{kg}$ = bon mobilisateur
- $< 2 \times 10^6/\text{kg}$ = mauvais mobilisateur

Tableau 3: Patients « mauvais mobilisateurs »

	Total	MM	LNH	Hodgkin	LA	Autres
	<i>n=323</i>	<i>n=164</i>	<i>n=101</i>	<i>n=25</i>	<i>n=15</i>	<i>n=18</i>
<i>Patients</i>	38 patients	17 patients	11 patients	4 patients	5 patients	1 patient
<i>« mauvais mobilisateurs »</i>	(12%)	(10%)	(11%)	(16%)	(33%)	(6%)



Patients « bon mobilisateurs »	285	147	90 patients	21 patients	11 patients	17 patients
	patients	patients	(89%)	(84%)	(67%)	(94%)
	(88%)	(90%)				

Selon cette définition globale, 38 patients (12% de la population générale) sont considérés comme mauvais mobilisateurs. Ce pourcentage est légèrement plus élevé pour les maladies de Hodgkin (16%) et pour les LA (33%) (Tableau 3).

III.2.2.4.2. Facteurs prédictifs de mauvaise mobilisation

Parmi les facteurs prédictifs de mauvaise mobilisation, nous avons étudié l'influence de la pathologie, du sexe, de l'âge et de la numération plaquettaire au premier jour du cycle.

Pour analyser ces facteurs de risques, nous avons comparé les paramètres des cycles de recueil de bonne mobilisation et ceux de mauvaise mobilisation selon notre définition globale des patients mauvais mobilisateurs.

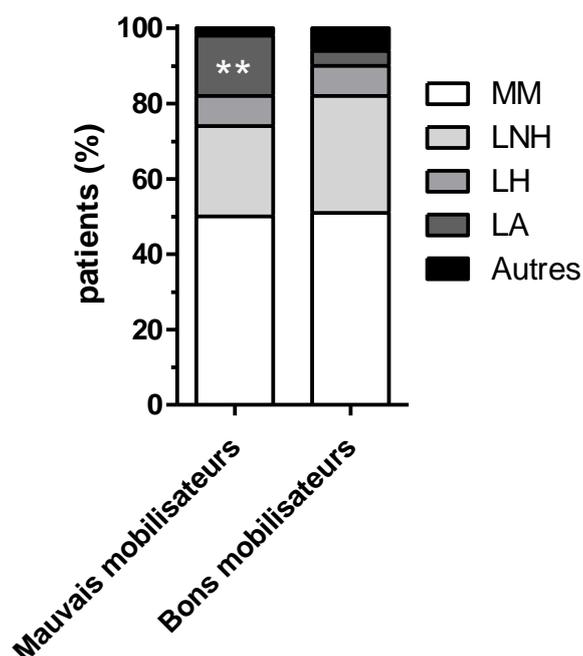


Figure 18 : Facteur prédictif de mauvaise mobilisation : la pathologie.

Cycles de patients mauvais mobilisateurs (n=48 cycles) : groupe LA : 21% (n=8)

Cycles de patients bons mobilisateurs (n=331 cycles) : groupe LA : 4% (n= 14)

Test de Fisher p= 0,0027 pour le groupe des leucémies aiguës comparé aux autres groupes.

La pathologie peut être considérée comme un critère de mauvaise mobilisation. En effet, les leucémies aiguës sont les indications les plus à risque de mauvaise mobilisation (p=0.0027) (Figure 18).

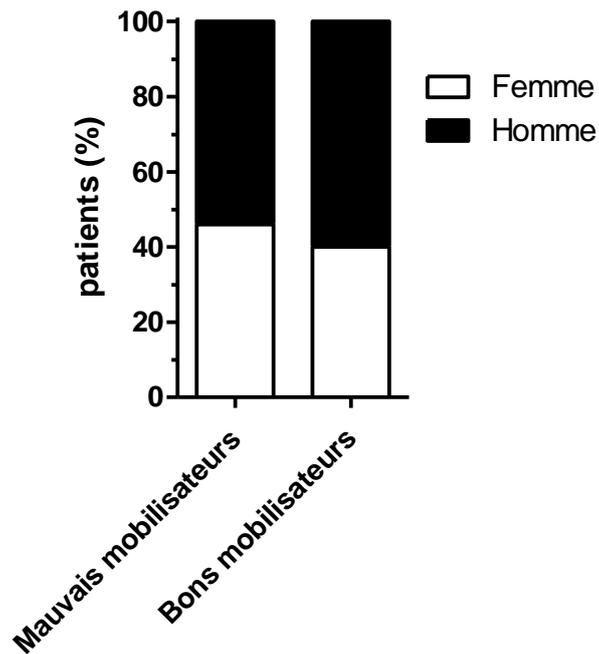


Figure 19 : Facteur prédictif de mauvaise mobilisation : le sexe

Cycles de patients mauvais mobilisateurs (n=48 cycles) : 26H/22F (sexe ratio : 1.18 H/F)

Cycles de patients bons mobilisateurs (n=331 cycles) : 201H/137F (sexe ratio : 1.47 H/F)

Test de Fisher p= 0.48.

Le sexe n'est pas un facteur prédictif de mauvaise mobilisation (p=0.48) (Figure 19).

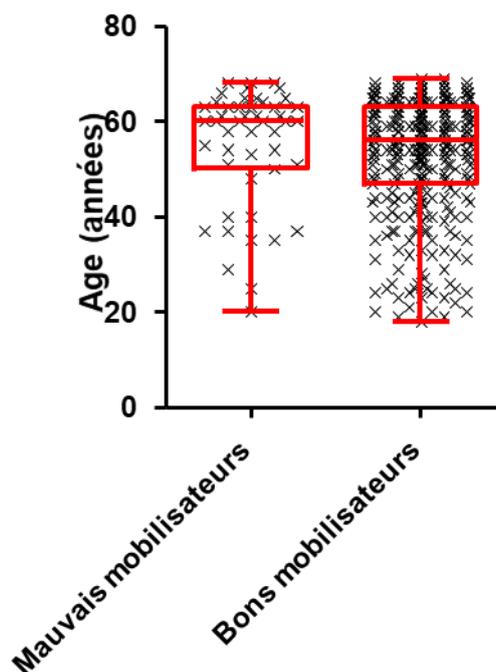


Figure 20 : Facteur prédictif de mauvaise mobilisation : l'âge du patient



Cycles de patients mauvais mobilisateurs (n=48 cycles) : médiane : 60 ans ; moyenne : 54.9 ans.
Cycles de patients bons mobilisateurs (n=331 cycles) : médiane : 56 ans, moyenne : 52.8 ans.
Test de Mann-Withney : p=0.15

L'âge n'est pas un facteur prédictif du mauvaise mobilisation (p=0.15) (Figure 20).

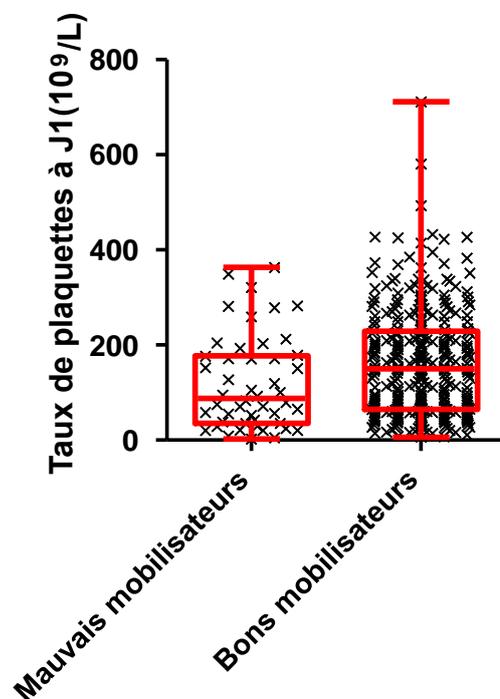


Figure 21 : Facteur prédictif de mauvaise mobilisation : numération plaquettaire au premier jour du cycle.

Cycles de patients mauvais mobilisateurs (n=48 cycles) : médiane : 87.5 x10⁹/L ; moyenne : 119.6 x10⁹/L.

Cycles de patients bons mobilisateurs (n=331 cycles) : médiane : 150 x10⁹/L ; moyenne : 162.5 x10⁹/L.

Test de Mann-Withney : p=0.0057

La numération plaquettaire (taux diminué) au premier jour du cycle de mobilisation est un facteur prédictif de mauvaise mobilisation (p= 0.0057) (Figure 21).

Parmi les facteurs étudiés de mauvaise mobilisation, les leucémies aiguës et la numération plaquettaire au premier jour de cycle sont ceux ayant un impact significatif sur notre cohorte.

Leur influence sur la mobilisation est toutefois à pondérer. En effet, dans la littérature leur influence est décrite mais ce ne sont pas des facteurs indépendants de mauvaise mobilisation [40].

III.2.2.5 Etape de transformation

L'étape de transformation réalisée avant la cryoconservation, en réduisant le volume, entraîne des variations dans la composition des produits de cytophérèse. Nous avons par conséquent étudié la relation entre les différents paramètres biologiques sur les produits de cytophérèse avant et après transformation (Annexe 1.4).

- **Evolution du taux de cellules CD34+**

La corrélation qui existe entre ces deux paramètres nous permet d'estimer la perte moyenne en cellules CD34+ au cours de cette étape.

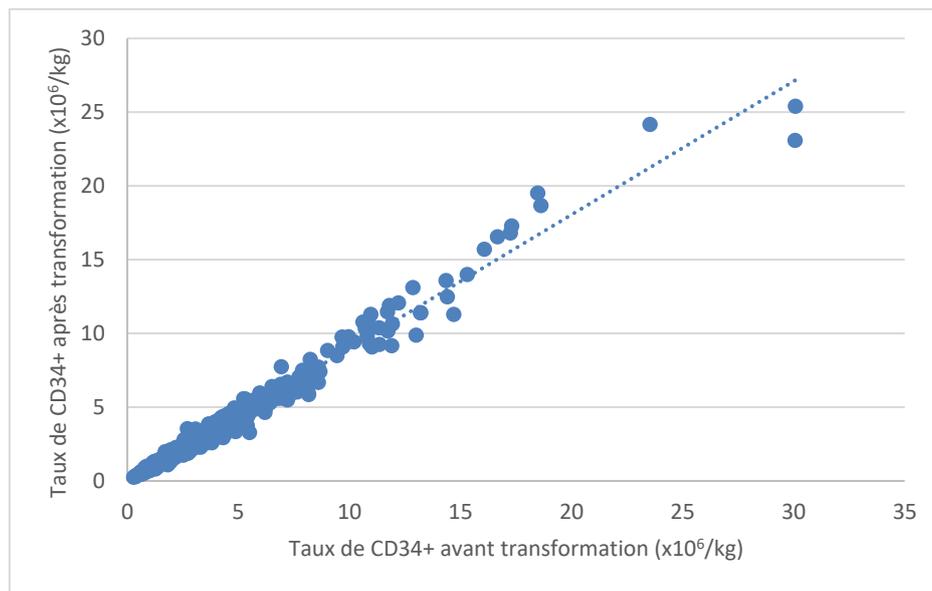


Figure 22 : Numération des cellules CD34+ après transformation en fonction de leur numération avant transformation.

La relation entre le taux de CD34+ avant transformation et après transformation est étudiée sur l'ensemble des 595 recueils de la cohorte. Il y a une excellente corrélation entre ces deux paramètres ($r^2 : 0.9779$).

Le pourcentage moyen de récupération des cellules CD34+ après la transformation est de 89% quel que soit la pathologie à l'origine du recueil (Annexe 1.4 et Figure 22).

Cette perte de progéniteurs (11% en moyenne) est à prendre en compte pour atteindre l'objectif fixé au moment de l'autogreffe.

- **Evolution des leucocytes**

La valeur médiane des leucocytes avant transformation est de 27.58×10^9 , celle après transformation est de 25.98×10^9 . Le pourcentage de récupération à la transformation est de 93%.



La perte de leucocytes (7%) lors de cette étape est inférieure à celle des progéniteurs (11%).

- ***Evolution des plaquettes***

La valeur médiane avant transformation des plaquettes est de 266×10^9 et celle après transformation est de 233×10^9 . Le pourcentage de récupération des plaquettes est de 86%.

Actuellement, au cours de cette étape de transformation, la réduction du nombre de plaquettes est un objectif (déplaquettisation des produits de cytophérèse) car une numération est supérieure à 400×10^9 /cytophérèse entraîneraient une baisse de la récupération des CSP au cours de la décongélation selon la littérature [45].

Sur la période de notre étude, l'étape de déplaquettisation n'était pas encore mise en place. Il sera intéressant d'évaluer dans une seconde partie, l'impact des plaquettes sur la récupération des progéniteurs.

Notre cohorte présente 192 (32%) produits de cytophérèse contenant plus de 400×10^9 de plaquettes avant transformation.



III.2.2.6 Corrélation CFU-GM et cellules CD34+ après transformation

Les CFU-GM n'étant quantifiés que sur les produits de cytophérèse après transformation, on ne peut étudier le pourcentage de récupération de ce paramètre lors de cette étape.

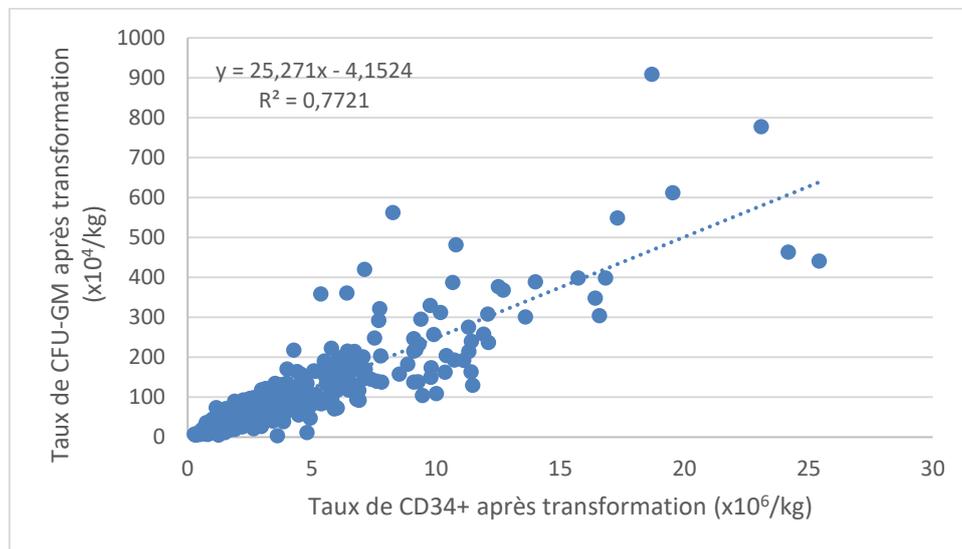


Figure 23 : CFU-GM après transformation en fonction des cellules CD34+ après transformation

La relation entre le taux de CFU-GM après transformation et le taux de CD34+ après transformation est étudié sur 586 recueils de la cohorte ($r^2 : 0.7721$).

Néanmoins, nous remarquons qu'il existe une corrélation entre les CFU-GM après transformation et les cellules CD34+ après transformation ($r^2 = 0.7721$) (Figure 23).



III.3. Les données de décongélation de cellules souches périphériques

La seconde étape étudiée du processus de conservation des greffons de cellules souches périphériques est celle de la décongélation des produits de cytophérèse avant l'autogreffe.

Toutes les données de décongélation des greffons des patients adultes sur la période d'Octobre 2014 à Février 2017 ont été récupérées. Les recueils antérieurs à ceux présents dans la première partie de l'étude ont également été intégrés.

Un greffon de cellules souches périphériques est constitué d'une ou de plusieurs poches de cytophérèse (fractionnement des produits de cytophérèse) avec pour objectif un nombre de cellules CD34+ total supérieur à la valeur souhaitée.

Outre la numération des cellules CD34+ et des CFU-GM contenus dans le greffon, le rendement à la décongélation est également étudié.

Il s'agit du pourcentage de progéniteurs viables contenus dans le greffon après la décongélation par rapport à la quantité initiale contenue dans le produit de cytophérèse après transformation. L'objectif minimum de rendement est fixé à 50% par le service de thérapie cellulaire de l'EFS, en charge de la préparation et de la conservation des produits de cytophérèse. Tout pourcentage de récupération des cellules CD34+ inférieur à ce seuil impose une déclaration auprès de l'Agence Régionale de Santé (ARS).

Dans cette seconde partie, nous analyserons ces données de décongélation afin d'identifier les paramètres pouvant potentiellement l'influencer.

III.3.1. Description des données

Les paramètres biologiques de décongélation des produits de cytophérèse sont présentés en Annexe 4.

249 greffons ont été décongelés pour 215 patients :

- 144 dans le groupe myélome multiple (130 patients),
- 48 dans le groupe lymphome non hodgkinien (48 patients),
- 21 dans le groupe maladie de Hodgkin (17 patients),
- 8 greffons dans le groupe leucémie aiguë (8 patients),
- 28 greffons dans le groupe des indications « Autres » (14 patients).

Certains patients ont nécessité la décongélation de plusieurs greffons (2 ou 3). Il s'agit :

- de patients ayant bénéficié de 2 voire 3 autogreffes sur la durée de l'étude (n=11) (rechutes),



- de patients pour lesquels la richesse des greffons décongelés est insuffisante pour permettre la réalisation d'une autogreffe dans des conditions optimales (n=12 patients appartenant au groupe des myélomes multiples).

Les valeurs médianes de progéniteurs contenus dans les produits de cytophérèse après décongélation sont respectivement (Annexe.4.1) :

- Cellules CD34+ : $2.08 \times 10^6/\text{kg}$
- CFU-GM : $62.2 \times 10^4/\text{kg}$

Ces valeurs sont supérieures aux seuils recommandés pour l'autogreffe (respectivement de $2 \times 10^6/\text{kg}$ et $45 \times 10^4/\text{kg}$).

III.3.2. Résultats

La décongélation induit une perte cellulaire parfois importante. L'ensemble des données recueillies va être analysé afin de définir quels paramètres auraient une influence sur le rendement de décongélation.

- **Cellules CD34+**

Les valeurs médianes de numération des cellules CD34+ sur les produits de cytophérèse après décongélation sont les suivantes :

- groupe myélome multiple : $1.94 \times 10^6/\text{kg}$,
- groupe des indications « Autres » : $1.97 \times 10^6/\text{kg}$,
- groupe maladie de Hodgkin : $2.52 \times 10^6/\text{kg}$,
- groupe leucémie aiguë : $2.54 \times 10^6/\text{kg}$,
- groupe lymphome non hodgkinien : $2.64 \times 10^6/\text{kg}$.

Le pourcentage moyen de récupération après décongélation sur la population générale est de 61%.

- **CFU-GM**

Les valeurs médianes de numération des CFU-GM sur les produits de cytophérèse après congélation sont les suivantes :

- groupe myélome multiple : $45.7 \times 10^4/\text{kg}$,
- groupe maladie de Hodgkin : $54.2 \times 10^4/\text{kg}$,
- groupe des indications « Autres » : $56.25 \times 10^4/\text{kg}$,
- groupe leucémie aiguë : $57.5 \times 10^4/\text{kg}$,



- groupe lymphome non hodgkinien : $77.25 \times 10^4/\text{kg}$.

Le pourcentage moyen de récupération après décongélation sur la population générale est de 68%.

- **Leucocytes**

La médiane des leucocytes sur les produits de cytophérèse est de 31.9×10^9 .

La décongélation entraîne une perte très faible de leucocytes, la récupération moyenne est de 97%.

- **Plaquettes**

La médiane des plaquettes sur les produits de cytophérèse est de 220×10^9 .

La décongélation entraîne une perte importante de plaquettes. La récupération moyenne est de 66%. Elle ne diffère pas en fonction des groupes de pathologies.

Cette étape de décongélation entraîne donc principalement une perte de progéniteurs (cellules CD34+ et CFU-GM) ainsi que de plaquettes.

La formule leucocytaire n'étant pas réalisée sur les greffons après décongélation, la perte de polynucléaires neutrophiles ne peut pas être caractérisée. Elle devrait cependant être minime compte tenu de la faible perte de leucocytes au cours du processus de décongélation.

III.3.2.1 Facteurs influençant la récupération à la décongélation des progéniteurs

Sur la cohorte de décongélation, nous allons étudier l'impact de plusieurs paramètres sur la récupération à la décongélation des progéniteurs.

Tout d'abord des données générales : la pathologie et le délai entre le recueil de CSP et l'autogreffe. Ensuite, des marqueurs biologiques des produits de cytophérèse avant la congélation : la numération des cellules CD34+, des leucocytes, des granuleux (PNN et myélémie), ainsi que des plaquettes. Et enfin, la numération des cellules CD34+ au premier jour de recueil.

III.3.2.1.1. Données générales

- **La pathologie**



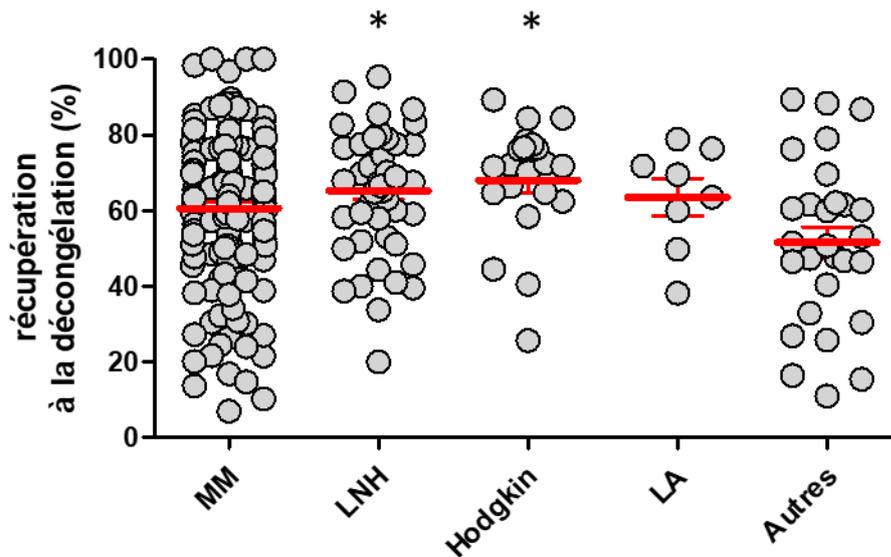


Figure 24 : Récupération à la décongélation des cellules CD34+ en fonction de la pathologie

Les 249 greffons de la cohorte d'étude ont été groupés selon l'indication d'autogreffe.

Les pourcentages de récupération par groupe de pathologies sont les suivants : groupe MM (n=144) : 61% ; groupe LNH (n=48) : 65% ; groupe Hodgkin (n=21) : 68% ; groupe LA (n=8) : 64% ; groupe des indications « Autres » (n=28) : 52%.

Test de Kruskal-Wallis $p=0.02$ test post-hoc de Dunn pour comparaisons multiples : * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$: le rendement à la décongélation des cellules CD34+ des groupes LNH et Hodgkin est significativement plus élevé que pour les indications « Autres ».

La pathologie a une influence sur la récupération des cellules CD34+ ($p=0.02$), également sur la récupération des CFU-GM ($p=0.0011$).

Les LNH et les maladies de Hodgkin présentent la meilleure récupération de progéniteurs lors de la décongélation des greffons, respectivement 65% et 68% (Figure 24).

La récupération des cellules CD34+ est de 52%, (proche du seuil minimum de 50%) pour le groupe des indications « Autres ».

Par conséquent, il est donc nécessaire pour ce groupe de décongeler des produits de cytophérèse plus riches en progéniteurs que pour les hémopathies afin de tout de même obtenir un greffon de bonne qualité.

- **Délai entre le recueil de CSP et l'autogreffe**

Le délai moyen entre le recueil de CSP et l'autogreffe (autrement dit la durée de la congélation des produits de cytophérèse) est de 6 mois (médiane : 2 mois).

Le recueil de CSP a lieu en général entre deux cycles de chimiothérapie précédant le traitement d'intensification (2 à 3 mois avant l'autogreffe). Or, si le patient a déjà bénéficié d'un recueil de CSP et que la quantité de progéniteurs conservée est suffisante, un nouveau recueil



n'est pas nécessaire. Ceci explique la différence entre la médiane et la moyenne de conservation des produits de cytophérèse avant l'autogreffe.

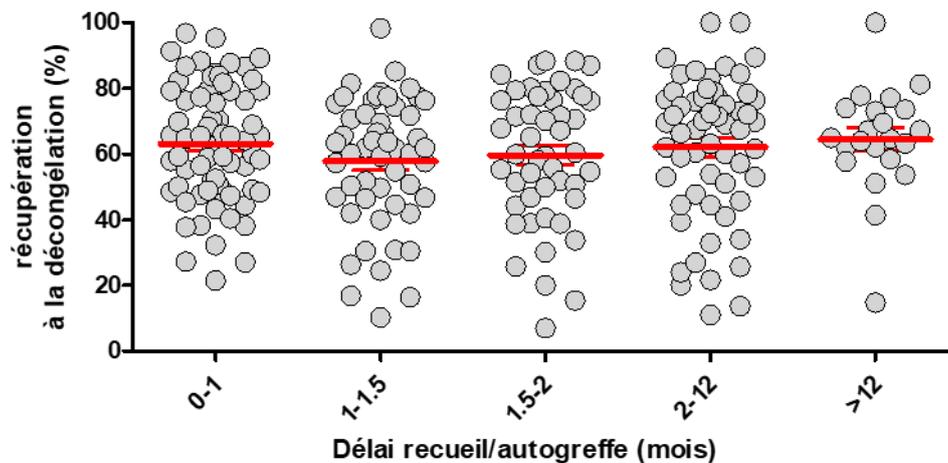


Figure 25 : Récupération à la décongélation des cellules CD34+ en fonction du délai entre le recueil de CSP et l'autogreffe

Les 249 greffons de la cohorte d'étude ont été groupés selon le délai entre le recueil et l'autogreffe. 30% des autogreffes ont été réalisées moins de 1 mois après le recueil de CSP, 8% avec un délai supérieur à 12 mois.

Les barres rouges représentent la moyenne et l'écart-type du groupe.

Test de Kruskal-Wallis $p=0.62$

Ce délai n'a pas d'influence sur le rendement de décongélation des cellules CD34+ ($p=0.62$). Les poches de cytophérèse cryoconservées depuis plus d'un an ont des rendements similaires aux autres (Figure 25).

III.3.2.1.2. Marqueurs biologiques de post-aphérèse

- **Cellules CD34+ après transformation**

La numération moyenne de cellules CD34+ contenues dans les produits de cytophérèse après transformation est de $3.96 \times 10^6/\text{kg}$. C'est la richesse théorique du greffon souhaitée pour la greffe (si la récupération des progéniteurs à la décongélation était de 100%).



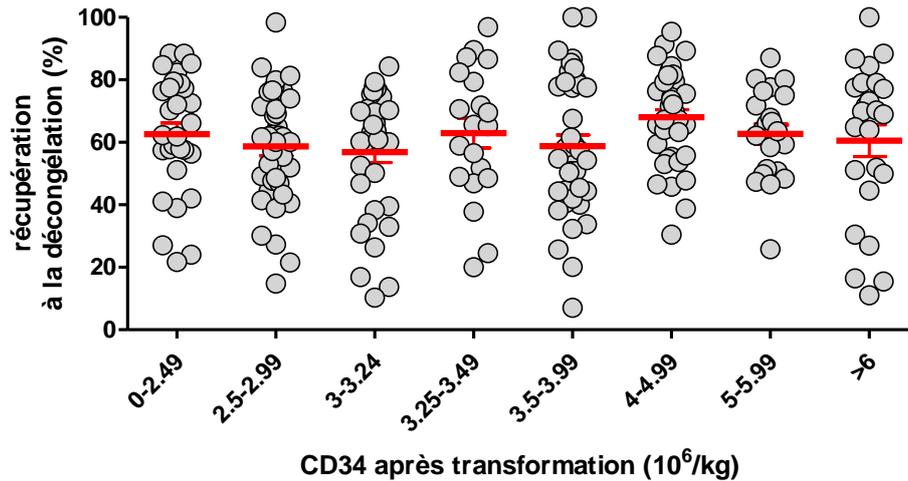


Figure 26 : Récupération à la décongélation des cellules CD34+ en fonction de la numération des cellules CD34+ après transformation

Les 249 greffons de la cohorte d'étude ont été groupés selon la richesse des greffons après transformation. 4% (n=11) des greffons ont une richesse en cellules CD34+ inférieure à $2 \times 10^6/\text{kg}$ avant décongélation ; 18% (n=46) des greffons ont une richesse supérieure à $5 \times 10^6/\text{kg}$.

Test de Kruskal-Wallis $p=0.33$

Les greffons de richesse théorique inférieure à $2 \times 10^6/\text{kg}$ sont des greffons décongelés dans un deuxième temps suite à un premier greffon de trop faible richesse en progéniteurs pour une autogreffe.

Cette numération n'a pas d'influence sur le rendement à la décongélation des cellules CD34+ ($p=0.33$) (Figure 26).

- **Leucocytes après transformation**

La numération moyenne des leucocytes contenus dans les produits de cytophérèse après transformation est de 32.66×10^9 .



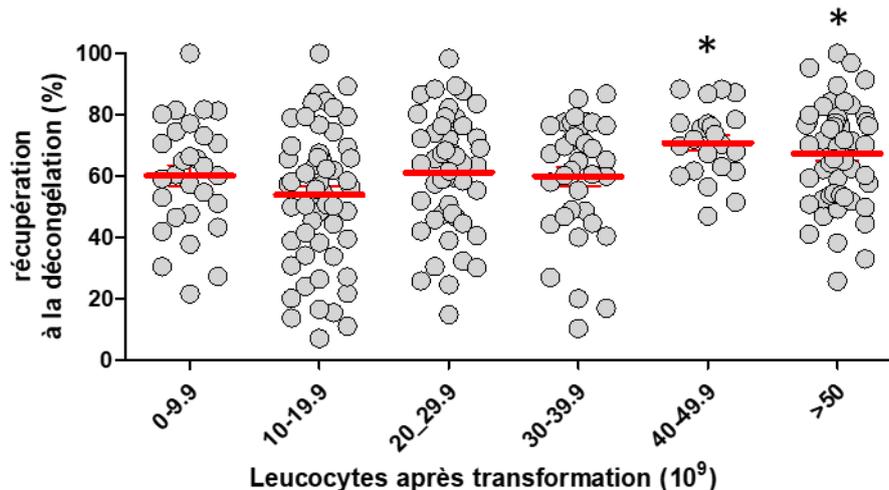


Figure 27 : Récupération à la décongélation des cellules CD34+ en fonction de la numération des leucocytes après transformation

Les 249 greffons de la cohorte d'étude ont été groupés selon la numération des leucocytes après transformation.

Le groupe de greffons contenant de 10 à 19.9 $\times 10^9$ leucocytes (n=58) présente une récupération de CD34+ de 54%.

Les groupes de greffons contenant plus de 40 $\times 10^9$ leucocytes (n=74) présentent une récupération de 68%.

Test de Kruskal-Wallis $p=0.006$, test post-hoc de Dunn pour comparaisons multiples : * $p<0.05$ (Les groupes avec une * sont significativement différents du groupe contenant de 10 à 19.9 $\times 10^9$ leucocytes).

Les produits de cytophérèse contenant $\geq 40 \times 10^9$ leucocytes ont un rendement supérieur à ceux qui en ont entre 10 et 19.9 $\times 10^9$ ($p<0.05$) (Figure 27).

Les leucocytes semblent avoir une influence sur la récupération à la décongélation des cellules CD34+ (test de student ; $p=0.0002$), plus le nombre de leucocytes dans les produits de cytophérèse est élevé, plus la récupération en cellules CD34+ augmente. La même influence est observée sur la récupération des CFU-GM ($p=0.041$).

- greffons contenant moins de 40 $\times 10^9$ leucocytes (n=174) : 58% pour les CD34+ et 61% pour les CFU-GM
- greffons contenant plus de 40 $\times 10^9$ leucocytes (n=74) : 68%.pour les CD34+ et 69% pour les CFU-GM

L'impact sur le rendement est également testé pour les leucocytes exprimés en concentration dans les produits de cytophérèse ($\times 10^9/L$), il n'est pas statistiquement significatif (Test de Kruskal-Wallis $p=0.4$) (Annexe 4.2.3). Il est également non significatif quand on analyse la perte de leucocytes (en valeur absolue et en %) à la décongélation (données non montrées).

- **Polynucléaires neutrophiles après transformation**

La numération des polynucléaires neutrophiles contenus dans les produits de cytophérèse après transformation est en moyenne de 2.66×10^9 .

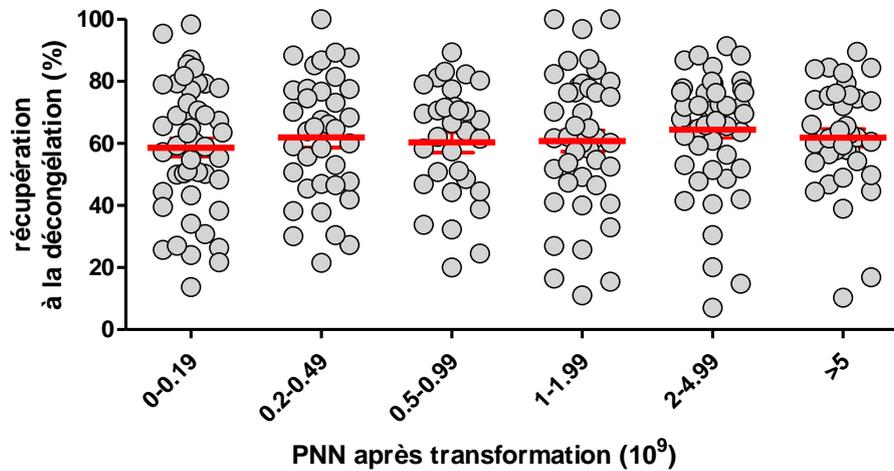


Figure 28 : Récupération à la décongélation des cellules CD34+ en fonction de la numération des polynucléaires neutrophiles après transformation

Test de Kruskal-Wallis $p=0.68$.

Celle-ci n'a pas d'influence sur la récupération à la décongélation des cellules CD34+ ($p= 0.68$) (Figure 28).

La concentration des polynucléaires neutrophiles contenus dans les produits de cytophérèse n'a pas non plus d'influence sur ce même rendement ($p=0.75$) (Annexe 4.2.1).

- **Granuleux immatures après transformation**

La numération moyenne des granuleux immatures contenus dans les produits de cytophérèse après transformation est de 3.46×10^9 .



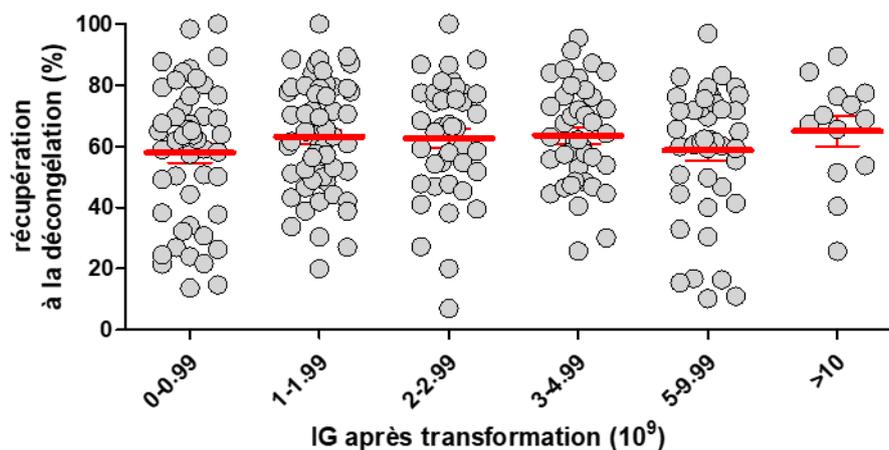


Figure 29 : Récupération à la décongélation des cellules CD34+ en fonction de la numération des granuleux immatures (IG) après transformation

Test de Kruskal-Wallis $p=0.8$.

Celle-ci n'a pas d'influence sur le rendement à la décongélation des cellules CD34+ ($p=0.8$) (Figure 29).

La concentration des granuleux immatures n'a pas non plus d'influence sur ce même rendement ($p=0.56$) (Annexe 4.2.2).

- **Plaquettes après transformation**

La numération moyenne des plaquettes contenues dans les produits de cytophérèse avant la congélation est de 340×10^9 .

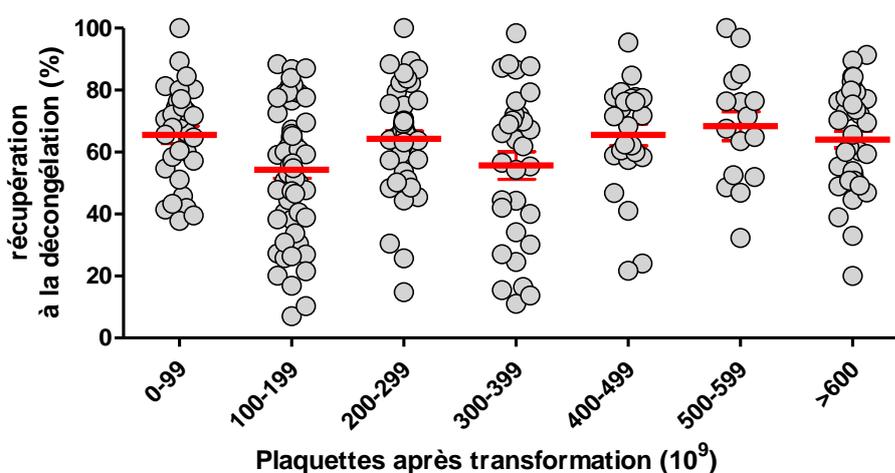


Figure 30 : Récupération à la décongélation des cellules CD34+ en fonction de la numération des plaquettes avant congélation

Les 249 greffons de la cohorte d'étude ont été groupés selon la numération des plaquettes après transformation.

Les greffons $< 400 \times 10^9$ plaquettes (n=167) présentent une récupération de CD34+ de 59%.

Les greffons $\geq 400 \times 10^9$ plaquettes (n=82) présentent une récupération de CD34+ de 65%.

Test de Kruskal-Wallis $p=0.05$ test post-hoc de Dunn pour comparaisons multiples : non significatif.

La numération des plaquettes contenues dans les produits de cytophérèse a une influence à la limite de la significativité ($p=0.05$) sans qu'aucun groupe ne se démarque (test de Dunn non significatif) (Figure 30).

En revanche, les rendements à la décongélation des greffons contenant plus de 400×10^9 plaquettes après transformation (seuil déclenchant actuellement une étape de déplaquettisation au moment de la transformation) sont significativement plus élevés que ceux des greffons contenant moins de plaquettes (respectivement 65% et 59%) (test de student; $p=0.023$).

Cette influence n'est par contre pas retrouvée sur la récupération à la décongélation des CFU-GM ($p=0.10$).

La concentration ($p=0.84$) (Annexe 4.2.4) ainsi que la perte en valeur absolue (données non montrées) des plaquettes contenues dans les produits de cytophérèse n'ont pas d'influence sur ce même rendement.

Interprétation

Parmi les marqueurs biologiques de post-aphérèse étudiés, 2 semblent avoir un impact significatif sur la récupération à la décongélation des progéniteurs :

- *Les plaquettes en valeur absolue* : les greffons ayant une numération de plaquettes $\geq 400 \times 10^9$ présentent une récupération des CD34+ supérieure. (Cette influence n'est pas retrouvée sur la récupération des CFU-GM)

Les plaquettes sont décrites dans la littérature comme influençant négativement la récupération des cellules CD34+[45]. Sur notre cohorte, l'influence par sous-groupes est à la limite de la significativité. Statistiquement, on observe une différence de récupération entre les recueils contenant plus ou moins de 400×10^9 plaquettes, avec un effet favorable pour les recueils riches en plaquettes. Cette observation est toutefois à relativiser compte tenu de (1) l'absence d'impact sur le taux de récupération des CFU-GM et de (2) l'hétérogénéité des taux de récupération par sous-groupes.



- *Les leucocytes en valeur absolue* : les greffons ayant une numération de leucocytes $\geq 40 \times 10^9$ présentent une récupération de progéniteurs supérieure (CD34+ et CFU-GM).

Dans la littérature, l'influence inverse est observée : un nombre de leucocytes élevé dans les produits de cytophérèse est décrit comme un facteur entraînant une diminution de la récupération à la décongélation des progéniteurs [21]. Cette influence serait due aux polynucléaires neutrophiles contenus dans le greffon or nous n'avons pas retrouvé leur influence péjorative dans notre étude.

Aucun marqueur biologique exprimé en concentration dans le greffon ou en perte cellulaire (différence entre la valeur théorique après transformation et la valeur observée après décongélation) n'a d'influence sur la récupération des progéniteurs.

III.3.2.1.3. Numération des cellules CD34+ circulantes en pré-aphérèse

La première partie de l'étude nous a permis de mettre en évidence des patients super-mobilisateurs, présentant des taux très élevés de cellules CD34+ sanguines à J1 de mobilisation ($> 100 /\mu\text{L}$).

Nous nous sommes intéressés à cette sous-population et avons voulu connaître l'évolution de celle-ci au cours du processus d'autogreffe et principalement lors de l'étape de décongélation des produits de cytophérèse.

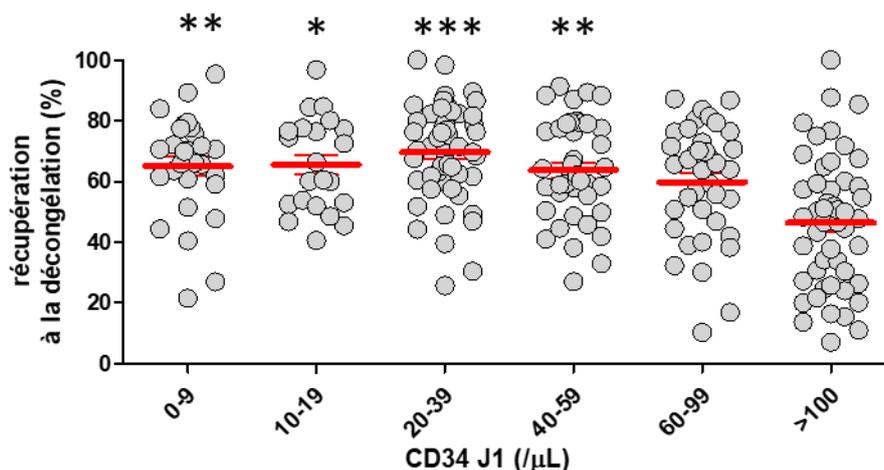


Figure 31 : Récupération des cellules CD34+ en fonction du nombre de cellules CD34+ sanguines au premier jour de cycle toutes pathologies confondues

Les 249 greffons de la cohorte d'étude ont été groupés selon la numération des cellules CD34+ avant le recueil.

Numération J1 $< 20/\mu\text{L}$ (n=50) : récupération moyenne :65% ; Numération J1 $\geq 100/\mu\text{L}$ (n=50) : récupération moyenne :46%.

Test de Kruskal-Wallis $p < 0.0001$ test post-hoc de Dunn pour comparaisons multiples : * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, par rapport au groupe des numération J1 $\geq 100/\mu\text{L}$.

Ces patients « super-mobilisateurs » présentent un pourcentage de récupération en cellules CD34+ significativement plus bas que les que les patients avec une numération de cellules CD34+ circulantes à J1 <60/μL (Figure 31).

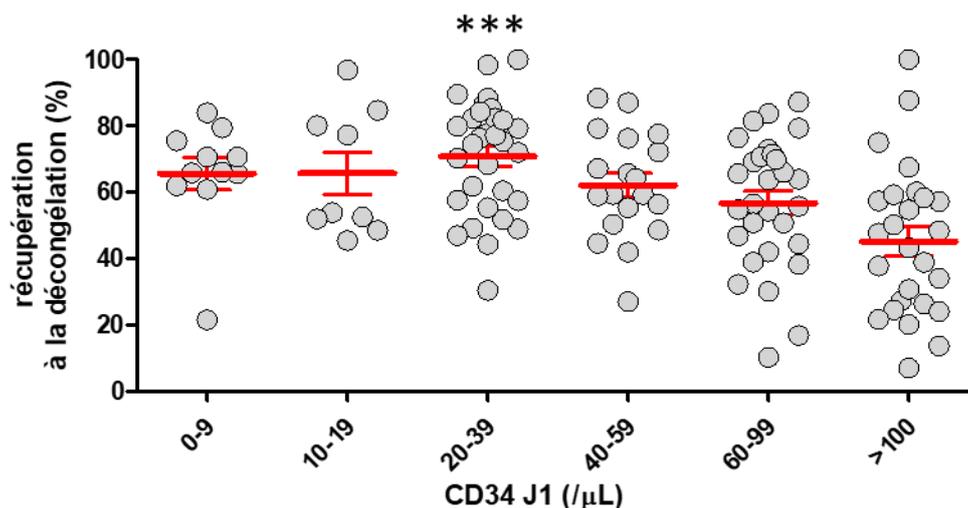


Figure 32 : Récupération des cellules CD34+ en fonction du nombre de cellules CD34+ sanguines au premier jour de cycle pour les myélomes multiples

Les 144 greffons du groupe MM ont été groupés selon la numération des cellules CD34+ avant le recueil.

Test de Kruskal-Wallis $p=0.0003$ test post-hoc de Dunn pour comparaisons multiples : * $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.001$, par rapport au groupe des numérations J1 $\geq 100/\mu\text{L}$.

En étudiant ce marqueur dans le groupe myélome, le seul groupe de pathologie avec un effectif assez important pour observer cet effet, nous constatons également que le pourcentage de récupération est significativement plus faible pour les recueils réalisés avec une numération de CD34+ circulants $\geq 100/\mu\text{L}$ au premier jour du cycle (Figure 32).

La numération des cellules CD34+ circulantes au premier jour du cycle est le marqueur biologique le plus prédictif du rendement à la décongélation.

Chez ces patients « bons mobilisateurs », il est donc conseillé de décongeler un greffon de richesse élevée en prévision d'une perte accrue de cellules CD34+.

III.4. Les données de sortie d'aplasie

L'étude de ces données nous permet d'évaluer l'influence des concentrations de cellules CD34+ et des CFU-GM dans le greffon sur la sortie d'aplasie toutes pathologies confondues puis en fonction des différents sous-groupes.

Les critères de sortie d'aplasie le plus souvent utilisés dans la littérature sont les suivants :

- Polynucléaires neutrophiles sanguins $>0.5 \times 10^9/L$
- Numération plaquettaire sanguine $>20 \times 10^9/L$.

Dans ce chapitre, seul le délai de récupération des polynucléaires neutrophiles (sortie d'agranulocytose) sera étudié. En effet, certains patients bénéficient de transfusions de plaquettes, notamment quand la numération plaquettaire est inférieure à $10 \times 10^9/L$, rendant difficile l'interprétation de la cinétique de récupération des plaquettes.

III.4.1. Description des données

Les paramètres biologiques de la sortie d'aplasie sont présentés en Annexe 5.

Sur la période d'octobre 2014 à février 2017, il a été pratiqué 236 autogreffes pour 215 patients. La répartition des indications est similaire aux données fournies par l'ABM (Figure 33) [10] :

- 131 dans le groupe myélome multiple (130 patients),
- 48 dans le groupe lymphome non hodgkinien (48 patients),
- 21 dans le groupe maladie de Hodgkin (17 patients),
- 8 greffons dans le groupe leucémie aiguë (8 patients),
- 28 greffons dans le groupe des indications « Autres » (14 patients).



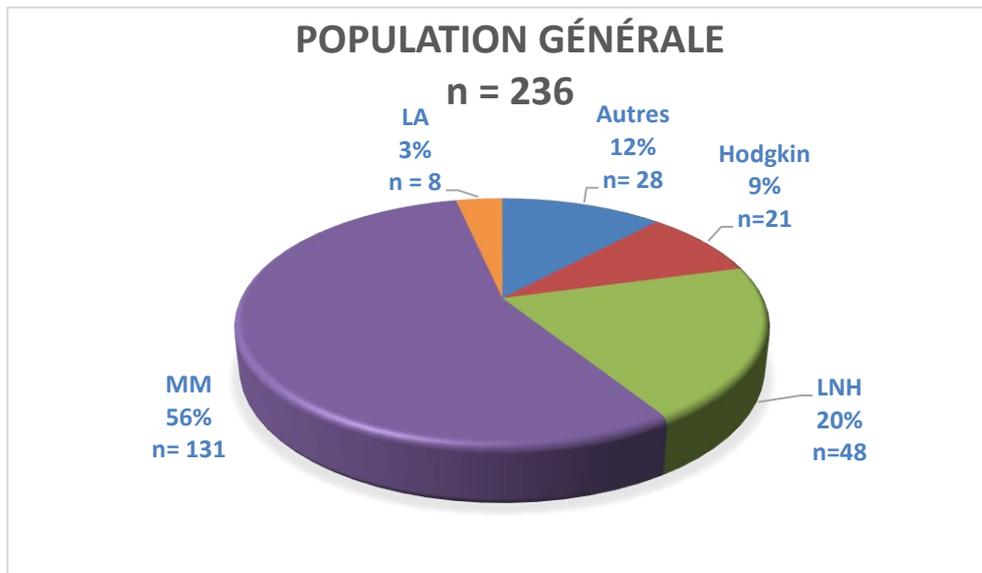


Figure 33 : Répartition des indications d'autogreffe d'octobre 2014 à février 2017

La majorité des patients ont bénéficié d'une seule autogreffe sur la période concernée. 15 patients ont néanmoins nécessité plusieurs autogreffes : 1 patient atteint d'un myélome multiple, 4 de la maladie de Hodgkin et 10 pour des pathologies « Autres ».

Le délai moyen de sortie d'agranulocytose toutes pathologies confondues est de 12 jours après l'autogreffe.

- **Richesse en cellules CD34+ des autogreffes**

Toutes pathologies confondues, le nombre médian de cellules CD34+ contenues dans un greffon est de $2.46 \times 10^6/\text{kg}$ (extrêmes : 0.7-6.53).

101 autogreffes (soit 46%) ont été réalisées avec une richesse inférieure à $2 \times 10^6/\text{kg}$:

- Nombre de cellules CD34+ compris entre 1 et $2 \times 10^6/\text{kg}$ pour 90 autogreffes
- Nombre de cellules CD34+ < 1×10^6 cellules CD34+/kg pour 11 autogreffes

Les autogreffes réalisées avec un greffon contenant moins d' $1 \times 10^6/\text{kg}$ étaient pour : 1 lymphome non hodgkinien, 1 indication « Autres », 2 maladies de Hodgkin, et 7 myélomes multiples.

- **Richesse en CFU-GM des autogreffes**



Toutes pathologies confondues, le nombre médian de CFU-GM greffées est de $59.68 \times 10^4/\text{kg}$ (extrêmes : 1-359.6). La richesse moyenne en progéniteurs est supérieure au critère de qualité défini dans la littérature ($45 \times 10^4/\text{kg}$).

En revanche, 90 autogreffes (38%) ont été réalisées avec une richesse inférieure à ce seuil.

III.4.2. Résultats

III.4.2.1 Richesse en progéniteurs des autogreffes et sortie d'aplasie, toutes pathologies confondues

Pour caractériser les délais de récupération des polynucléaires neutrophiles, nous utiliserons un indice : l'Indice de Récupération (IR)

L'IR₅₀ représente le nombre de jours après l'autogreffe nécessaires pour que 50% des patients sortent d'agranulocytose.

L'IR₉₀ représente le nombre de jours après l'autogreffe nécessaires pour que 90% des patients sortent d'agranulocytose.

Plus ces indices sont faibles, plus la sortie d'agranulocytose est rapide.

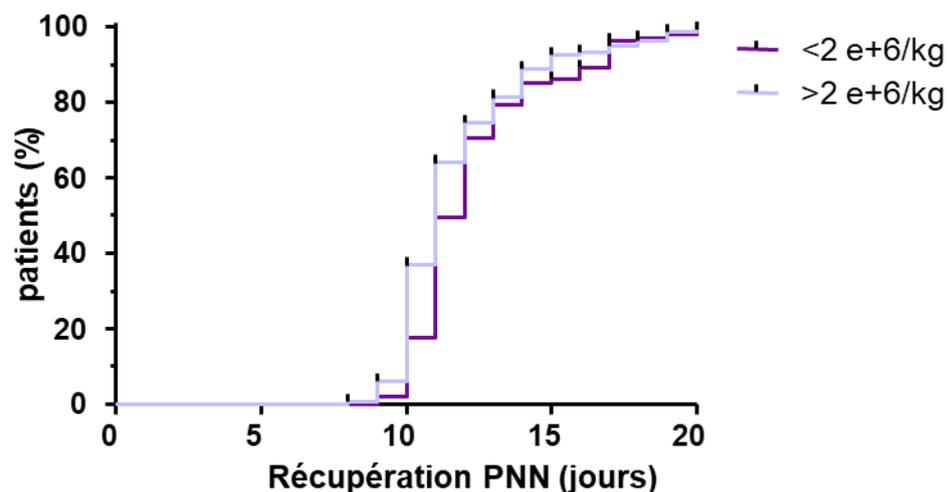


Figure 34 : Récupération des PNN en fonction de la richesse du greffon en CD34+, toutes pathologies

Les délais de récupération des PNN après autogreffe (n= 236) sont groupés en fonction de la richesse en CD34+ du greffon. CD34+ $\geq 2 \times 10^6/\text{kg}$ (n=134) : IR₅₀=11j, IR₉₀=15j. CD34+ <math>< 2 \times 10^6/\text{kg}</math> (n=102) : IR₅₀=12j, IR₉₀= 15j. Test du Logrank : p=0.08.

Toutes pathologies confondues, la richesse en CD34+ du greffon ne semble pas influencer le délai de sortie d'agranulocytose ($p=0.08$) (Figure 34), celle en CFU-GM non plus ($p=0.35$) (Annexe 5).

De 11 à 12 jours sont nécessaires pour que 50% des patients sortent d'agranulocytose. 15 jours sont nécessaires pour que 90% des patients sortent d'agranulocytose.

III.4.2.2 Richesse en progéniteurs des autogreffes et sortie d'aplasie, étude par groupe de pathologies

Les résultats précédents montrent que la richesse en progéniteurs (cellules CD34+ et CFU-GM) contenus dans le greffon n'aurait pas d'impact sur la cinétique de sortie d'agranulocytose.

En revanche, dans notre cohorte, le délai de sortie d'agranulocytose est différent en fonction des pathologies.

III.4.2.2.1. Influence de la pathologie

Les résultats permettent de définir 2 groupes de pathologies (Figure 35 et Tableau 4) :

- **celles qui présentent une cinétique de récupération rapide des polynucléaires neutrophiles**
 - Les myélomes multiples
 - La catégorie des indications « Autres »

Pour ces pathologies, l'IR₅₀ est de 11 jours. Les IR₉₀ sont de 12 jours pour le myélome multiple et de 13 jours pour les indications « Autres ».

- **celles qui présentent une cinétique lente de récupération des polynucléaires neutrophiles**
 - Les LNH
 - La maladie de Hodgkin
 - Les LA

Leurs IR₅₀ sont respectivement de 13 jours pour la maladie de Hodgkin et de 14 jours pour les lymphomes non hodgkiniens et les leucémies aiguës. Leur IR₉₀ sont respectivement de 17,18 et 19 jours.



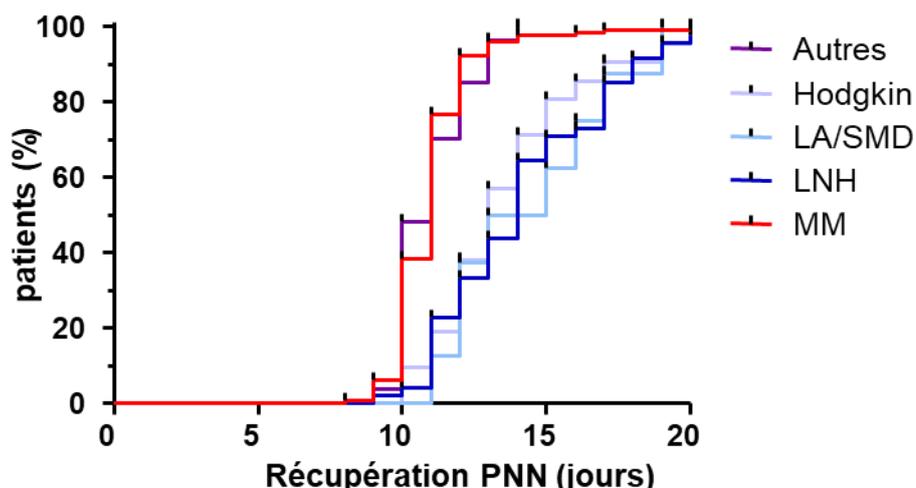


Figure 35 : Délai de récupération des polynucléaires neutrophiles en fonction de la pathologie

Les délais de récupération des PNN après autogreffe (n= 236) sont groupés selon la pathologie.

Pathologies de cinétique rapide de récupération des PNN (n=159) : IR₅₀ : 11j, IR₉₀ :12.5j.

Pathologie de cinétique lente de récupération des PNN (n=77) : IR₅₀=13.5j, IR₉₀=17j.

Test du Logrank : p< 0.0001

Tableau 4 : Indices de récupération des polynucléaires en fonction de la pathologie

	<i>MM</i>	<i>Autres</i>	<i>LNH</i>	<i>Hodgkin</i>	<i>LA</i>
<i>IR₅₀ (jours)</i>	11	11	14	13	14
<i>IR₉₀ (jours)</i>	12	13	18	17	19

Les pathologies de cinétique rapide de récupération des polynucléaires neutrophiles sortent d'agranulocytose en moyenne avec 3 jours d'avance par rapport aux pathologies de cinétique lente (11 jours contre 14 jours).

La pathologie a un impact significatif sur la sortie d'agranulocytose (p<0.0001).

III.4.2.2.2. Influence de la richesse en progéniteurs du greffon sur la récupération des polynucléaires neutrophiles par groupes de pathologies

Nous avons montré précédemment que la richesse en progéniteurs, toutes pathologies confondues, n'a pas d'influence sur la sortie d'agranulocytose. Or, l'étude de la richesse en progéniteurs au sein des deux groupes de pathologies montre des résultats différents.

III.4.2.2.2.1. Les pathologies de cinétique rapide de récupération des polynucléaires neutrophiles

Les pathologies de cinétique rapide de récupération des polynucléaires neutrophiles sont les myélomes multiples et le groupe des indications « Autres ».

Leur délai moyen de sortie d'agranulocytose est de 11 jours.

Leurs IR en fonction de la richesse en CD34+ sont les suivants :

- **Autogreffes avec une richesse en cellules CD34+ supérieure à $2 \times 10^6/\text{kg}$**

Ces autogreffes ont un IR₅₀ de 10j et un IR₉₀ de 11j

- **Autogreffes avec une richesse en cellules CD34+ inférieure à $2 \times 10^6/\text{kg}$**

Ces autogreffes ont un IR₅₀ de 11j et un IR₉₀ de 13j

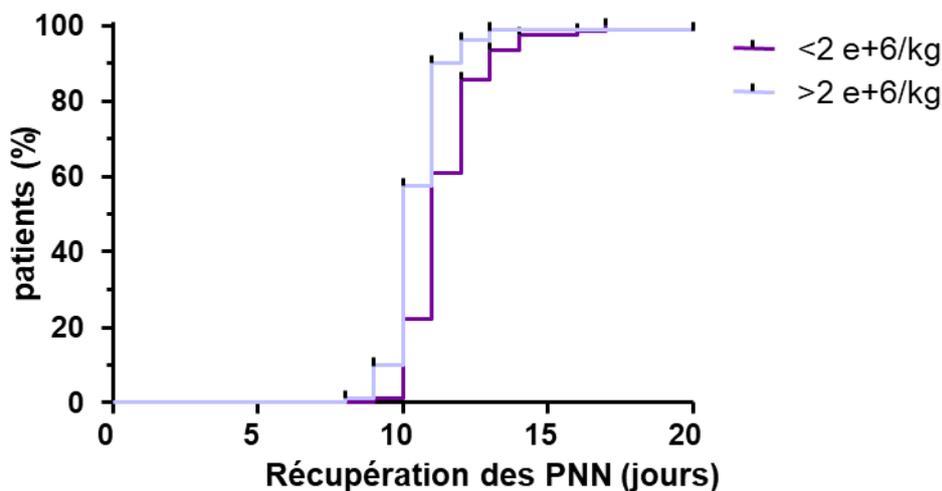


Figure 36 : Délai de récupération des pathologies de cinétique rapide de sortie d'agranulocytose en fonction de la richesse de l'autogreffe en cellules CD34+

Les délais de récupération des PNN après autogreffe des pathologies de cinétique rapide de sortie d'agranulocytose (n= 159) sont groupés en fonction de la richesse en CD34+ du greffon. CD34+ $\geq 2 \times 10^6/\text{kg}$ (n=81) : IR₅₀=10j, IR₉₀=11j. CD34+ < $2 \times 10^6/\text{kg}$ (n=78) : IR₅₀= 11j, IR₉₀= 13j.

Test du Logrank : p<0.0001.

Tableau 5 : Influence de la richesse en cellules CD34+ du greffon sur les pathologies de cinétique rapide de récupération des polynucléaires neutrophiles

	Cellules CD34+ < $2 \times 10^6/\text{kg}$	Cellules CD34+ $\geq 2 \times 10^6/\text{kg}$
IR ₅₀ (jours)	11	10
IR ₉₀ (jours)	13	11

Les autogreffes réalisées avec plus de $2 \times 10^6/\text{kg}$ de cellules CD34+ entraînent une sortie d'agranulocytose plus précoce par rapport aux autogreffes réalisées avec une richesse inférieure ($p < 0.0001$) (Figure 35 et Tableau 5).

Le même type de courbe est obtenu en analysant l'influence de la richesse en CFU-GM du greffon, leur IR₅₀ et IR₉₀ sont plus faibles de 1 jour ($p = 0.01$) (Annexe 5.3).

La richesse en progéniteurs (cellules CD34+ et CFU-GM) du greffon a une influence sur la récupération des polynucléaires neutrophiles des pathologies de cinétique rapide.

III.4.2.2.2. Les pathologies de cinétique lente de récupération des polynucléaires neutrophiles

Les pathologies de cinétique lente de récupération des polynucléaires neutrophiles sont les LNH, les maladies de Hodgkin et les leucémies aiguës.

Leur délai moyen de sortie d'agranulocytose est de 14 jours.

Les autogreffes présentent des indices de récupération des polynucléaires neutrophiles différents en fonction de la richesse en progéniteurs :

- **Autogreffes avec une richesse en cellules CD34+ supérieure à $2 \times 10^6/\text{kg}$**

Ces autogreffes ont un IR₅₀ de 13j et un IR₉₀ de 18j

- **Autogreffes avec une richesse en cellules CD34+ inférieure à $2 \times 10^6/\text{kg}$**

Ces autogreffes ont un IR₅₀ de 15jj et un IR₉₀ de 19



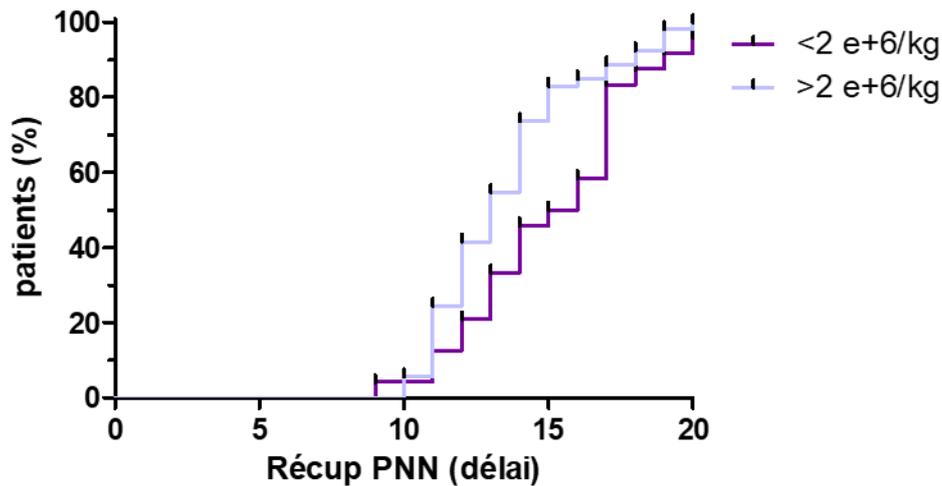


Figure 37 : Délai de récupération des pathologies de cinétique lente de sortie d'agranulocytose en fonction de la richesse de l'autogreffe en cellules CD34+

Les délais de récupération des PNN après autogreffe des pathologies de cinétique lente de sortie d'agranulocytose (n= 77) sont groupés en fonction de la richesse en CD34+ du greffon.

CD34+ $\geq 2 \times 10^6/\text{kg}$ (n=53) : IR₅₀=13j, IR₉₀=18j. CD34+ <math>< 2 \times 10^6/\text{kg}</math> (n= 24) : IR₅₀= 15j, IR₉₀= 19j.

Test du Logrank : $p=0.028$.

Tableau 6 : Influence de la richesse en cellules CD34+ du greffon sur les pathologies de cinétique lente de récupération des polynucléaires neutrophiles

	Cellules CD34+ <math>< 2 \times 10^6/\text{kg}</math>	Cellules CD34+ $\geq 2 \times 10^6/\text{kg}$
IR ₅₀ (jours)	15	13
IR ₉₀ (jours)	19	18

Les autogreffes réalisées avec plus de $2 \times 10^6/\text{kg}$ de cellules CD34+ ont un IR₅₀ plus faible de 2 jours et un IR₉₀ plus faible de 1 jour.

Les autogreffes réalisées avec plus de $2 \times 10^6/\text{kg}$ de cellules CD34+ entraînent une sortie d'agranulocytose plus précoce par rapport aux autogreffes réalisées avec une richesse inférieure ($p = 0.028$) (Figure 37 et Tableau 6).

Le même type de courbes sont retrouvées en analysant l'influence de la richesse en CFU-GM du greffon, l'IR₅₀ est plus faible de 3 jours et l'IR₉₀ de 2 jours ($p= 0.019$) (Annexe 5.4).

Dans ce groupe de pathologies constitué des lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens ainsi que des leucémies aiguës, la richesse en progéniteurs (cellules CD34+ et CFU-GM) du greffon a également un impact sur la récupération des polynucléaires neutrophiles.

Interprétation

- **L'influence de la pathologie**

- Les patients atteints de pathologies de cinétique rapide de récupération des polynucléaires neutrophiles (myélomes multiples et le groupe des indications « Autres ») sortent d'agranulocytose en moyenne 11 jours après l'autogreffe.
- Les patients atteints de pathologies de cinétique lente de récupération des polynucléaires neutrophiles (lymphomes Hodgkiniens et non hodgkiniens, leucémies aiguës) sortent d'agranulocytose en moyenne en 14 jours.

La cinétique de sortie d'agranulocytose est donc influencée par la pathologie et ce quel que soit la richesse du greffon en progéniteurs hématopoïétiques.

- **Discordance dans l'interprétation de l'influence de la richesse en progéniteurs sur la sortie d'agranulocytose**

L'influence de la richesse en progéniteurs toutes pathologies confondues est non significative tandis qu'elle est significative au sein des groupes de pathologies de cinétique rapide et de cinétique lente.

Cette discordance est due à l'influence prépondérante de la pathologie et à la différence de répartition des effectifs des différents groupes (test de Fisher $p=0.006$) :

- Le groupe de cinétique rapide de sortie d'agranulocytose est de répartition homogène entre les greffons de richesse supérieure à $2 \times 10^6/\text{kg}$ ($n=81$) et ceux de richesse inférieure ($n=79$).
- Le groupe de cinétique lente n'a pas une répartition homogène : 2/3 avec un greffon de richesse supérieure à $2 \times 10^6/\text{kg}$ et 1/3 de richesse inférieure.

La richesse en progéniteurs (cellules CD34+ et CFU-GM) dans le greffon reste un facteur indépendant de la pathologie important à prendre en compte pour permettre une sortie d'agranulocytose plus précoce.

Selon ces résultats, le seuil de $2 \times 10^6/\text{kg}$ de CD34+ dans le greffon est important à obtenir, quel que soit la pathologie. Une cohorte plus importante de patients autogreffés pourrait nous permettre d'étudier plus largement l'impact du taux de CD34+ sur la récupération de l'hématopoïèse post-autogreffe.



Discussion et perspectives

L'autogreffe occupe une place capitale dans la prise en charge de certaines pathologies. Les patients n'ayant pas reçu de traitement de support par autogreffe lors du traitement d'intensification voient leur durée d'aplasie rallongée. Compte tenu du risque infectieux durant cette phase causée par l'immunodépression secondaire à la chimiothérapie d'intensification, il est nécessaire de la rendre la plus courte possible.

De plus, le service de greffe (allogreffe et autogreffe) est le seul rassemblant l'équipe formée ainsi que l'environnement nécessaire à la prise en charge de ces patients. Leur hospitalisation doit se faire dans un secteur hautement protégé avec une filtration de l'air contrôlée. Le nombre de lits d'hospitalisation dans ce secteur est limité. De ce fait, le raccourcissement de la durée d'hospitalisation des patients bénéficiant d'une autogreffe permet d'augmenter le nombre de patients y ayant accès.

L'administration d'un greffon de bonne qualité, c'est à dire de richesse suffisante en progéniteurs hématopoïétiques, est nécessaire à l'optimisation de la prise en charge des patients.

La qualification du greffon telle que nous la connaissons repose sur des études anciennes, datant des débuts du développement de l'autogreffe. Dans ce contexte, une actualisation des connaissances sur les données biologiques de l'autogreffe paraît indispensable.

Cette étude porte sur deux cohortes importantes :

- Une cohorte de recueil comprenant 323 patients ayant bénéficié de 595 recueils répartis sur 386 cycles,
- Une cohorte de décongélation de CSP/sortie d'aplasie composée de 215 patients ayant bénéficié de 236 autogreffes.

Elle s'attache à décrire les données biologiques obtenues durant les différentes étapes du processus d'autogreffe en vue d'optimiser la prise en charge des patients. La taille de ces cohortes permet d'avoir des données statistiques robustes sur le processus de l'autogreffe.

Les étapes de l'autogreffe sont analysées de manière chronologique : du recueil de cellules souches périphériques au cours de cycles de cytophérèse à l'autogreffe proprement dite.



Le recueil de cellules souches périphériques

L'étude de notre cohorte de recueil a pour objectif de déterminer des facteurs prédictifs de la qualité du recueil, permettant d'intervenir rapidement sur la mobilisation si besoin (rationnel d'utilisation du plerixafor) afin d'obtenir la quantité de progéniteurs optimale en un minimum de recueils.

Les facteurs étudiés sont des paramètres évaluables en amont de la procédure de cytophérèse. Il s'agit de paramètres généraux tels que l'âge du patient, son sexe et la pathologie à l'origine de l'indication d'autogreffe et des paramètres biologiques disponibles le matin même du recueil : le taux de CD34+ circulants (en valeur absolue et en pourcentage) ainsi que la numération leucocytaire et plaquettaire.

Influence des paramètres en pré aphérèse sur les résultats post aphérèse

Les données préexistantes font état d'une corrélation entre les paramètres en pré-aphérèse et la numération des cellules CD34+ sur les produits de cytophérèse. La numération des cellules CD34+ circulantes en valeur absolue est la variable permettant de prédire au mieux la richesse en progéniteurs des produits de cytophèreses [48].

Cette corrélation permet de définir le seuil optimal (20/ μ L) permettant d'obtenir en un recueil de cellules souches périphériques, un produit de cytophérèse contenant la quantité de progéniteurs minimale requise pour une autogreffe : 2×10^6 /kg [47] [48].

Sur notre cohorte, à ce seuil, 76% des recueils sont suffisants pour une autogreffe et 55% sont de richesse optimale ($>3 \times 10^6$ /kg). La moyenne des cellules CD34+ collectées pour des valeurs proches du seuil (entre 20 et 29 cellules CD34+circulantes/ μ L) n'est que de 1.88×10^6 /kg.

Un seuil de 40/ μ L augmente significativement la probabilité d'obtenir un greffon suffisant (95% $>2 \times 10^6$ /kg) voire optimal (82% $>3 \times 10^6$ /kg) en un seul recueil. De plus, ce seuil présente l'avantage d'assurer un taux de cellules CD34+ circulantes supérieur à 20/ μ L le lendemain, permettant si nécessaire un recueil supplémentaire sans attendre les résultats sanguins.

Outre le seuil de 20 cellules CD34+/ μ L, prédictif de **bonne mobilisation**, il semble intéressant de retenir deux valeurs :

- $\geq 40/\mu\text{L}$: **taux prédictif d'un recueil suffisant,**
- $< 15/\mu\text{L}$: **taux prédictif d'un recueil insuffisant.**



Mauvais mobilisateurs

La définition que nous utilisons pour définir les patients « mauvais mobilisateurs » tient compte de la numération des cellules CD34+ circulantes sur toute la durée du cycle ainsi que de la somme des cellules CD34+ collectées au cours d'un cycle.

Les patients sont classés de la manière suivante :

- **Cellules CD34+ circulantes < 10/μL : mauvais mobilisateurs**
- **10/μL ≤ Cellules CD34+ circulantes < 20/μL : potentiels mauvais mobilisateurs (valeur des cellules CD34+ circulantes non prédictive)**
- **CD34 > 20/μL : bons mobilisateurs**

Pour les potentiels mauvais mobilisateurs, le nombre de cellules CD34+ total contenues dans les produits de cytophérèse en fin de cycle définira s'il s'agit d'un bon ou d'un mauvais mobilisateur :

- $\geq 2 \times 10^6/\text{kg}$ = bon mobilisateur
- $< 2 \times 10^6/\text{kg}$ = mauvais mobilisateur

Cette définition pourrait être enrichie pour la zone non prédictive (10-20 CD34+ circulants/μL voire 10-40/μL). En associant les valeurs de leucocytes et de CD34+ (%) circulants, on pourrait envisager un algorithme prédisant de manière plus fine une mobilisation efficace.

Le pourcentage de patients mauvais mobilisateurs est variable en fonction des études, de 10 à 30% [49]–[51], en utilisant dans la plupart des publications comme définition une quantité de CD34+ recueillis $< 2 \times 10^6/\text{kg}$ au cours du cycle.

Sur notre cohorte, le pourcentage de **patients mauvais mobilisateurs est de 12%** (n=38), peut-être sous-estimé par rapport à la littérature. En effet, nous excluons les patients qui présentent une numération de CD34+ circulants $> 20/\mu\text{L}$ sans bénéficier d'un recueil, en considérant que le recueil n'a pas été réalisé indépendamment du taux de CD34+ circulants.

Parmi les marqueurs que nous avons étudiés, ceux présentant une influence significative sur la mobilisation sont la pathologie et la **numération plaquettaire au premier jour de cycle**.

Les indications alternativement décrites comme facteur de mauvaise mobilisation sont les lymphomes non hodgkiniens et hodgkiniens et les leucémies aiguës [52][53]. Sur notre cohorte, les patients atteints de **leucémie aiguë** sont les plus à risque de mauvaise mobilisation, ce sont également les patients présentant les paramètres en pré-aphérèse les moins favorables (leucocytes et CD34+ circulants les plus faibles).



La numération plaquettaire au premier jour du cycle de cytophérèse est décrite comme marqueur biologique de mauvaise mobilisation quand elle est inférieure à $150 \times 10^9/L$ [54].

L'influence de ces deux paramètres sur la mobilisation est toutefois à pondérer car dans la littérature, ils ne sont pas décrits comme des facteurs indépendants de mauvaise mobilisation [40].

Limites

Certaines données, non biologiques, pouvant impacter la qualité des recueils de CSP n'ont pas été étudiées. Ceci entraîne un biais dans notre étude. De même, tous les facteurs de mauvaise mobilisation n'ont pu être pris en compte.

- Une mauvaise tolérance à la mobilisation et au recueil peut entraîner la non réalisation ou le raccourcissement de la durée de la cytophérèse. Cet événement peut induire un biais dans la corrélation entre les paramètres en pré-aphérèse et en post-aphérèse ainsi qu'une surestimation des patients mauvais mobilisateurs.
- Les paramètres relatifs au processus de cytophérèse, tels que la qualité de l'abord veineux, le volume sanguin traité, peuvent limiter le rendement de cellules CD34+ collectées dans les produits de cytophérèse.
- Les données de notre cohorte sont analysées indépendamment des données thérapeutiques et des antécédents des patients. La faculté de mobilisation provient essentiellement de la capacité de la moelle osseuse du patient à être stimulée. C'est pourquoi, les facteurs cités ci-dessous, non étudiés dans ce travail, ont probablement un impact sur la capacité de mobilisation :
 - L'antécédent de recueil de cellules souches hématopoïétiques.
 - Les chimiothérapies antérieures : les chimiothérapies myélotoxiques peuvent « épuiser » la moelle osseuse, la rendant d'autant plus difficile à mobiliser par diminution des réserves en cellules souches hématopoïétiques et altération du microenvironnement médullaire. (ex : agents alkylants).
 - Le stade de la maladie : les pathologies réfractaires ou déjà traitées par au moins deux lignes de traitement.
 - Les protocoles de stimulation présentent des rendements de mobilisation différents. Dans notre étude, les patients ont pu bénéficier du G-CSF seul, d'une chimiothérapie de mobilisation (ex : le cyclophosphamide) et/ou de l'association G-CSF/plerixafor. L'utilisation du plerixafor est de plus en plus répandue, permettant de recueillir des patients qui ne l'étaient pas jusqu'alors.

Perspectives

Ces données, pour la plupart déjà décrites dans la littérature, seront intéressantes à vérifier sur notre cohorte toulousaine : plus particulièrement celles concernant le plerixafor dont l'AMM définit actuellement sa place en seconde ligne après un premier échec de mobilisation. Or pour les patients que l'on prédit « mauvais mobilisateur », l'utilisation en première intention permettrait de recueillir dès le premier cycle la quantité de CSP nécessaire pour une autogreffe.

Des algorithmes définissant son utilisation existent : soit « just in time », au vu du taux de cellules CD34+ à J1 de cycle, de telle sorte que le plerixafor soit utilisé dès le second jour du recueil sans attendre l'échec d'un cycle entier. Soit en « pré-emptif » dès le J1 du premier cycle si le patient répond aux critères fixés.

Actuellement, le rationnel d'utilisation de cette molécule n'est pas défini au CHU de Toulouse. Une étude médico-économique est nécessaire pour mieux définir sa place dans la stratégie de mobilisation et harmoniser les pratiques.

Enfin, certains patients de la cohorte ont bénéficié de nouvelles molécules pour le traitement de leur hémopathie dont l'impact sur la mobilisation n'a pas été étudié. C'est le cas du Daratumumab, anticorps monoclonal anti-CD38 indiqué dans la prise en charge du myélome multiple [55] et du Brentuximab, anticorps monoclonal anti CD-30 indiqué dans la prise en charge de certains lymphomes [56].

L'échec de mobilisation est une notion fondamentale à appréhender dans l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. La compréhension des phénomènes altérant les CSH, du rôle central des niches hématopoïétiques et l'impact des chimiothérapies et de la radiothérapie sur celles-ci, la définition des patients mauvais mobilisateurs nécessitant une mobilisation adaptée sont des avancées majeures dans le domaine.

Malgré l'arrivée du plerixafor dans l'arsenal thérapeutique, le pourcentage de patients « mauvais mobilisateurs » reste élevé : 12%. Sur les trois années étudiées, 6 patients (2%) n'ont pu être recueillis et n'ont donc pas pu bénéficier d'une autogreffe.

Dans ce contexte, de nouvelles molécules sont envisagées pour la mobilisation de CSP, parmi elles, des antagonistes de CXCR4 (même mécanisme d'action que le plerixafor) : POL6326 et BTK140, plus sélectifs que le plerixafor [57] [58], un agoniste de CXCR2 : GRO-beta [59] et un inhibiteur de VLA-4 : BIO5192 [60].



La transformation et la décongélation des CSP

Les cellules CD34+ sont décrites comme résistantes à la cryoconservation. La richesse en progéniteurs des greffons décongelés devrait donc être semblable à celle des produits de cytophèrese avant congélation. Ainsi, la richesse en progéniteurs collectés avant congélation était initialement le seul critère requis pour une récupération hématologique précoce (seuil de $2 \times 10^6/\text{kg}$).

Actuellement, la richesse en progéniteurs est également quantifiée après décongélation des greffons. Ceci a permis de mettre en évidence une perte non négligeable de progéniteurs au cours du processus de transformation (réduction du volume et fractionnement des produits de cytophèrese avant la congélation) et de décongélation. Sur notre cohorte, nous avons observé une perte moyenne de 11% lors de l'étape de transformation et de 39% lors de la décongélation soit une perte globale proche de la moitié des progéniteurs contenus initialement dans les produits de cytophèrese.

Marqueurs biologiques

Afin d'optimiser cette étape importante du processus d'autogreffe, nous avons analysé des facteurs disponibles avant la décongélation susceptibles d'influencer le rendement des cellules CD34+.

La littérature fait état de paramètres après transformation influençant la qualité de la conservation des progéniteurs. La perte d'éléments cellulaires tels que les polynucléaires neutrophiles et les plaquettes aurait un impact sur la récupération à la décongélation [21]. En effet, la libération de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6) et d'enzymes (MMP-9 et PNN-elastase) par des cellules matures (polynucléaires neutrophiles) entraînerait la protéolyse de SDF-1 et de CXCR-4. Or la liaison SDF-1/ CXCR4 est indispensable au phénomène de « homing » des CSH (repopulation de la moelle osseuse). Ceci entraînerait un retard à la sortie d'aplasie ainsi qu'une action directe sur la récupération à la décongélation des progéniteurs (diminution de la récupération) [61]–[63].

Dans notre cohorte, les facteurs de post transformation qui influenceraient de manière significative l'étape de décongélation sont la numération en valeur absolue des leucocytes et des plaquettes.

- **Les leucocytes** : l'influence retrouvée sur notre cohorte est inverse à celle décrite dans la littérature : la récupération des progéniteurs serait significativement augmentée pour des valeurs de leucocytes supérieures à 40×10^9 dans les produits de cytophèrese ($p < 0.05$ pour les CD34+ et $p = 0.041$ pour les CFU-GM).



Dans la littérature, l'impact des leucocytes sur la récupération à la décongélation viendrait principalement des polynucléaires contenus dans les poches de cytophérèse qui auraient un effet délétère sur la récupération [21]. Or sur notre cohorte, les polynucléaires neutrophiles n'ont aucun impact sur le rendement des progéniteurs. Cette influence potentielle est donc à confirmer sur une nouvelle cohorte.

- **Les plaquettes** : leur influence est également inverse à celle décrite dans la littérature. Elle est à la limite de significativité ($p=0,05$) sans qu'aucun groupe ne se démarque. En revanche, statistiquement, on observe une différence de récupération entre les recueils contenant plus ou moins de 400×10^9 plaquettes (seuil déclenchant actuellement la déplaquettisation des greffons en pré-transformation), avec un effet favorable pour les recueils riches en plaquettes.

Cette influence est toutefois à relativiser car elle n'est pas retrouvée sur le taux de récupération des CFU-GM ($p=0.1$) et la distribution des moyennes au niveau des sous-groupes est hétérogène. Elle est donc également à confirmer sur une autre cohorte.

Lors de la description des paramètres en pré-aphérèse, nous avons mis en évidence des patients qualifiés de « super-mobilisateurs ». Il s'agit de patients présentant des numérations de cellules CD34+ circulantes supérieure à $100/\mu\text{L}$ (la numération maximale dépassant 800 cellules CD34+/ μL).

Les recueils réalisés avec une **numération de cellules CD34+ au premier jour du cycle $\geq 100/\mu\text{L}$** présentent une récupération de progéniteurs à la décongélation significativement plus basse que ceux réalisés avec une numération au premier jour de cycle $< 60/\mu\text{L}$ ($p<0.0001$). Pour ces patients, il est conseillé de prévoir un greffon de richesse supérieure à celle souhaitée initialement.

La numération de cellules CD34+ circulantes au premier jour du cycle semble être le marqueur biologique influençant le plus significativement la récupération en progéniteurs lors de la décongélation.

La pathologie a également un impact significatif sur la récupération à la décongélation. Ainsi, les lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens présentent des rendements supérieurs à ceux observés dans les autres groupes de pathologies ($p<0.05$ comparé aux indications « Autres »).

Dans notre étude, le groupe des indications « Autres » présente les paramètres en pré-aphérèse et post apherèse les plus favorables pour l'autogreffe, mais paradoxalement la récupération de progéniteurs à la décongélation la plus faible : environ 50% des progéniteurs sont éliminés.

Les autres facteurs étudiés n'ont pas révélé d'impact significatif sur la récupération des progéniteurs (le délai entre le recueil de CSP et l'autogreffe, le taux de CD34+ décongelés ($\times 10^6/\text{kg}$), le nombre de granuleux immatures, n'ont pas d'influence sur le rendement à la décongélation).

Perspectives

L'étude de la récupération des progéniteurs en fonction du protocole de mobilisation serait intéressante à mener pour évaluer leur éventuel impact sur la décongélation et la sortie d'aplasie. Pour le plerixafor, une étude a démontré que les CSH contenues dans les produits de cytophérèse présentent un profil métabolique différent de celles collectées sans plerixafor, caractérisée par une diminution de la capacité de reconstitution hématologique [64].

Actuellement, la numération des cellules CD34+ est le seul critère de qualité disponible au moment du recueil et de la réinjection des CSP afin de déterminer la richesse en progéniteurs. En effet, l'inconvénient majeur de la numération des CFU-GM est la durée de la culture cellulaire (15 jours), ne permettant qu'une qualification à posteriori des produits de cytophérèse. Pour cette raison, ce marqueur biologique a été abandonné par de nombreux centres de greffe.

Des alternatives à la numération des CFU-GM sont envisagées pour mettre en évidence la faculté de prolifération des CSH. Par exemple, l'utilisation d'un marqueur de fonction métabolique analysable en cytométrie en flux couplé à l'antigène CD34 peut être envisagé comme marqueur de viabilité des cellules CD34+ à la place d'une étude de perméabilité avec le 7-AAD. Il existe deux marqueurs potentiels étudiés sur les greffons de sang de cordon dans l'allogreffe : le syto16 et l'ALDH. Une diminution de l'expression de syto16 définit un état pré-apoptotique qui se traduit par la perte de la capacité de « homing » grâce au gradient de SDF-1 [65]–[68].



La sortie d'aplasie

Les données de la littérature font état du lien entre le délai de sortie d'aplasie et la richesse en progéniteurs du greffon [18][19].

Dans notre cohorte, nous avons étudié le délai de sortie d'agranulocytose (récupération des polynucléaires après le traitement d'intensification) en fonction de la richesse en progéniteurs des produits de cytophérèse décongelés et de la pathologie.

Le seuil minimum permettant une reconstitution hématologique précoce est de $2 \times 10^6/\text{kg}$ au moment du recueil de CSP, un greffon optimal contient de 3 à 5×10^6 cellules CD34+/kg.

Certaines études rapportent un intérêt limité à quantifier la richesse en progéniteurs sur les produits de cytophérèse décongelés du fait d'une bonne corrélation entre la richesse avant et après décongélation. De plus, selon ces études, la quantification des progéniteurs après congélation ne serait pas corrélée avec la récupération des polynucléaires neutrophiles contrairement à la récupération des plaquettes [18][69][70].

Nous avons caractérisé les sorties d'agranulocytose par l'utilisation d'un indice : l'IR (l'indice de récupération des polynucléaires neutrophiles).

- **Pathologies de cinétique rapide de sortie d'agranulocytose : myélomes multiples et des indications « Autres »**

La sortie d'agranulocytose intervient en moyenne 11 jours après la réinjection de CSP.

- **Pathologies de cinétique lente de sortie d'agranulocytose : lymphomes hodgkiniens et non hodgkiniens et des leucémies aiguës.**

La sortie d'agranulocytose intervient en moyenne 14 jours après la réinjection de CSP.

Ensuite, au sein de chaque groupe, la numération des cellules CD34+ a également une influence, un greffon de richesse $\geq 2 \times 10^6/\text{kg}$ entrainera un délai de sortie d'agranulocytose plus court de 1 à 2 jours.

Au vu de ces résultats, la quantification de la richesse en progéniteurs après l'étape de décongélation des greffons semble donc indispensable.

L'influence de la pathologie et de la richesse des greffons administrés sont les paramètres à prendre en compte pour une reconstitution hématologique précoce.



Conclusion

En exploitant les données issues de deux cohortes importantes, cette étude menée au laboratoire d'Hématologie du CHU de Toulouse permet une analyse statistique robuste des marqueurs biologiques et généraux influençant chaque étape du processus d'autogreffe.

Elle a permis de révéler l'influence de certains paramètres au cours de chacune des étapes :

- Le recueil de CSP est influencé par le taux de CD34+ circulants. Un taux supérieur à 40/ μ L présente une forte valeur prédictive d'un recueil suffisant (95%), tandis qu'un taux inférieur à 15/ μ L est prédictif d'un recueil insuffisant.
- La récupération des progéniteurs lors de la décongélation des CSP est aussi influencée par le taux de CD34+ circulants. Un taux supérieur à 100/ μ L au premier jour du cycle est prédictif d'une mauvaise récupération ($p < 0.0001$).
- La sortie d'agranulocytose est influencée par la pathologie à l'origine de l'autogreffe : pathologies de cinétique rapide (myélomes multiples et les indications « Autres ») et pathologies de cinétique lente (lymphomes et leucémies aiguës) ($p < 0.0001$). La richesse en progéniteurs est également un facteur, indépendamment de la pathologie, prédictif d'une sortie précoce d'agranulocytose ($p < 0.0001$ et $p = 0.028$).

Cependant, les paramètres étudiés ne sont pas exhaustifs. Les marqueurs biologiques, aussi importants soient-ils, ne permettent pas à eux seuls d'expliquer les rendements d'aphérèse et de décongélation des CSP. Les données cliniques, thérapeutiques et propres au procédé de cytophérèse n'ont pas été prises en compte et constituent la principale limite de cette étude. Elles feront l'objet d'un travail complémentaire qui permettra une évaluation globale et complète des facteurs influençant chacune des étapes du processus de l'autogreffe.



Références bibliographiques

- [1] P. Moreau *et al.*, « Multiple myeloma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up », *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.*, vol. 28, n° suppl_4, p. iv52-iv61, juill. 2017.
- [2] S. F. Williams, T. Zimmerman, G. Grad, et R. Mick, « Source of stem cell rescue: bone marrow versus peripheral blood progenitors », *J. Hematother.*, vol. 2, n° 4, p. 521-523, 1993.
- [3] I. Pusic et J. F. DiPersio, « The use of growth factors in hematopoietic stem cell transplantation », *Curr. Pharm. Des.*, vol. 14, n° 20, p. 1950-1961, 2008.
- [4] A. Gratwohl, H. Baldomero, O. Schmid, B. Horisberger, M. Bargetzi, et A. Urbano-Ispizua, « Change in stem cell source for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in Europe: a report of the EBMT activity survey 2003 », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 36, n° 7, p. 575-590, oct. 2005.
- [5] M. Attal *et al.*, « A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. Intergroupe Français du Myélome », *N. Engl. J. Med.*, vol. 335, n° 2, p. 91-97, juill. 1996.
- [6] T. Philip *et al.*, « Autologous Bone Marrow Transplantation as Compared with Salvage Chemotherapy in Relapses of Chemotherapy-Sensitive Non-Hodgkin's Lymphoma », *N. Engl. J. Med.*, vol. 333, n° 23, p. 1540-1545, déc. 1995.
- [7] L. Robb, « Cytokine receptors and hematopoietic differentiation », *Oncogene*, vol. 26, n° 47, p. 6715-6723, oct. 2007.
- [8] K. K. Hirschi, S. Nicoli, et K. Walsh, « Hematopoiesis Lineage Tree Uprooted: Every Cell Is a Rainbow », *Dev. Cell*, vol. 41, n° 1, p. 7-9, avr. 2017.
- [9] J. Tay, J.-P. Levesque, et I. G. Winkler, « Cellular players of hematopoietic stem cell mobilization in the bone marrow niche », *Int. J. Hematol.*, vol. 105, n° 2, p. 129-140, févr. 2017.
- [10] « Agence de la biomédecine - Le rapport annuel médical et scientifique 2015 ». [En ligne]. Disponiblesur:<https://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2015/donnees/cellules/01-centres/synthese.htm>. [Consulté le: 11-févr-2018].
- [11] M. Cavo *et al.*, « Upfront autologous stem cell transplantation (ASCT) versus novel agent-based therapy for multiple myeloma (MM): A randomized phase 3 study of the European Myeloma Network (EMN02/HO95 MM trial). », *J. Clin. Oncol.*, vol. 34, n° 15_suppl, p. 8000-8000, mai 2016.
- [12] M. Attal *et al.*, « Autologous Transplantation for Multiple Myeloma in the Era of New Drugs: A Phase III Study of the Intergroupe Francophone Du Myelome (IFM/DFCI 2009 Trial) », *Blood*, vol. 126, n° 23, p. 391-391, déc. 2015.
- [13] M. Dreyling *et al.*, « Newly diagnosed and relapsed mantle cell lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up », *Ann. Oncol.*, vol. 25, n° suppl_3, p. iii83-iii92, sept. 2014.
- [14] H. Tilly et M. Dreyling, « Diffuse large B-cell non-Hodgkin's lymphoma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up », *Ann. Oncol.*, vol. 21, n° suppl_5, p. v172-v174, mai 2010.
- [15] D. R. Sutherland, L. Anderson, M. Keeney, R. Nayar, et I. Chin-Yee, « The ISHAGE Guidelines for CD34+ Cell Determination by Flow Cytometry », *J. Hematother.*, vol. 5, n° 3, p. 213-226, juin 1996.

- [16] K. Dauber, D. Becker, M. Odendahl, E. Seifried, H. Bonig, et T. Tonn, « Enumeration of viable CD34(+) cells by flow cytometry in blood, bone marrow and cord blood: results of a study of the novel BD™ stem cell enumeration kit », *Cytotherapy*, vol. 13, n° 4, p. 449-458, avr. 2011.
- [17] R. Schots *et al.*, « The absolute number of circulating CD34+ cells predicts the number of hematopoietic stem cells that can be collected by apheresis », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 17, n° 4, p. 509-515, avr. 1996.
- [18] D. S. Allan *et al.*, « Number of viable CD34+ cells reinfused predicts engraftment in autologous hematopoietic stem cell transplantation », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 29, n° 12, p. 967-972, juin 2002.
- [19] J. G. Bender, L. B. To, S. Williams, et L. S. Schwartzberg, « Defining a Therapeutic Dose of Peripheral Blood Stem Cells », *J. Hematother.*, vol. 1, n° 4, p. 329-341, janv. 1992.
- [20] C. G. Valentini *et al.*, « Graft Composition and Post-Thawing Cell Viability Influence the Hematopoietic Recovery in Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation », *J. Stem Cell Res. Ther.*, vol. 7, n° 3, p. 1-4, mars 2017.
- [21] H. Trébédén-Negre *et al.*, « Delayed recovery after autologous peripheral hematopoietic cell transplantation: potential effect of a high number of total nucleated cells in the graft », *Transfusion (Paris)*, vol. 50, n° 12, p. 2649-2659, déc. 2010.
- [22] « granocyte_srh_2008-08-08_11-26-13_317.pdf ». .
- [23] C. H. Weaver *et al.*, « Mobilization and harvesting of peripheral blood stem cells: randomized evaluations of different doses of filgrastim », *Br. J. Haematol.*, vol. 100, n° 2, p. 338-347, févr. 1998.
- [24] D. L. Cooper *et al.*, « Successful collection and engraftment of autologous peripheral blood progenitor cells in poorly mobilized patients receiving high-dose granulocyte colony-stimulating factor », *J. Clin. Apheresis*, vol. 27, n° 5, p. 235-241, nov. 2012.
- [25] J. E. Kim *et al.*, « Optimal timing of G-CSF administration for effective autologous stem cell collection », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 46, n° 6, p. 806-812, juin 2011.
- [26] C. M. Richman, R. S. Weiner, et R. A. Yankee, « Increase in circulating stem cells following chemotherapy in man », *Blood*, vol. 47, n° 6, p. 1031-1039, juin 1976.
- [27] A. Kessinger, J. O. Armitage, J. D. Landmark, D. M. Smith, et D. D. Weisenburger, « Autologous peripheral hematopoietic stem cell transplantation restores hematopoietic function following marrow ablative therapy », *Blood*, vol. 71, n° 3, p. 723-727, mars 1988.
- [28] M. J. Bishton, R. J. Lush, J. L. Byrne, N. H. Russell, B. E. Shaw, et A. P. Haynes, « Ifosfamide, etoposide and epirubicin is an effective combined salvage and peripheral blood stem cell mobilisation regimen for transplant-eligible patients with non-Hodgkin lymphoma and Hodgkin disease », *Br. J. Haematol.*, vol. 136, n° 5, p. 752-761, mars 2007.
- [29] F. Liu, J. Poursine-Laurent, et D. C. Link, « The Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor Is Required for the Mobilization of Murine Hematopoietic Progenitors Into Peripheral Blood by Cyclophosphamide or Interleukin-8 But Not Flt-3 Ligand », *Blood*, vol. 90, n° 7, p. 2522-2528, oct. 1997.
- [30] A. A. Toor, J. A. van Burik, et D. J. Weisdorf, « Infections during mobilizing chemotherapy and following autologous stem cell transplantation », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 28, n° 12, p. 1129-1134, 2001.
- [31] M. Gertz *et al.*, « Comparison of high-dose CY and growth factor with growth factor alone for mobilization of stem cells for transplantation in patients with multiple myeloma », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 43, n° 8, p. 619-625, avr. 2009.

- [32] V. Pavone *et al.*, « Mobilization of peripheral blood stem cells with high-dose cyclophosphamide or the DHAP regimen plus G-CSF in non-Hodgkin's lymphoma », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 29, n° 4, p. 285-290, févr. 2002.
- [33] M. J. Watts *et al.*, « ESHAP and G-CSF is a superior blood stem cell mobilizing regimen compared to cyclophosphamide 1.5 g m⁻² and G-CSF for pre-treated lymphoma patients: a matched pairs analysis of 78 patients », *Br. J. Cancer*, vol. 82, n° 2, p. 278-282, janv. 2000.
- [34] M. Mohty *et al.*, « Autologous haematopoietic stem cell mobilisation in multiple myeloma and lymphoma patients: a position statement from the European Group for Blood and Marrow Transplantation », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 49, n° 7, p. 865-872, juill. 2014.
- [35] B. Nervi, D. C. Link, et J. F. DiPersio, « Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization », *J. Cell. Biochem.*, vol. 99, n° 3, p. 690-705, oct. 2006.
- [36] C. W. Hendrix *et al.*, « Pharmacokinetics and Safety of AMD-3100, a Novel Antagonist of the CXCR-4 Chemokine Receptor, in Human Volunteers », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 44, n° 6, p. 1667-1673, juin 2000.
- [37] W. C. Liles *et al.*, « Augmented mobilization and collection of CD34+ hematopoietic cells from normal human volunteers stimulated with granulocyte-colony-stimulating factor by single-dose administration of AMD3100, a CXCR4 antagonist », *Transfusion (Paris)*, vol. 45, n° 3, p. 295-300, mars 2005.
- [38] J. F. DiPersio *et al.*, « Phase III Prospective Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Trial of Plerixafor Plus Granulocyte Colony-Stimulating Factor Compared With Placebo Plus Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Autologous Stem-Cell Mobilization and Transplantation for Patients With Non-Hodgkin's Lymphoma », *J. Clin. Oncol.*, vol. 27, n° 28, p. 4767-4773, oct. 2009.
- [39] G. Milone *et al.*, « Plerixafor on-demand combined with chemotherapy and granulocyte colony-stimulating factor: significant improvement in peripheral blood stem cells mobilization and harvest with no increase in costs », *Br. J. Haematol.*, vol. 164, n° 1, p. 113-123, janv. 2014.
- [40] S. Namdaroglu, S. Korkmaz, et F. Altuntas, « Management of mobilization failure in 2017 », *Transfus. Apher. Sci.*, vol. 56, n° 6, p. 836-844, déc. 2017.
- [41] C. P. R. Lacativa *et al.*, « Risk factors for unsuccessful peripheral blood stem cell harvesting using granulocyte-colony stimulating factor mobilization in patients with multiple myeloma », *Transfus. Apher. Sci.*, vol. 47, n° 3, p. 331-335, déc. 2012.
- [42] A. Olivieri *et al.*, « Proposed definition of 'poor mobilizer' in lymphoma and multiple myeloma: an analytic hierarchy process by ad hoc working group Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 47, n° 3, p. 342-351, mars 2012.
- [43] S. Giralte *et al.*, « Optimizing autologous stem cell mobilization strategies to improve patient outcomes: consensus guidelines and recommendations », *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.*, vol. 20, n° 3, p. 295-308, mars 2014.
- [44] B. Martín-Antonio *et al.*, « Impact of constitutional polymorphisms in VCAM1 and CD44 on CD34+ cell collection yield after administration of granulocyte colony-stimulating factor to healthy donors », *Haematologica*, vol. 96, n° 1, p. 102-109, janv. 2011.
- [45] M. Foglietti *et al.*, « Validation d'une méthode de déplaquettisation de cellules souches périphériques », *Transfus. Clin. Biol.*, vol. 24, n° 3, Supplement, p. 375, sept. 2017.
- [46] J. Li *et al.*, « Effectiveness and cost analysis of "just-in-time" salvage plerixafor administration in autologous transplant patients with poor stem cell mobilization kinetics », *Transfusion (Paris)*, vol. 51, n° 10, p. 2175-2182, oct. 2011.

- [47] R. Haas *et al.*, « Patient characteristics associated with successful mobilizing and autografting of peripheral blood progenitor cells in malignant lymphoma », *Blood*, vol. 83, n° 12, p. 3787-3794, juin 1994.
- [48] S. Armitage, R. Hargreaves, D. Samson, M. Brennan, E. Kanfer, et C. Navarrete, « CD34 counts to predict the adequate collection of peripheral blood progenitor cells », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 20, n° 7, p. 587-591, oct. 1997.
- [49] G. Tricot, M. H. Cottler-Fox, et G. Calandra, « Safety and efficacy assessment of plerixafor in patients with multiple myeloma proven or predicted to be poor mobilizers, including assessment of tumor cell mobilization », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 45, n° 1, p. 63-68, janv. 2010.
- [50] G. Calandra *et al.*, « AMD3100 plus G-CSF can successfully mobilize CD34+ cells from non-Hodgkin's lymphoma, Hodgkin's disease and multiple myeloma patients previously failing mobilization with chemotherapy and/or cytokine treatment: compassionate use data », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 41, n° 4, p. 331-338, févr. 2008.
- [51] R. F. Duarte *et al.*, « Plerixafor plus granulocyte CSF can mobilize hematopoietic stem cells from multiple myeloma and lymphoma patients failing previous mobilization attempts: EU compassionate use data », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 46, n° 1, p. 52-58, janv. 2011.
- [52] M. Koenigsmann, K. Jentsch-Ullrich, M. Mohren, E. Becker, M. Heim, et A. Franke, « The role of diagnosis in patients failing peripheral blood progenitor cell mobilization », *Transfusion (Paris)*, vol. 44, n° 5, p. 777-784, mai 2004.
- [53] A. Mendrone, C. A. Arrais, R. Saboya, D. de A. F. Chamone, et F. L. Dullely, « Factors affecting hematopoietic progenitor cell mobilization: An analysis of 307 patients », *Transfus. Apher. Sci.*, vol. 39, n° 3, p. 187-192, déc. 2008.
- [54] C. Hosing *et al.*, « Poor hematopoietic stem cell mobilizers: A single institution study of incidence and risk factors in patients with recurrent or relapsed lymphoma », *Am. J. Hematol.*, vol. 84, n° 6, p. 335-337, juin 2009.
- [55] L. Sanchez, Y. Wang, D. S. Siegel, et M. L. Wang, « Daratumumab: a first-in-class CD38 monoclonal antibody for the treatment of multiple myeloma », *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol*, vol. 9, juin 2016.
- [56] A. Alperovich et A. Younes, « Targeting CD30 Using Brentuximab Vedotin in the Treatment of Hodgkin Lymphoma », *Cancer J. Sudbury Mass*, vol. 22, n° 1, p. 23-26, 2016.
- [57] D. Karpova *et al.*, « Mobilization of hematopoietic stem cells with the novel CXCR4 antagonist POL6326 (balixafortide) in healthy volunteers—results of a dose escalation trial », *J. Transl. Med.*, vol. 15, janv. 2017.
- [58] A. Peled *et al.*, « The high-affinity CXCR4 antagonist BKT140 is safe and induces a robust mobilization of human CD34+ cells in patients with multiple myeloma », *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.*, vol. 20, n° 2, p. 469-479, janv. 2014.
- [59] J. Hoggatt *et al.*, « Rapid Mobilization Reveals a Highly Engraftable Hematopoietic Stem Cell », *Cell*, vol. 172, n° 1-2, p. 191-204.e10, janv. 2018.
- [60] P. Ramirez *et al.*, « BIO5192, a small molecule inhibitor of VLA-4, mobilizes hematopoietic stem and progenitor cells », *Blood*, vol. 114, n° 7, p. 1340-1343, août 2009.
- [61] A. Valenzuela-Fernández *et al.*, « Leukocyte elastase negatively regulates Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)/CXCR4 binding and functions by amino-terminal processing of SDF-1 and CXCR4 », *J. Biol. Chem.*, vol. 277, n° 18, p. 15677-15689, mai 2002.

- [62] E. Foïs *et al.*, « Recovery, viability and clinical toxicity of thawed and washed haematopoietic progenitor cells: analysis of 952 autologous peripheral blood stem cell transplantations », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 40, n° 9, p. 831-835, nov. 2007.
- [63] K. H. Haider, « Hematopoietic Stem Cell Transplantation: The Quality Matters », *J. Stem Cell Res. Ther.*, vol. 7, n° 6, p. 1-2, juin 2017.
- [64] P. Brunet de la Grange *et al.*, « Étude du contenu en cellules souches hématopoïétiques dans le sang périphérique mobilisé par G-CSF ou G-CSF/Plerixafor », *Transfus. Clin. Biol.*, vol. 24, n° 3, Supplement, p. 317, sept. 2017.
- [65] R. L. Sparrow, H. Komodromou, E. Tippett, T. Georgakopoulos, et W. Xu, « Apoptotic lymphocytes and CD34⁺ cells in cryopreserved cord blood detected by the fluorescent vital dye SYTO 16 and correlation with loss of L-selectin (CD62L) expression », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 38, n° 1, p. 61-67, juill. 2006.
- [66] M. Beksac et F. Preffer, « Is it time to revisit our current hematopoietic progenitor cell quantification methods in the clinic? », *Bone Marrow Transplant.*, vol. 47, n° 11, p. 1391-1396, nov. 2012.
- [67] K. Shoulars *et al.*, « Development and validation of a rapid, aldehyde dehydrogenase bright-based cord blood potency assay », *Blood*, vol. 127, n° 19, p. 2346-2354, mai 2016.
- [68] S. Frändberg, S. Li, C. Boreström, J. Holgersson, et L. Palmqvist, « The aldehyde dehydrogenase cord blood potency assay excludes early apoptotic cells », *Transfusion (Paris)*, mars 2018.
- [69] J. F. Abrahamsen, T. Wentzel-Larsen, et O. Bruserud, « Autologous transplantation: the viable transplanted CD34⁺ cell dose measured post-thaw does not predict engraftment kinetics better than the total CD34⁺ cell dose measured pre-freeze in patients that receive more than 2x10⁶ CD34⁺ cells/kg », *Cytotherapy*, vol. 6, n° 4, p. 356-362, 2004.
- [70] G. Venton *et al.*, « Hematopoietic reconstitution after autologous hematopoietic stem cell transplantation: do CD45 (+) CD34 (+) CD38 (-) progenitors really matter in real life? », *Transfus. Apher. Sci. Off. J. World Apher. Assoc. Off. J. Eur. Soc. Haemapheresis*, avr. 2018.



Annexes

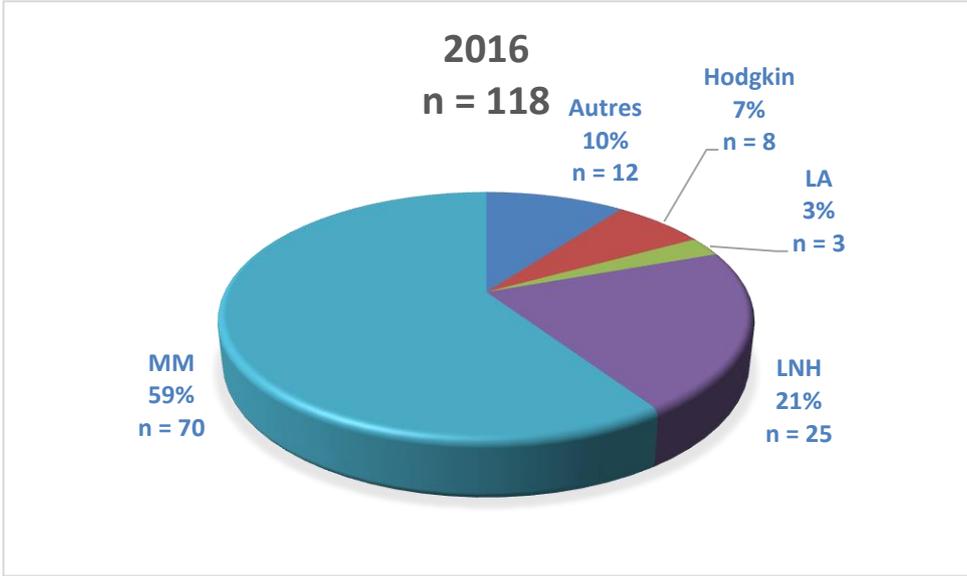
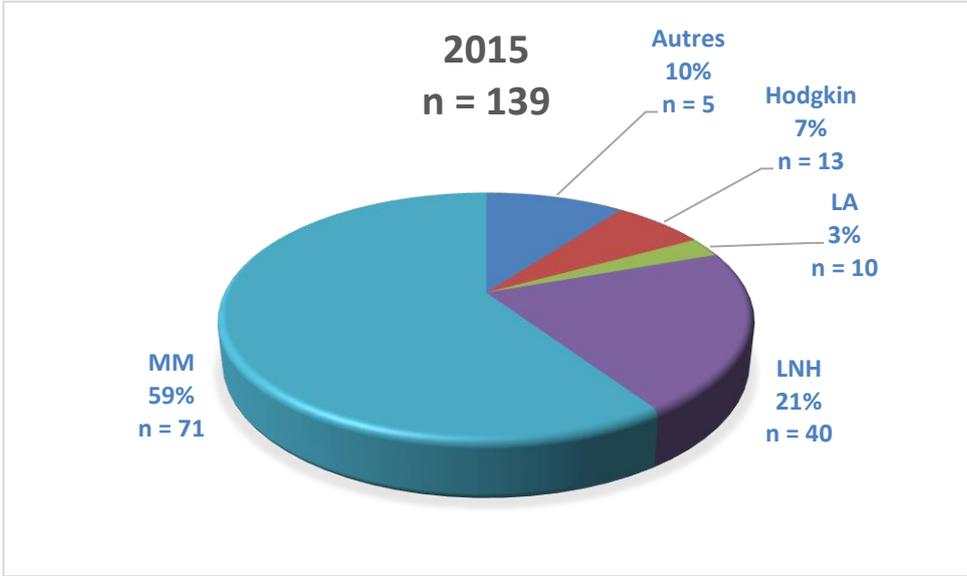
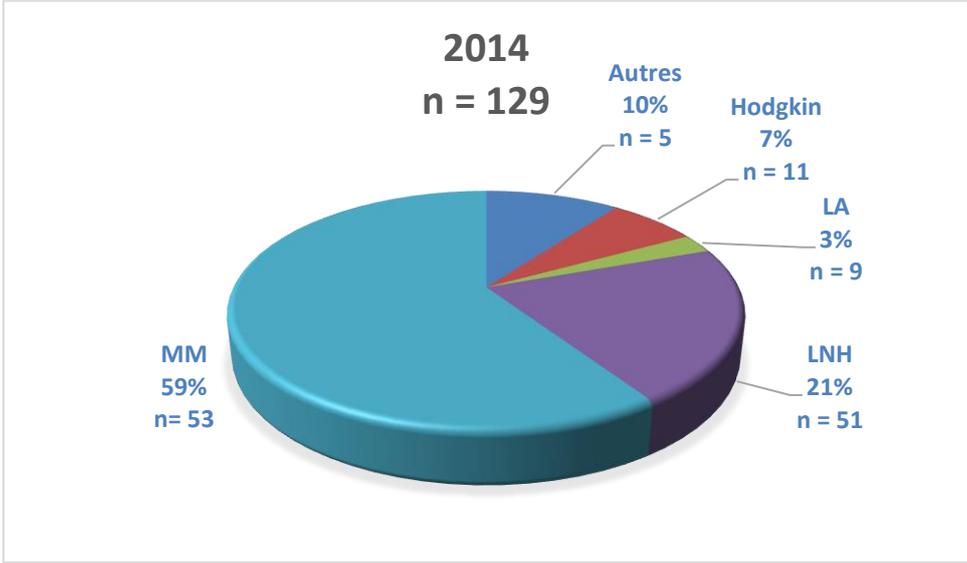
Annexe 1. Cohorte de recueils de CSP	96
Annexe 1.1. Données générales de la cohorte de recueil	96
Annexe 1.2. Répartition des indications de cycles de recueil de CSP par année	97
Annexe 1.3. Paramètres sanguins avant la cytophérèse	98
Annexe 1.4. Paramètres biologiques des poches de cytophérèse	99
Annexe 1.4.1. Paramètres biologiques avant transformation	99
Annexe 1.4.2. Après transformation	100
Annexe 2. Progéniteurs recueillis par cycle de cytophérèse	101
Annexe 3. Cellules CD34+ collectées dans les produits de cytophérèse en fonction de la concentration sanguine en cellules CD34+	102
Annexe 3.1. Concentration sanguine en cellules CD34+ (μL) : test post-hoc de Dunn pour comparaisons multiples	102
Annexe 3.2. Concentration sanguine en cellules CD34+ (%) : test post-hoc de Dunn pour comparaisons multiples	102
Annexe 4. Les données de décongélation des CSP	103
Annexe 4.1. Description des données	103
Annexe 4.2. Facteurs influençant la récupération à la décongélation des cellules CD34+	104
Annexe 4.2.1. Les polynucléaires neutrophiles	104
Annexe 4.2.2. Les granuleux immatures	104
Annexe 4.2.3. Les leucocytes	105
Annexe 4.2.4. Les plaquettes	105
Annexe 5. Données de sortie d'aplasie	106
Annexe 5.1. Données générales de sortie d'aplasie	106
Annexe 5.2. Influence de la richesse en CFU-GM du greffon sur récupération des polynucléaires neutrophiles, toutes pathologies confondues	107
Annexe 5.3. Influence de la richesse en CFU-GM du greffon sur les pathologies de cinétique rapide de récupération des polynucléaires neutrophiles	108
Annexe 5.4. Influence de la richesse en CFU-GM du greffon sur les pathologies de cinétique lente de récupération des polynucléaires neutrophiles	109

Annexe 1. Cohorte de recueils de CSP

Annexe 1.1. Données générales de la cohorte de recueil

	<i>Total</i>	<i>MM</i>	<i>LNH</i>	<i>Hodgkin</i>	<i>LA</i>	<i>Autres</i>
Nombre de patients	323	164	101	25	15	18
Nombre de recueils	595	318	161	51	29	36
Nombre de cycles	386	194	116	32	22	22
Nombre de recueils par patient [minimum-maximum]	1,84 [0-6]	1,94 [1-6]	1,59 [0-4]	2,04 [1-6]	1,93 [0-3]	2 [0-6]
Nombre de cycles par patients [minimum-maximum]	1,19 [1-3]	1,18 [1-3]	1,15 [1-2]	1,28 [1-3]	1,47 [1-3]	1,22 [1-3]
Sexe ratio (H/F)	194/129	86/78	65/36	19/6	10/5	14/4
Âge (années) Moyenne (écart-type)	53,25 (12,17)	58,94 (6,97)	52, (10,91)	33,5 (12,58)	48,06 (12,58)	39,86 (13,56)

Annexe 1.2. Répartition des indications de cycles de recueil de CSP par année



Annexe 1.3. Paramètres sanguins avant la cytophèrese

	<i>Total</i>	<i>MM</i>	<i>LNH</i>	<i>Hodgkin</i>	<i>LA</i>	<i>Autres</i>
<i>Cellules CD34+ sanguines (/μL)</i>	31	33	33	22	14	50
<i>Médiane (écart-type)</i>	(76,75)	(47,40)	(117,31)	(33,40)	(51,19)	(93,44)
<i>Cellules CD34+ Sanguines (%)</i>	0,11	0,12	0,14	0,09	0,06	0,19
<i>Médiane (écart-type)</i>	(0,61)	(0,61)	(0,76)	(0,25)	(0,32)	(0,54)
<i>Leucocytes sanguins (x10⁹/L)</i>	29,64	33,51	23,15	24,8	18,81	34,28
<i>Médiane (écart-type)</i>	(21,69)	(21,65)	(23,50)	(14,50)	(20,75)	(20,45)

Annexe 1.4. Paramètres biologiques des poches de cytophère

Annexe 1.4.1. Paramètres biologiques avant transformation

	<i>Total</i>	<i>MM</i>	<i>LNH</i>	<i>Hodgkin</i>	<i>LA</i>	<i>Autres</i>
Cellules CD34+ (x10 ⁶ /kg) Médiane (écart-type)	2,90 (4,15)	3,1 (2,89)	2,5 (5,20)	2,65 (2,31)	2,3 (3,58)	3,96 (7,99)
Leucocytes (x10 ⁹) Médiane (écart-type)	27,58 (15,40)	28,74 (16,61)	24,56 (12,41)	31,71 (15,63)	28,43 (12,05)	34,41 (14,75)
Plaquettes (x10 ⁹) Médiane (écart-type)	266 (325,01)	360 (365,23)	184 (179,27)	227 (239,27)	230 (209,70)	235 (346,67)
PNN Moyenne (écart-type)	7% (10,11)	8% (11,35)	4% (6,81)	9% (9,20)	7% (9,49)	8% (10,78)
Myélémie Moyenne (écart-type)	12% (10,10)	11% (10,00)	11% (9,00)	15% (11,91)	8% (4,81)	15% (13,44)
Monocytes Moyenne (écart-type)	35% (13,77)	33% (12,58)	42% (14,45)	36% (12,26)	36% (14,00)	31% (11,86)
Lymphocytes Moyenne (écart-type)	46% (18,29)	48% (18,68)	43% (16,88)	40% (18,00)	49% (18,30)	46% (16,92)

Annexe 1.4.2. Après transformation

	<i>Total</i>	<i>MM</i>	<i>LNH</i>	<i>Hodgkin</i>	<i>LA</i>	<i>Autres</i>
Cellules CD34+ (x10 ⁶ /kg) Médiane (écart-type)	2,63 (3,39)	2,8 (2,76)	2,37 (4,28)	2,47 (1,94)	1,9 (2,94)	3,52 (5,17)
Récupération des cellules CD34+ à la transformation Médiane(écart-type)	89,19% (68,55)	88,68% (90,76)	90,25% (12,68)	89,71% (15,84)	87,42% (26,71)	90,91% (9,15)
CFU-GM (x10 ⁴ /kg) Médiane (écart-type)	59,15 (111,17)	61,9 (69,3)	54,05 (156,11)	60,4 (39,83)	42 (70,32)	96,1 (192,05)
Leucocytes (x10 ⁹) Médiane (écart-type)	25,98 (13,64)	26,41 (14,62)	22,45 (11,14)	28,81 (14,04)	26,39 (10,54)	32,31 (13,2)
Récupération des leucocytes à la transformation Médiane (écart-type)	92,73 (8,38)	92,63 (8,00)	93,74 (8,53)	92,30 (5,05)	89,34 (5,66)	93,47 (6,45)
Plaquettes (x10 ⁹) Médiane (écart-type)	233 (206,68)	301 (219,08)	163 (127,82)	176 (171,45)	215 (172,78)	222 (200,31)
Récupération des plaquettes à la transformation Médiane (écart-type)	85,89 (13,11)	85,72 (14,92)	85,24 (9,76)	85,76 (10,23)	85,95 (8,56)	88,32 (10,43)

Annexe 2. Progéniteurs recueillis par cycle de cytophérèse

	Total	MM	LNH	Hodgkin	LA	Autres
	<i>n=386</i>	<i>n=194</i>	<i>n=116</i>	<i>n=32</i>	<i>n=22</i>	<i>n=22</i>
CD34+ avant transformation (x10 ⁶ /kg) Médiane (écart-type)	5,56 (5,01)	6,41 (3,96)	4,80 (5,47)	5,33 (3,56)	3,78 (5,40)	9,03 (8,57)
CD34+ après transformation (x10 ⁶ /kg) Médiane (écart-type)	4,97 (4,21)	5,60 (3,60)	4,22 (4,67)	4,80 (3,20)	3,47 (4,81)	7,74 (5,67)
CFU-GM après transformation (x10 ⁴ /kg) Médiane (écart-type)	106,9 (139,35)	118,95 (95,13)	95,10 (174,94)	94,85 (70,39)	68,75 (99,57)	199,20 (243,82)



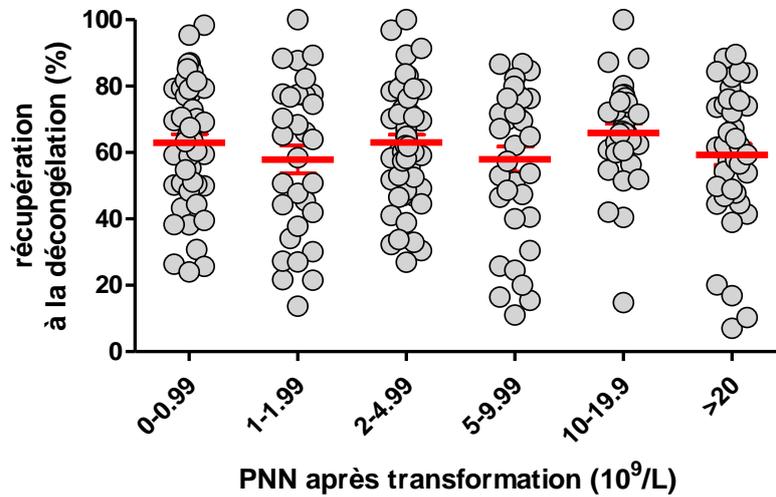
Annexe 4. Les données de décongélation des CSP

Annexe 4.1. Description des données

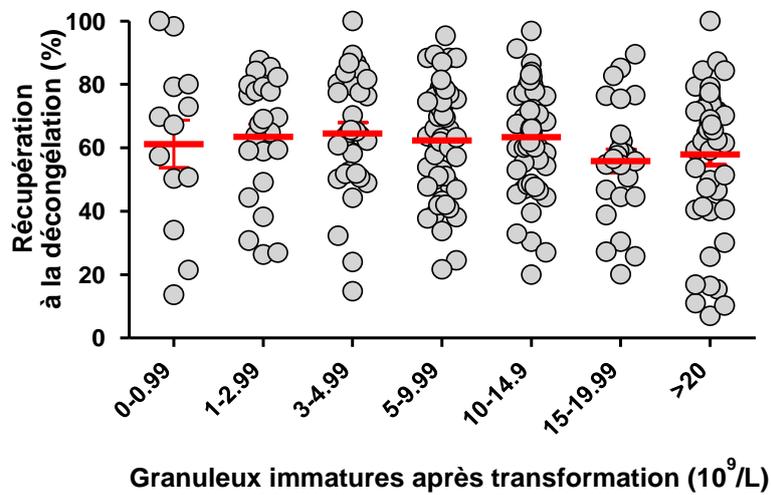
	<i>Total</i>	<i>MM</i>	<i>LNH</i>	<i>Hodgki</i> <i>n</i>	<i>LA</i>	<i>Autres</i>
<i>Nombre de patients</i>	215	130	48	17	8	14
<i>Nombre de décongélations</i>	249	144	48	21	8	28
<i>CD34 greffon(x106/kg)</i> <i>Médiane (écart-type)</i>	2,08 (1,18)	1,94 (1,01)	2,64 (1,34)	2,52 (1,21)	2,54 (1,11)	1,97 (1,18)
<i>Récupération moyenne</i> <i>des cellules CD34+ (écart-</i> <i>type)</i>	64% (19.5)	61% (20.2)	65% (16.4)	68% (15.35)	64% (13.9)	52% (21.7)
<i>CFU-GM greffon (x104/kg)</i> <i>Médiane (écart-type)</i>	62,20 (54,5)	45,7 (43,7)	77,25 (63,9)	54,2 (37,8)	57,5 (34,6)	56,25 (67,2)
<i>Récupération moyenne</i> <i>des CFU-GM (écart-type)</i>	68% (25.3)	68% (28.7)	77% (25.0)	81% (27.0)	68% (23.6)	49% (25.3)
<i>Leucocytes greffon (x10⁹)</i>	31,9 (22,0)	28,18 (20,4)	36,45 (25,0)	38,78 (25,9)	58,4 (26,1)	30,49 (16,34)
<i>Récupération moyenne</i> <i>des leucocytes (écart-type)</i>	97% (11,79)	99% (12,59)	96% (10,49)	98% (8,10)	99% (3,54)	96% (8,01)
<i>Plaquettes greffon (x10⁹)</i>	220 (156)	233 (160)	189 (145)	211 (173)	305 (174)	189 (125)
<i>Récupération moyenne</i> <i>des plaquettes (écart-type)</i>	66% (13,34)	65% (14,22)	69% (19,66)	68% (7,0.6)	66% (3,20)	70% (7,94)

Annexe 4.2. Facteurs influençant la récupération à la décongélation des cellules CD34+

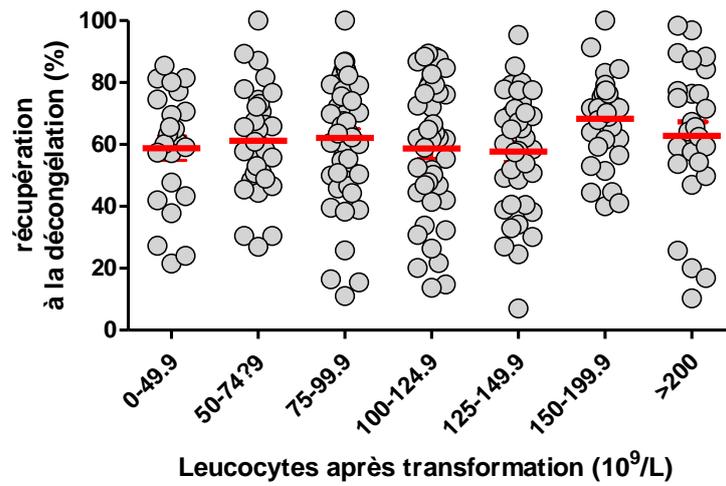
Annexe 4.2.1. Les polynucléaires neutrophiles



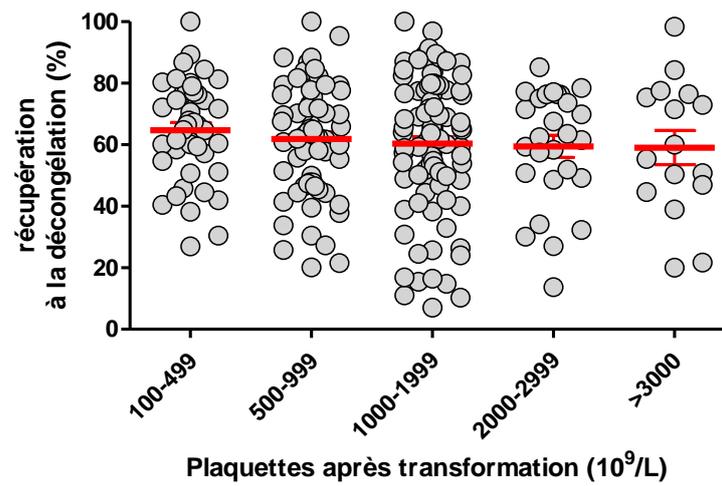
Annexe 4.2.2. Les granuleux immatures



Annexe 4.2.3. Les leucocytes



Annexe 4.2.4. Les plaquettes



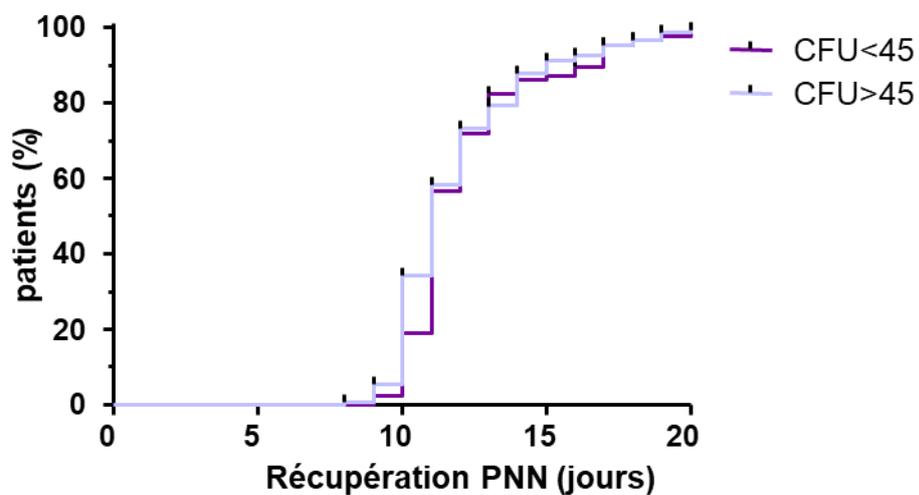
Annexe 5. Données de sortie d'aplasie

Annexe 5.1. Données générales de sortie d'aplasie

	<i>Total</i>	<i>MM</i>	<i>LNH</i>	<i>Hodgkin</i>	<i>LA</i>	<i>Autres</i>
Nombre de patients	215	130	48	17	8	14
Nombre d'autogreffes	236	131	48	21	8	28
CD34 greffon (x10 ⁶ /kg) Médiane (écart-type)	2.44 (1,1)	2.31 (0,90)	2.90 (1,34)	2.75 (1,21)	2.65 (1,11)	2.33 (1,18)
Autogreffes : CD34+ entre 1 et 2 x10 ⁶ /kg	90 (38%)	55 (42%)	14 (29%)	4 (19%)	3 (36%)	14 (50%)
Autogreffes : CD34+ <1 x10 ⁶ /kg	12 (5%)	8 (6%)	1 (2%)	2 (10%)	0	1 (4%)
CFU-GM greffon (x10 ⁴ /kg) Médiane (écart-type)	66,27 (51,25)	58,42 (43,06)	86,70 (63,90)	65,77 (37,76)	68,41 (34,65)	68,90 (67,27)
Nombre de greffes avec CFU-GM < 45 x10 ⁴ /kg	90 (38%)	56 (42%)	10 (21%)	6 (29%)	2 (25%)	16 (57%)
Délai moyen de récupération des PNN (jours) [minimum-maximum]	12 [8-73]	11 [8-73]	14 [9-23]	13 [10-20]	14 [11-19]	11 [9-14]
Délai moyen de récupération des plaquettes (jours) [minimum-maximum]	12 [5-72]	12 [7-72]	14 [5-26]	14 [9-46]	12 [8-17]	10 [6-15]



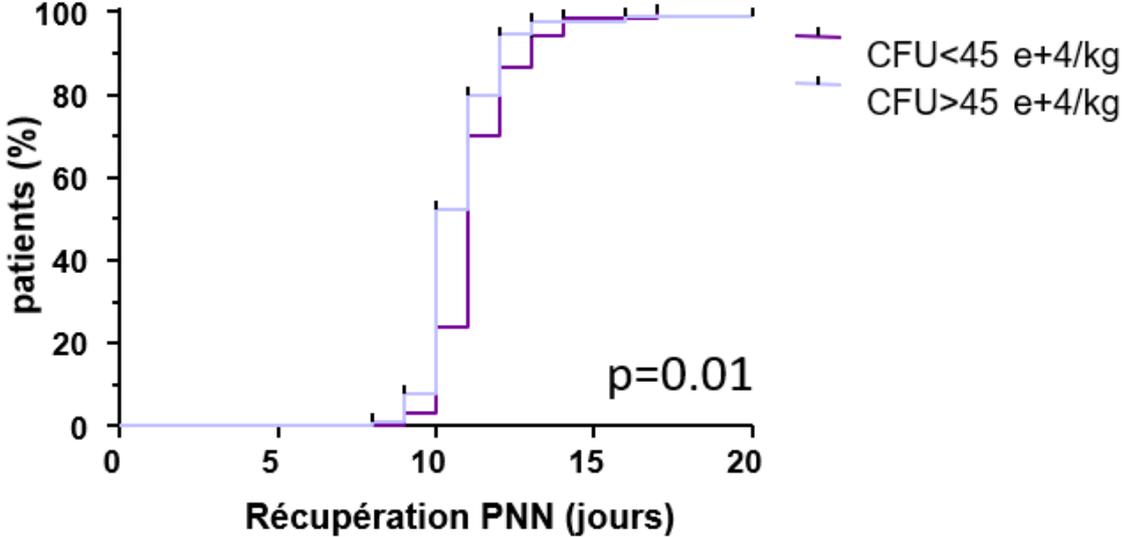
Annexe 5.2. Influence de la richesse en CFU-GM du greffon sur récupération des polynucléaires neutrophiles, toutes pathologies confondues



	CFU-GM < 45 x10 ⁴ /kg	CFU-GM ≥ 45 x10 ⁴ /kg
<i>IR</i> ₅₀	11	11
<i>IR</i> ₉₀	17	15



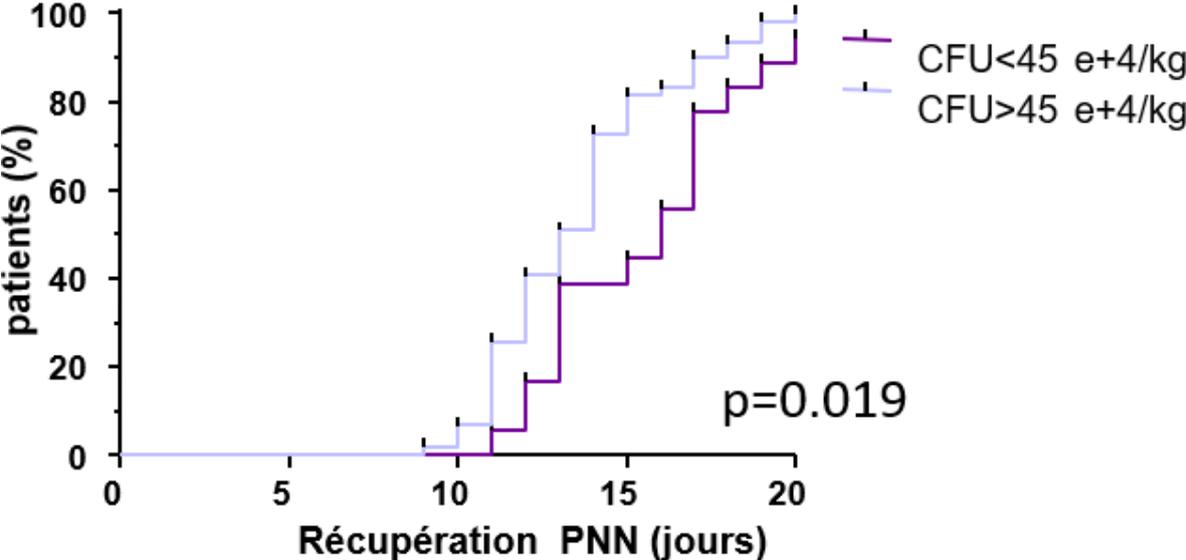
Annexe 5.3. Influence de la richesse en CFU-GM du greffon sur les pathologies de cinétique rapide de récupération des polynucléaires neutrophiles



	<i>CFU-GM < 45 x10⁴/kg</i>	<i>CFU-GM ≥ 45 x10⁴/kg</i>
<i>IR₅₀</i>	11	10
<i>IR₉₀</i>	13	12



Annexe 5.4. Influence de la richesse en CFU-GM du greffon sur les pathologies de cinétique lente de récupération des polynucléaires neutrophiles



	CFU-GM < 45 x10 ⁴ /kg	CFU-GM ≥ 45 x10 ⁴ /kg
IR ₅₀	16	13
IR ₉₀	20	18

Serment de Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

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

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

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères, si j'y manque.



Etude des marqueurs biologiques influençant le recueil de cellules souches hématopoïétiques dans le cadre de l'autogreffe.

Le but de cette étude est de décrire les données biologiques au cours du processus d'autogreffe afin d'identifier les facteurs influençant chaque étape sur une cohorte de recueil (n=595) et de sortie d'aplasie (n=286).

Le recueil de CSP est influencé par le taux de CD34+ circulants : Un taux supérieur à 40/ μ L est prédictif d'un recueil suffisant (95%) tandis qu'un taux inférieur à 15/ μ L est prédictif d'un recueil insuffisant. La récupération des progéniteurs à la décongélation est également influencée par le taux de CD34+ circulants : un taux supérieur à 100/ μ L au premier jour du cycle est prédictif d'un mauvais rendement ($p < 0.0001$). L'évaluation de la durée de sortie d'agranulocytose doit prendre en compte la pathologie ($p < 0.0001$) : sortie rapide d'agranulocytose : les myélomes multiples et les indications « Autres » et sortie lente d'agranulocytose : les lymphomes et les leucémies aiguës. Au sein de ces groupes de pathologies, la richesse en progéniteurs est influente ($p < 0.0001$ et $p = 0.028$).

Les paramètres biologiques, à eux seuls, ne permettent pas une étude exhaustive du processus de l'autogreffe. Une étude complémentaire prendra en compte les données cliniques et thérapeutiques des patients.

Mots-clés : Autogreffe, CD34+, Facteurs influençant

Study of biological markers influencing the collection of hematopoietic stem cells in autologous transplantation

The purpose of this study is to describe the biological data during the autologous process in order to identify the factors influencing each step on a cohort of collection (n=595) and engraftment (n=286).

The collection of CSP is influenced by the circulating CD34+ level: A rate higher than 40/ μ L is predictive of a sufficient collection (95%) whereas a rate lower than 15/ μ L is predictive of insufficient collection. Yield of progenitors on thawing is also influenced by the circulating CD34+ level: a rate greater than 100/ μ L on the first day of the cycle is predictive of poor performance ($p < 0.0001$). The evaluation of the neutrophil's engraftment must consider the pathology ($p < 0.0001$): rapid neutrophil's engraftment: multiple myeloma and "Other" indications, and slow neutrophil's engraftment: lymphomas and acute leukemias. Within these groups of pathologies, progenitor richness is influential ($p < 0.0001$ and $p = 0.028$). Biological parameters, alone, do not allow an exhaustive study of the autograft process. A complementary study will consider the clinical and therapeutic data of patients.

Keywords : Autologous transplantation, CD34+, Influencing factors

