

Programme de Soutien aux Techniques Innovantes  
Coûteuses (STIC) en cancérologie – 2008

---

**Place du chimérisme dans le  
suivi des allogreffes de CSH :**

***Rationalisation de la prescription  
&  
Analyse médico-économique des  
différentes prises en charge***

---

- - Version 2.0 du 28 mai 2009 - -

|   |   |
|---|---|
| <b><i>Investigateur principal :</i></b>         | Pr. J-F. ELIAOU   |
| <b><i>Investigateur principal associé :</i></b> | Dr. M. MOHTY  |
| <b><i>Méthodologiste :</i></b>                  | Pr. J-P. DAURES   |
| <b><i>Economiste :</i></b>                      | Pr. G. DURU   |
| <b><i>Comité scientifique :</i></b>             | Pr. D. BLAISE<br>Pr. A. BUZYN<br>Pr. M. MICHALLET<br>Pr. N. MILPIED |

# Sommaire

|   |           |
|---|-----------|
| <b>ETAT DES LIEUX</b> -----   | <b>3</b>  |
| ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES-----  | 3         |
| ANALYSE DU CHIMERISME-----  | 5         |
| <i>Principes d'analyse du chimérisme</i> -----  | 5         |
| <i>Analyse du chimérisme par PCR « GeneScan »</i> -----   | 6         |
| <i>Analyse du chimérisme par RT-PCR</i> -----   | 7         |
| <i>Analyse du chimérisme sur populations cellulaires triées</i> -----   | 8         |
| <i>Rendu des résultats du chimérisme</i> -----  | 8         |
| <i>Nombre et chronologie des analyses de chimérisme</i> -----   | 9         |
| <i>Nature du prélèvement</i> -----  | 10        |
| <i>Contrôles de qualité</i> -----   | 11        |
| <i>Tarifification des actes de chimérisme</i> -----   | 11        |
| INTERET CLINIQUE DU CHIMERISME-----   | 12        |
| <i>Valeur pronostique du chimérisme</i> -----   | 12        |
| <i>Chimérisme et prédiction de l'aGVHD</i> -----  | 13        |
| <i>Chimérisme et prédiction de la rechute</i> -----   | 14        |
| <i>Chimérisme comme marqueur de maladie résiduelle</i> -----  | 15        |
| <i>Chimérisme et traitement préemptif des complications</i> -----   | 16        |
| <b>JUSTIFICATION DU PROJET - RATIONNEL</b> -----  | <b>19</b> |
| <b>PROTOCOLE</b> -----  | <b>21</b> |
| OBJECTIFS-----  | 22        |
| <i>Objectif principal</i> -----   | 22        |
| <i>Objectifs secondaires</i> -----  | 22        |
| PATIENTS-----   | 24        |
| <i>Critères d'inclusion</i> -----   | 24        |
| <i>Critères de non-inclusion</i> -----  | 24        |
| <i>Nombre de patients</i> -----   | 25        |
| <i>Stratification des patients</i> -----  | 25        |
| <i>Age</i> -----  | 25        |
| <i>Type d'hémopathie maligne</i> -----  | 25        |
| <i>Autres critères</i> -----  | 26        |
| CENTRES D'ALLOGREFFES DE CSH PARTICIPANT AU PROGRAMME -----   | 26        |
| METHODES D'ANALYSE DU CHIMERISME – ASPECTS PRATIQUES-----   | 27        |
| <i>Analyse du chimérisme par PCR « GeneScan » monoplex</i> -----  | 27        |
| <i>Analyse du chimérisme par PCR « GeneScan » multiplex</i> -----   | 29        |
| <i>Analyse du chimérisme par RT-PCR (PCR quantitative)</i> -----  | 30        |
| <i>Analyse du chimérisme sur populations cellulaires triées</i> -----   | 31        |
| PROTOCOLE D'ETUDE-----  | 32        |
| <i>Saisie des données</i> -----   | 32        |
| <i>Suivi des patients</i> -----   | 32        |
| <i>Analyse du chimérisme par méthode de haute sensibilité sur un sous-groupe de patients</i> -----                | 34        |
| <i>Définition et étude de ce sous-groupe de patients</i> -----  | 34        |
| <i>Calcul du nombre de sujets nécessaires</i> -----   | 35        |
| <i>Evaluation du chimérisme</i> -----   | 36        |
| <i>Critères d'évaluation du chimérisme</i> -----  | 36        |
| <i>Critères pronostiques</i> -----  | 37        |
| <i>Critères d'évaluation du chimérisme comme outil substitutif de l'évaluation de la maladie résiduelle</i> ----- | 37        |
| <i>Critères d'impacts clinique et thérapeutique</i> -----   | 38        |
| <i>Analyse statistique</i> -----  | 38        |
| <i>Evaluation des coûts – analyse économique</i> -----  | 39        |
| <b>ORGANISATION GENERALE, COORDINATION ET GESTION DU PROGRAMME</b> -----  | <b>41</b> |
| CENTRE COORDONNATEUR -----  | 41        |
| CENTRES INVESTIGATEURS CLINIQUES ASSOCIES -----   | 41        |
| COMITE SCIENTIFIQUE DE PILOTAGE -----   | 42        |
| <b>ASPECTS ETHIQUES ET REGLEMENTAIRES</b> -----   | <b>43</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| SOUSSION DU PROTOCOLE AU CPP-----                | 43        |
| DECLARATION A LA CNIL DES BASES DE DONNEES ----- | 43        |
| PUBLICATIONS-----                                | 44        |
| <b>BIBLIOGRAPHIE -----</b>                       | <b>45</b> |

## Etat des lieux

### Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) constitue désormais un traitement classique des hémopathies malignes, notamment les leucémies aiguës et des lymphomes non hodgkiniens. L'incidence annuelle pour 100.000 habitants de ces pathologies est : 3 à 5 pour les leucémies aiguës (60% leucémies aiguës myéloblastiques, 40% leucémies aiguës lymphoblastiques) et 15 pour les lymphomes non hodgkiniens. Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) et les lymphomes non hodgkiniens surviennent plus fréquemment chez l'adulte alors que les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) sont plus fréquentes chez l'enfant.

L'allogreffe de CSH, comme traitement des hémopathies malignes, a deux objectifs : 1) remplacer l'hématopoïèse du patient receveur par celle du donneur ; 2) induire, chez le patient allogreffé, une réponse allogénique anti-tumorale exercée par les cellules immunocompétentes greffées afin d'éliminer les cellules malignes résiduelles (maladie résiduelle, MRD). La persistance ou la réapparition des cellules du receveur doit faire craindre la non prise de l'allogreffe de CSH et expose le patient receveur à un risque de rechute de son hémopathie maligne.

En 2006 (*Source : Société Française de Greffe de Moelle et de thérapie cellulaire – SFGM/TC*), 1074 allogreffes de CSH ont été réalisées pour hémopathies malignes dans 37 centres référencés en France. On observe une stabilité du nombre d'allogreffes depuis 2005. 22% des allogreffés étaient des enfants (patients de moins de 18 ans), 47% des adultes entre 18 et 50 ans et 31% des patients âgés de plus de 50 ans. L'âge médian était de 8 ans (<1-18) en pédiatrie et de 47 ans (19-75) chez les adultes. Le nombre d'allogreffes chez les sujets âgés de plus de cinquante ans est à peu près stable depuis 2005 mais en nette augmentation par rapport aux années précédentes. Plus de la moitié des greffons étaient des cellules souches périphériques (51%) alors que 13% des allogreffes de CSH ont été réalisées à partir d'unités de sang placentaire (USP). L'utilisation d'USP est en croissance régulière au détriment des CSH de la moelle osseuse. En 2006, le pourcentage d'allogreffes de CSH réalisées avec des donneurs non apparentés étaient de 49%, en nette augmentation par rapport aux années précédentes. La répartition des pathologies allogreffées, stable au cours des dernières années, était la suivante : 57% leucémies aiguës, 22% lymphomes et 12% syndromes myélodysplasiques.

Les conditionnements non myéloablatifs et l'utilisation des USP comme source de CSH ont élargi considérablement les indications de l'allogreffe ces dernières années. Les conditionnements non myéloablatifs permettent de greffer des patients plus âgés, comme en témoignent les données ci-dessus. Parallèlement, le recours plus fréquent aux USP et, notamment, la possibilité d'utiliser deux USP pour greffer un patient adulte, aboutit à un nombre croissant de patients allogreffés en France. Ceci explique également la proportion croissante d'allogreffes de CSH à partir de donneurs non apparentés.

La survie globale après allogreffe de CSH s'est considérablement améliorée ces dernières années. La médiane de survie a pratiquement doublé entre les périodes 1995-99 et 2000-06, passant de 19,5 mois (16,6-23,8) à 36,4 mois (30,9-46). La probabilité de survie, estimée à 5 ans, est de 45,3 %, toutes pathologies, stades de gravité et âges confondus.

Même si les progrès sont notables, les complications de l'allogreffe de CSH restent donc graves et relativement fréquentes. Parmi celles-ci, la forme aigüe de la maladie du greffon contre l'hôte (aGVHD) et la rechute de l'hémopathie maligne représentent, à côté des infections, les complications majeures de l'allogreffe de CSH.

On estime de 12% à 31%, en fonction de la source de CSH (moelle osseuse ou cellules souches périphériques) et de l'âge du patient ( $\leq$  ou  $>$  à 20 ans), le risque de aGVHD grave (stade III-IV) et de l'ordre de 50% le risque de aGVHD de stade II-IV (*Source NMDP sur la période 1998-2002*).

La rechute est, de loin, l'élément pronostic le plus péjoratif. Cependant, le risque de rechute diminue au cours du temps après allogreffe de CSH. Des travaux déjà anciens, confirmés depuis, montrent que 82% des patients n'ayant pas rechuté deux ans après l'allogreffe sont toujours en rémission complète 9 ans après (*Frassoni et coll., 1994 ; Dazzi et coll., 2007*), le pic de survenue de la rechute se situant, en général, entre 3 mois et un an post-allogreffe. On estime entre 30 et 35% le risque de rechute après allogreffe de CSH, tous types de conditionnement, pathologies et stades de la maladie confondus. Ce risque varie en fonction du type conditionnement avec un pourcentage plus important de rechutes, de l'ordre de 50%, avec les conditionnements non myéloablatifs. La probabilité de rechute varie également en fonction du stade la maladie au moment de l'allogreffe de CSH : la plus faible étant observée chez les patients avec leucémies aigües en première rémission (10 à 30%), elle atteint 40-50% chez les patients en seconde rémission ou plus et jusqu'à 70% chez les patients présentant un stade avancé de la maladie

(Bagicalupo, 2004 ; Ringden et coll., 2005). Enfin, il est important de différencier la notion de rechute post-allogreffe de celle de persistance de la maladie tumorale, pour laquelle aucune phase de rémission complète ne peut être documentée.

## **Analyse du chimérisme**

### **Principes d'analyse du chimérisme**

L'analyse du chimérisme permet de caractériser et de quantifier, chez les patients allogreffés, l'origine donneur ou receveur de la population cellulaire obtenue à partir du sang périphérique ou de la moelle osseuse. Afin de détecter la non prise de l'allogreffe de CSH et un risque accru de rechute de l'hémopathie maligne, conséquence d'une réponse allogénique anti-tumorale insuffisante, la méthode d'analyse du chimérisme choisie doit avoir une sensibilité suffisante pour détecter la persistance ou la réapparition de la plus faible quantité possible de cellules du receveur. Le principe d'analyse du chimérisme hématopoïétique consiste à utiliser des marqueurs génétiques qui différencient le receveur avant allogreffe de son donneur afin de définir l'origine des cellules hématopoïétiques après l'allogreffe de CSH. La méthode d'analyse du chimérisme choisie doit avoir une sensibilité suffisante afin de détecter après l'allogreffe de CSH la persistance ou la réapparition de la plus faible quantité possible de cellules du receveur.

Les marqueurs génétiques peuvent être soit des marqueurs liés au sexe, soit des marqueurs portés sur les chromosomes autosomiques qui sont utilisés dans la majorité des cas. En effet, seules les allogreffes de CSH entre donneur et receveur de sexe différent peuvent être évaluées avec des marqueurs génétiques portés par le chromosome Y. Deux catégories de marqueurs génétiques portés par les chromosomes autosomiques sont donc utilisées :

- majoritairement des marqueurs génétiques avec polymorphisme de répétition de tandems de nucléotides (VNTR : *Variable Number of Tandem Repeats*, ou STR : *Short Tandem repeats*)
- des substitutions/insertions/substitutions portant sur un ou deux nucléotides (SNP : *Single nucleotide Polymorphism*, SIDP : *Short insersion/deletion polymorphism*).

La différence allélique entre donneurs et receveurs d'allogreffe de CSH peut être mise en évidence par plusieurs méthodes avec un taux d'informativité, donné par le pourcentage de couples donneurs-receveurs analysables, une sensibilité, un type de quantification (semi-quantitative ou

absolue en fonction du principe d'amplification par PCR) et une praticabilité variables (cf. tableau ci-dessous).

| Marqueurs         | Technique d'analyse du polymorphisme | Informativité   | Sensibilité (%) | Quantification (principe de PCR)      | Praticabilité                 |
|-------------------|--------------------------------------|---|-----------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| Marqueurs chrom Y | FISH XY                              | restreinte (couples donneur-receveur de sexe différent) | 0,1-1           | absolue                               | Difficile                     |
| VNTR/STR          | PCR Hybridation                      | ~100%   | 2-10            | semi-quantification (PCR compétitive) | Difficile                     |
|                   | PCR Détection visuelle               | ~100%   | 2-10            | semi-quantification (PCR compétitive) | Facile                        |
|                   | PCR GeneScan                         | ~100%   | 1-5             | semi-quantification (PCR compétitive) | Facile                        |
|                   | SNP/SIDP                             | PCR temps réel RT-PCR                                   | 70-90%          | 0,1-1                                 | absolue (PCR non compétitive) |

### Analyse du chimérisme par PCR « GeneScan »

L'analyse du chimérisme hématopoïétique par PCR GeneScan est la plus utilisée en France. Cette méthode consiste à déterminer, avant l'allogreffe de CSH, le ou les marqueurs génétiques (STR, VNTR) pour le(s)quel(s) il existe une différence de nombre de répétitions de tandems de nucléotides entre le donneur et le receveur. Pour cela, après PCR avec des amorces oligonucléotidiques fluorescentes, une migration électrophorétique des produits d'amplification est réalisée sur un séquenceur automatique d'ADN. Un logiciel dédié (GeneScan, Applied Biosystems Inc.) permet de visualiser les différents allèles et d'obtenir une quantification relative de chacun des allèles. Le ou les marqueurs informatifs, pour lesquels au moins un allèle du receveur est différent de celui (ceux) du donneur, sont par la suite analysés après allogreffe. Dans ces conditions, la comparaison des intensités des signaux correspondant aux allèles spécifiques du donneur et du receveur avant allogreffe permet d'évaluer la quantité relative de cellules du donneur et du receveur en se référant à une gamme de dilutions d'ADN du receveur dans celui du donneur.

Deux formats existent :

- format « multiplex » : il s'agit de trousse commerciales composées d'une quinzaine de marqueurs fluorescents dont un ou plusieurs sont sensés être différents entre le donneur et le receveur. Cependant, la quantification précise du chimérisme est moins aisée à obtenir que pour le format « monoplex »;
- format « monoplex » : à partir d'une batterie d'une dizaine marqueurs génétiques systématiquement testés, le choix définitif d'un marqueur informatif pour un couple

donneur/receveur donné est effectué en fonction des critères suivants : une différence de polymorphisme entre le donneur et le receveur, la configuration du polymorphisme entre donneur et receveur, une très bonne corrélation entre les quantifications obtenues avec le(s) marqueur(s) et une gamme de dilution d'ADN du receveur avant allogreffe dans celui du donneur. Dans ces conditions, le chimérisme peut être évalué de façon quantitative par comparaison des intensités de fluorescence des allèles spécifiques du donneur et du receveur en se référant à cette gamme de dilution.

Ces méthodes permettent d'atteindre une sensibilité de détection de 1 à 5 % en fonction de la configuration du polymorphisme des allèles du donneur et du receveur et une reproductibilité inter-analyses inférieure à 10% (*Lion, 2001 ; Acquaviva et coll., 2003*).

### **Analyse du chimérisme par RT-PCR**

Il s'agit d'approches permettant théoriquement la quantification absolue du chimérisme et qui reposent sur l'analyse des substitutions (SNP) ou des insertions/délétions (SIDP) d'un tout petit nombre de nucléotidiques (1 à 3). Ces locus polymorphes sont dispersés sur tout le génome et extrêmement nombreux puisque leur présence est estimée à 1 SNP/SIDP toutes les 1000 paires de bases. Ces polymorphismes présentent l'avantage de se prêter à une amplification allele-spécifique évaluable quantitativement par PCR en temps réel utilisant la technologie des sondes Taqman. Ces méthodes permettent de s'affranchir des biais rencontrés avec les méthodes de PCR quantitative « GeneScan », notamment : la baisse de l'efficacité de l'amplification survenant après un certain nombre de cycles en phase exponentielle et le phénomène de compétition lors de l'amplification de marqueurs ayant un polymorphisme de répétition de séquences (STR ou VNTR). Le nombre de sondes et d'amorces oligonucléotidiques est variable en fonction des méthodes de 7 à une vingtaine. La sensibilité de détection de la population minoritaire varie de 0,1 à 1% également en fonction des méthodes (*Alizadeh et coll., 2002 ; Maas et coll., 2003 ; Harries et coll., 2005*).

Cependant, avec ces approches, 10 à 30% des couples donneurs-receveurs ne peuvent pas être différenciés par les SNP/SIDP, alors que l'informativité des STR/VNTR est quasi-totale. Ceci peut s'observer, notamment, en cas d'allogreffes de CSH intrafamiliales. De plus, certaines méthodes, notamment celle d'Alizadeh et coll., nécessitent une quantité d'ADN telle que l'analyse du chimérisme s'avère difficile en post-allogreffe immédiat et sur les populations cellulaires triées (cf. infra).



***La comparaison des méthodes d'analyse du chimérisme sera abordée dans ce projet en tenant compte de la sensibilité des résultats obtenus, de la praticabilité des méthodes en routine, de leur rôle prédictif et de leur coût.***

### **Analyse du chimérisme sur populations cellulaires triées**

L'analyse du chimérisme sur des populations cellulaires triées présente deux intérêts : 1) l'amélioration de la sensibilité pour la détection d'une population minoritaire ; 2) l'analyse du chimérisme sur une population cellulaire soit impliquée dans la réponse immunitaire allogénique, soit appartenant à la lignée cellulaire de la prolifération maligne.

Le tri cellulaire est généralement obtenu en utilisant des billes magnétiques couplées à un anticorps monoclonal spécifique des différentes lignées cellulaires (anticorps monoclonal anti-CD3 pour la lignée T, anticorps monoclonal anti-CD19 pour la lignée B, etc...). L'enrichissement cellulaire peut et doit être contrôlé par cytométrie en flux en utilisant des anticorps monoclonaux fluorescents spécifiques des populations cellulaires triées.

Généralement, le degré de pureté des populations cellulaires triées dépasse 95%. Le chimérisme étant analysé sur un compartiment cellulaire et non sur la population globale, on estime que la sensibilité de détection des méthodes d'analyse du chimérisme est de l'ordre de 0,005% (*Lion et coll., 2001 ; Hancock et coll., 2003*). Ainsi, les résultats du chimérisme obtenus sur la totalité des cellules du sang périphérique ou de la moelle osseuse s'avèrent souvent peu informatifs et doivent être interprétés avec précaution.

***Ces aspects constituent un des objectifs que se propose d'aborder ce projet du point de vue médical et économique.***

### **Rendu des résultats du chimérisme**

Les résultats de l'analyse du chimérisme sont rendus comme suit :

- **chimère totale** : correspond à l'absence de cellule du receveur détectable dans le prélèvement compte tenu de la sensibilité de la méthode et du(des) marqueur(s) génétique(s) utilisé(s) pour le couple donneur-receveur considéré,

- **chimère partielle (ou mixte)** : correspond à la détection d'un pourcentage de cellules du receveur supérieur au seuil de sensibilité de la méthode pour le(s) marqueur(s) génétique(s) utilisé(s) pour le couple donneur-receveur considéré. La valeur du chimérisme est exprimée en pourcentage de cellules du receveur,
- **absence de chimère** : indique qu'aucune cellule du donneur n'a pu être détectée dans le prélèvement, compte tenu de la sensibilité de la méthode et du(des) marqueur(s) génétique(s) utilisé(s) pour le couple donneur-receveur considéré.

Le délai de rendu des analyses de chimérisme est et doit être de l'ordre de quelques jours, généralement moins d'une semaine. Ce paramètre est important à prendre en compte si l'on considère les conséquences cliniques et thérapeutiques du suivi du chimérisme. Tout doit être mis en œuvre, notamment les moyens humains, matériels et en réactifs pour tenir de tels délais afin que les résultats du suivi du chimérisme puissent constituer des éléments pronostiques des complications de l'allogreffe de CSH réellement « utilisables » en clinique (*Bader et coll., 2005 ; Baron et coll., 2006*).

### **Nombre et chronologie des analyses de chimérisme**

Le nombre et la chronologie des prélèvements pour le suivi du chimérisme après allogreffe de CSH sont variables d'une équipe à l'autre. Des prélèvements rapprochés tels que J30, J60, J90, J120, J180, J270, J360, M18 et M24 post-allogreffe sont réalisés par certaines équipes de façon systématique. Ces prélèvements peuvent être plus fréquents afin de surveiller l'évolution d'un chimérisme partiel ou les conséquences d'une immunothérapie post-allogreffe (baisse rapide la cyclosporine, *DLI donor lymphocyte infusion*).

Il est important de souligner que, plus qu'une valeur unique, c'est la cinétique des valeurs du chimérisme sur des prélèvements rapprochés (deux ou plus) qui est informative. Cependant, aucune donnée consensuelle n'existe dans la littérature concernant le seuil au-delà duquel une variation des valeurs du chimérisme doit être interprétée comme significative. En pratique, on admet, dans certains centres d'allogreffe de CSH, qu'en cas de chimère partielle, un doublement des valeurs du pourcentage du chimérisme sur 2 prélèvements consécutifs réalisés à 2 semaines d'intervalle (par ex : 3 % puis 6 % 14 jours plus tard) est significative en tenant compte du niveau de sensibilité de la méthode et des marqueurs utilisés. Ces critères ont été adoptés dans le cadre du PHRC « *Protocole d'étude du chimérisme et de la maladie résiduelle TCR/IgH après*

*transplantation de cellules souches hématopoïétiques dans les hémopathies malignes de l'enfant » (investigateur principal : Pr. P. Bordigoni), actuellement en cours.*

Certaines équipes insistent sur la nécessité de réaliser des analyses de chimérisme de façon répétée afin de pouvoir détecter précocement les effets indésirables ou une inefficacité de l'allogreffe de CSH (*Bader et coll., 2004 ; Kristt et coll., 2007*). L'intérêt théorique d'un tel suivi rapproché semble évident surtout dans les situations de chimérisme partiel telles qu'on les observe fréquemment avec les conditionnements non myéloablatifs et les allogreffes avec USP. Outre les problèmes logistiques que cela peut poser, le caractère prédictif d'un suivi rapproché du chimérisme n'a pas été confirmé par d'autres travaux de la littérature. Ainsi, certaines études insistent sur le caractère discriminant de certains points précis du suivi du chimérisme pour la prédiction des complications de l'allogreffe telles que l'aGVHD et la rechute (*Petersen et coll., 2004 ; Mohty et coll., 2007*).

Bien que des tentatives de standardisation aient été réalisées (*Antin et coll., 2001*), aucun consensus portant la chronologie des analyses de chimérisme n'existe à l'heure actuelle que ce soit dans la littérature ou au niveau des pratiques des centres d'allogreffes de CSH français. Concernant la fréquence des prélèvements pour chimérisme, là aussi la pratique des centres est variable. Sur un échantillon de 10 centres français d'allogreffes de CSH, que nous venons d'interroger pour la préparation de ce programme, la médiane du nombre d'analyses de chimérisme pratiquée est de 5 avec des extrêmes de 3 à 8 sur deux ans de suivi post-allogreffe.

***Un des objectifs du projet est d'aborder ces aspects tant sur le plan médical qu'économique.***

### **Nature du prélèvement**

L'analyse du chimérisme est généralement réalisée à partir des cellules du sang périphérique, beaucoup plus rarement à partir de celles de la moelle osseuse. Les résultats de la littérature sont contradictoires sur l'intérêt du chimérisme sur les cellules médullaires. Il semble que la persistance d'un chimérisme partiel précoce des lymphocytes T au niveau sanguin ne soit pas corrélée avec l'existence d'un chimérisme mixte médullaire. En effet, la persistance de T matures du receveur transitoire est documentée (*Roux et coll., 1996 ; Mattson et coll., 2001*). Il a été rapporté que l'analyse médullaire serait plus sensible que celle des cellules hématopoïétiques

périphériques (*Stumph et coll., 2007*). Cependant ceci serait peut-être dû à une « contamination » de la moelle par des cellules stromales originaires du receveur. En effet, *Mattson et coll. (Mattson et coll., 2001)* n'ont pas montré de différence de sensibilité entre moelle et sang. Enfin, un suivi précis du chimérisme médullaire comportant des prélèvements répétés, pose problème chez l'enfant et surtout chez l'adulte.

### **Contrôles de qualité**

Aucun contrôle de qualité des analyses de chimérisme n'a jusqu'ici été organisé en France. Il est cependant important, compte tenu de la diffusion et du nombre d'analyses réalisées ainsi que de l'impact clinique supposé, de prévoir de tels contrôles. De plus, aussi bien en termes de bonnes pratiques des analyses biologiques que sur les plans médico-économique et médico-légal, ces contrôles de qualité s'avèrent indispensables. Ils pourraient porter sur la sensibilité des méthodes utilisées par les différents centres et la reproductibilité des résultats obtenus.

Seul, en Europe, un organisme britannique (UK-NEQAS) organise un contrôle externe de qualité depuis 2007. Très peu de laboratoires français utilisent ce service.

### **Tarification des actes de chimérisme**

Une grande variabilité de la cotation des actes de chimérisme existe entre les différents centres en France. Pour une analyse de chimérisme donnée, la cotation peut varier de 1 à 10 : BHN 120 (32,4 €) à BHN 1160 (313,20 €), d'après l'enquête réalisée très récemment auprès de 10 centres français. Cette dispersion ne peut pas être expliquée par l'appartenance administrative des laboratoires : CHU ou EFS, mais, plus vraisemblablement par la diversité des méthodes utilisées, des moyens humains à disposition et du volume d'analyses réalisées impactant sur le coût des consommables et des réactifs.

Il est indispensable qu'une harmonisation de la tarification des actes de chimérisme soit entreprise. Ceci passera par une certaine standardisation des techniques et des moyens permettant leur réalisation.

*Cet aspect est l'un des objectifs du présent projet.*

## **Intérêt clinique du chimérisme**

### **Valeur pronostique du chimérisme**

La valeur pronostique du chimérisme est généralement retrouvée par de nombreuses études de cohorte publiées dans la littérature. Il faut, cependant, souligner que compte tenu de la nature des pathologies allogreffées suivies par chimérisme, les études rassemblent rarement un nombre élevé de patients. De plus, étant donné le contexte pathologique, des études cas-témoins ou des études comparatives randomisées ou non randomisées sont impossibles à réaliser dans ce domaine. Enfin, la variabilité des méthodes de détection du chimérisme utilisées ainsi que les différences de fréquence du suivi retrouvées dans la littérature peuvent expliquer les discordances de conclusions. Un travail très récent insiste sur les précautions à prendre dans l'interprétation des études prenant en compte des résultats de chimérisme sur une population cellulaire non triée et globalisant les pathologies. Il souligne également la nécessité d'entreprendre des études prospectives utilisant le chimérisme sur cellules triées dans un contexte pathologique défini. Ceci afin d'obtenir une interprétation informative du suivi du chimérisme permettant de déboucher sur des attitudes cliniques appropriées (*Lim et coll., Bone Marrow Transplant 2007*).

Le suivi du chimérisme après allogreffe de CSH, en particulier dans le cas des allogreffes avec conditionnement non myéloablatif, est devenu un paramètre important permettant de prédire la non prise de greffe et de servir d'indicateur pour la mise en place de l'immunothérapie post-allogreffe : baisse de la cyclosporine et/ou injection de lymphocytes du donneur (DLI) (*Bader et coll., 2005 ; Baron et coll., 2006*).

Plus récemment, l'utilisation des unités de sang placentaire (USP) comme source de CSH, chez l'enfant et l'adulte, positionne l'analyse du chimérisme parmi un des éléments indispensable du suivi post-allogreffe. En effet, il est classique de retrouver avec ce type d'allogreffe un chimérisme partiel persistant pendant plusieurs semaines. Notamment, la cinétique du chimérisme chez les patients allogreffés avec deux USP est tout à fait particulière puisqu'on observe, généralement vers le 3<sup>ème</sup> - 4<sup>ème</sup> mois après la greffe, la disparition apparente d'un des deux greffons placentaires (*Barker et coll., 2003 ; Kang et coll., 2006 ; Schoemans et coll., 2006 ; Haspel et coll., 2007 ; Wagner et coll., 2007*).

Par contre, en ce qui concerne les autres complications de l'allogreffe de CSH telles que l'aGVHD et surtout les rechutes, le rôle prédictif du chimérisme est plus discuté.

*Un des objectifs majeurs de ce projet sera d'évaluer l'intérêt du chimérisme dans la prédiction des complications de l'allogreffe de CSH en tenant compte des paramètres techniques et du contexte pathologique. Cet aspect sera abordé tant sur le plan médical que sur le plan économique.*

### **Chimérisme et prédiction de l'aGVHD**

L'analyse du chimérisme en post-allogreffe sur les populations intervenant dans la réponse allogénique, telles que les lymphocytes T (totaux, CD4, CD8) par exemple, constitue un élément permettant de prédire la survenue d'une aGVHD et l'efficacité de la réponse allogénique anti-tumorale.

Chez les patients allogreffés avec des conditionnements non myéloablatifs, la présence d'un chimérisme total donneur établi dans le premier mois est associé à un risque plus élevé de survenue d'une aGVHD grade II-IV. Dans un travail de Petersen et coll. (*Petersen et coll., 2004*) portant sur 24 patients allogreffés avec un conditionnement non myéloablatif, la présence d'un nombre significativement élevé de lymphocytes T CD8 du donneur à J14 post-allogreffe est associée à un risque accru de aGVHD de grade II-IV. Chez 102 patients allogreffés avec un conditionnement non myéloablatif, Mohty et coll. ont pu montrer que la présence d'un chimérisme total donneur des lymphocytes T à J30 post-allogreffe était associée à une incidence plus élevée de aGVHD grade II-IV (*Mohty et coll., 2007*).

Ces résultats ont été confirmés par plusieurs travaux de la littérature (*Antin et coll., 2001 ; Maris et coll., 2003 ; Baron et coll., 2004*), dont celui de Lim et coll. (*Lim et coll., Bone Marrow Transplant 2007*) qui insiste également sur la valeur ajoutée apportée par l'étude du chimérisme sur populations cellulaires triées et notamment les lymphocytes T comme élément prédictif d'une aGVHD sévère.

## Chimérisme et prédiction de la rechute

Il s'agit d'un sujet très controversé.

Certains travaux (*Roux et coll., 1996 ; Milfin et coll., 1999 ; Choi et coll., 2000 ; Schaap et coll., 2002*) montrent que la présence d'un chimérisme partiel ne représente pas un élément défavorable vis-à-vis d'une rechute après allogreffe dans les leucémies aiguës. Cependant, il s'agit très souvent de petites séries, incluant essentiellement des adultes, recevant un greffon déplété en lymphocytes T, avec un nombre limité de prélèvements pour analyse du chimérisme.

Ces résultats ont, néanmoins, été confirmés par des études plus récentes rapportant des séries de patients adultes traités avec des conditionnements ablatifs ou non et une déplétion T *in vivo* (*Montero et coll., 2005 ; Michaelis et coll., 2007 ; Lim et coll., Br J Haematol 2007 ; Lim et coll. Bone Marrow Transplant 2007*). Toutefois, dans au moins deux de ces études, les patients présentant un chimérisme partiel avec un pourcentage significatif de cellules du receveur bénéficiaient d'une ou plusieurs séries de DLI à titre de traitement pré-emptif. Dans ces conditions, le pronostic post-allogreffe était similaire à celui des patients présentant un chimérisme total donneur. Ces résultats sont donc à prendre avec précaution (*Montero et coll., 2005 ; Lim et coll., Br J Haematol 2007*).

A l'inverse, il existe une importante littérature (les travaux suivants sont marquants et cités pour l'exemple : *Thiede et coll., 2001 ; Sedlaek et coll., 2002 ; Massenkeil et coll., 2003 ; Hancock et coll., 2003 ; Barrios et coll., 2003 ; Bader et coll. Bone Marrow Transplant 2004 ; Bader et coll. J Clin Oncol 2004*) qui démontre que la détection d'un chimérisme partiel était un facteur de mauvais pronostic en termes de risque de rechutes sans qu'il y ait toujours de parallélisme avec la survenue d'une aGVHD. Il est généralement observé, comme l'ont bien montré Khan et coll. (*Khan et coll., 2004*) chez les patients atteints de leucémies aiguës, que les rechutes post-allogreffes sont précédées d'une phase transitoire de chimérisme partiel qu'il est important de mettre en évidence par un suivi précis. Certaines de ces études incluaient des enfants et des adultes atteints de LAL pour lesquels il semble que le laps de temps entre l'apparition du chimérisme partiel, correspondant à la résurgence des cellules du receveur, et la rechute cytologique soit différent. Il a été montré, dans les LAL, que chez l'adulte, la rechute cytologique suit rapidement, habituellement en moins d'un mois, l'apparition d'un chimérisme partiel, alors que chez l'enfant l'intervalle de temps peut aller jusqu'à 6 mois (*Guimond et coll., 2000 ; Wäsch et coll., 2000*).

Chez les patients porteurs d'hémopathies myéloïdes malignes, l'apparition retardée d'un chimérisme total donneur des lymphocytes T était corrélée à un risque élevé de rechutes (*Bader et coll. Bone Marrow Transplant 2004 ; Mohty et coll., 2007*). Mattson et coll. ont même observé que 70 % des chimérismes partiels avaient été détectés dans la lignée spécifiquement impliquée dans la maladie (*Mattson et coll. 2001*). Les mêmes observations ont été faites chez les enfants atteints de LAL (*Bader et coll. J Clin Oncol 2004*).

### **Chimérisme comme marqueur de maladie résiduelle**

Le but des méthodes d'évaluation de la maladie résiduelle est de détecter de façon précoce et infracytologique la rechute. Classiquement la maladie résiduelle est évaluée et quantifiée par la mise en évidence des anomalies moléculaires spécifiques des cellules tumorales.

Qu'elles fassent appel à la biologie moléculaire pour les transcrits de fusion ou au phénotypage par cytométrie en flux, ces techniques sont sensibles et spécifiques. Elles constituent des marqueurs prédictifs très fiables mais ne s'appliquent qu'à une partie des leucémies aiguës notamment myéloblastiques (*Frankfurt et coll., 2007*). En revanche, l'analyse des réarrangements des gènes des immunoglobulines (Ig) et/ou du récepteur des lymphocytes T (TCR) permet de quantifier la maladie résiduelle de façon sensible et spécifique chez près de 100% des patients atteints de LAL, constituant de très bons marqueurs pronostiques (*Cave et coll. 1998 ; Mortuza et coll., 2002 ; Willemse et coll., 2002 ; Szczepański, 2007*). Cependant, de façon générale la détection de la maladie résiduelle et, en particulier, la quantification de la maladie résiduelle par l'analyse des réarrangements des gènes des Ig/TCR, ne sont réalisées que par un nombre limité de laboratoires en France posant le problème de la diffusion de ces méthodes d'analyse.

Bien qu'une abondante littérature ait abordé l'éventualité de remplacer les méthodes classiques par l'analyse du chimérisme réalisée sur les cellules de la lignée tumorale pour quantifier la maladie résiduelle, aucune étude n'a réellement comparé la valeur pronostique de ces deux approches.

***Un des objectifs de ce projet sera de réaliser une telle comparaison en tenant compte des aspects médicaux et économiques. De façon plus générale, ce projet permettra de définir la place du chimérisme parmi les marqueurs prédictifs de la maladie résiduelle en fonction du contexte pathologique.***



## Chimérisme et traitement préemptif des complications

Il s'agit de l'aspect le plus complexe, car décisionnel, étant donné l'absence de consensus dans la littérature. L'attitude thérapeutique est très variable d'un centre à l'autre et même d'un médecin greffeur à l'autre. Autant la présence chez le patient allogreffé d'un chimérisme total donneur entraîne généralement l'absence de toute modulation de l'immunosuppression post-allogreffe ; autant il n'y a pas de règle en présence d'un chimérisme partiel.

Trois situations de chimérisme partiel peuvent être décrites :

- chimérisme partiel stable avec faible pourcentage ( $\leq 10-15\%$ ) de cellules du receveur : on n'observe pas de disparition totale des cellules du receveur depuis l'allogreffe de CSH,
- chimérisme partiel stable avec un pourcentage élevé ( $\geq 15\%$ ) de cellules du receveur,
- chimérisme partiel évolutif : réapparition des cellules du receveur après une phase de chimérisme total donneur ou de chimérisme partiel stable. Cette situation ne peut s'observer que si le patient a bénéficié d'un suivi précis du chimérisme avec des analyses rapprochées.

Le seuil décisionnel de chimérisme partiel n'est pas connu. Certains auteurs s'abstiennent de toute intervention sur l'immunosuppression ou de toute immunothérapie adoptive post-allogreffe devant un chimérisme partiel persistant. A titre d'exemple, Lim et coll. rapportent une cohorte de 22 patients atteints de LAM ou de syndromes myélodysplasiques, allogreffés avec un conditionnement non myéloablatif et présentant un chimérisme partiel stable des lymphocytes T. En l'absence de toute modification de l'immunosuppression post-allogreffe et de DLI, 5 patients seulement présentaient un chimérisme total donneur alors que les autres conservaient un chimérisme partiel stable sans complication après une médiane d'un an de suivi (*Lim et coll. Bone Marrow Transplant 2007*).

D'autres auteurs interviennent sur l'immunosuppression post-allogreffe et/ou mettent en place une immunothérapie adoptive devant l'apparition d'un chimérisme partiel après une phase de chimérisme total donneur ou un chimérisme partiel stable avec pourcentage élevé de cellules du receveur (*Bader et coll. Bone Marrow Transplant, 2004 ; J Clin Oncol, 2004 ; Montero et coll., 2005*). Cependant le seuil décisionnel est variable d'une équipe à l'autre. Dans le cadre du PHRC, actuellement en cours, « *Protocole d'étude du chimérisme et de la maladie résiduelle TCR/IgH après transplantation de cellules souches hématopoïétiques dans les hémopathies malignes de l'enfant* », regroupant les centres d'allogreffes pédiatriques de la SFGM/TC, un doublement des valeurs du pourcentage du chimérisme partiel receveur sur 2 prélèvements consécutifs réalisés à 2

semaines d'intervalle (par ex : 3 % puis 6 % 14 jours plus tard, en tenant compte du niveau de sensibilité de la méthode et des marqueurs utilisés) est décisionnel.

La DLI est généralement, mais non exclusivement, utilisée comme complément des allogreffes de CSH avec conditionnement non myéloablatif. L'efficacité de la DLI est diversement appréciée dans la littérature et dépend fortement du contexte pathologique et du stade de l'hémopathie maligne. Le degré et la durée de la rémission obtenus après DLI varient également en fonction de ces paramètres. Efficaces chez les patients atteints de leucémies myéloïdes chroniques (LMC) en rechute moléculaire ou cytogénétique post-allogreffe, les DLI le sont beaucoup moins dans les LAM et les MDS et pratiquement pas dans les LAL (*Shiobara et coll., 2000 ; Raiola et coll., 2003 ; Huff et coll., 2006*). On peut estimer que moins de 10 à 20 % des patients allogreffés atteints de LAL seront remis en rémission complète (*Collins et coll., 2000 ; Dazzi et coll., 2007*).

Le schéma thérapeutique varie également en fonction des équipes, le risque étant la survenue d'une aGVHD sévère chez les patients traités par injection de lymphocytes T du donneur après allogreffe de CSH. Cependant, un consensus se dégage actuellement autour de protocoles avec injections de doses croissantes de lymphocytes CD3 du donneur. Partant de faibles doses de cellules CD3 ( $10^6$  cellules/kg), les quantités peuvent être augmentées jusqu'à  $10^8$  cellules T/kg pour obtenir une rémission. Par rapport à l'injection d'emblée de fortes doses de lymphocytes T du donneur, cette approche semble aussi efficace sur la maladie résiduelle avec un risque moindre d'aGVHD secondaire (*Marks et coll., 2002 ; Raiola et coll., 2003 ; Dazzi et coll., 2007*) ;

Il est, bien entendu, évident que l'analyse du chimérisme représente un élément majeur du suivi de ces schémas thérapeutiques. Prescrits généralement chez des patients au départ en chimérisme partiel, les programmes d'injections de doses croissantes de lymphocytes T du donneur sont réalisés sous contrôle du chimérisme. Dans ces conditions, les marqueurs d'efficacité des DLI sont l'apparition ou la réapparition d'un chimérisme total donneur et/ou la rémission infracytologique (*Massenkeil et coll., 2003 ; Sedlaeck et coll., 2002 ; Bader et coll., Bone Marrow Transplant 2004 ; J Clin Oncol 2004*).

*Ainsi, une grande variabilité d'attitudes thérapeutiques existe en présence d'un chimérisme partiel. Il n'existe pas de consensus sur le seuil de chimérisme partiel à partir duquel une immunothérapie adoptive peut être proposée. Enfin, le rapport bénéfice/risque des schémas d'injections de lymphocytes T du donneur n'a pas été évalué. Un des objectifs de ce projet est de comparer de façon prospective, tant sur le plan médical qu'économique, l'efficacité*

***et les effets indésirables des différentes attitudes thérapeutiques actuellement proposées dans les centres d'allogreffes de CSH français.***

## **Justification du projet - Rationnel**

L'analyse du chimérisme constitue une innovation validée sur le plan clinique. Toutefois, compte tenu de la nature des pathologies allogreffées suivies par chimérisme, les cohortes rapportées dans la littérature rassemblent rarement un nombre élevé de patients et les études cas-témoins ou les études comparatives randomisées ou non sont difficiles voire impossibles à réaliser dans ce domaine. Néanmoins, la validation clinique, obtenue par une très abondante littérature sur le sujet ainsi que par l'utilisation quasi-généralisée, par les centres d'allogreffe de CSH, de l'analyse du chimérisme dans le suivi des patients allogreffés, relève du niveau 3 sur l'échelle de preuve d'efficacité clinique.

L'utilisation du chimérisme comme paramètre de suivi des allogreffes de CSH chez les patients atteints d'hémopathies malignes est largement diffusée en France depuis 4-5 ans. Etant donné la progression constante du nombre d'allogreffes de CSH liée à l'éligibilité croissante des patients vis-à-vis de ce type de traitement et du vieillissement de la population de notre pays, une augmentation significative du volume d'analyses de chimérisme est à prévoir. En même temps, il existe une grande variabilité, d'un centre d'allogreffe de CSH à l'autre, concernant les modalités de la prescription du chimérisme (chronologie, fréquence des analyses), le niveau de sensibilité optimal, la nature de la population cellulaire à analyser et les attitudes thérapeutiques qui en découlent. En particulier, les modalités thérapeutiques sont variables d'un centre à l'autre et n'ont pas été validées.

Cette situation justifie donc pleinement une étude médico-économique comparant, de façon prospective, un nombre important de patients suivis dans un nombre important de centres d'allogreffes, les pratiques de prescription du chimérisme et les attitudes thérapeutiques vis-à-vis de l'information apportée par l'analyse du chimérisme, notamment en fonction de la sensibilité de la méthode utilisée et de la pathologie du patient allogreffé. Malgré un impact médico-économique majeur, il est important de souligner qu'aucune étude prospective à large échelle de ce type n'a jamais été réalisée dans la littérature et en France.

Une rationalisation de l'utilisation du chimérisme, l'élaboration de recommandations concernant les bonnes pratiques cliniques et biologiques et une harmonisation de la tarification auront un impact direct sur la filière de soins en permettant : 1) d'améliorer le suivi des patients

allogreffés, 2) d'envisager des stratégies d'immunothérapies adoptives préemptives efficaces et adaptées, 3) d'optimiser le rapport coût/efficacité.

## Protocole

Il s'agit d'une étude prospective, ouverte, multicentrique et non interventionnelle d'une durée de deux ans.

Nous proposons une étude médico-économique sur modèle de type cycle Markovien de 1 mois selon les pratiques en cours, ceci après une hospitalisation moyenne de 20-25 jours qui détermine l'entrée dans le cycle (cf. schéma de suivi *infra*).

Nous utiliserons les informations obtenues par 3 techniques d'analyse du chimérisme (PCR GeneScan monoplex, PCR GeneScan multiplex et PCR quantitative), les deux premières ayant une sensibilité maximale de 1% et la troisième de 0,1%. Ces trois techniques peuvent de plus être utilisées avec ou sans tri cellulaire.

A partir de ces 3 techniques, nous recueillerons l'information sur les coûts et les événements médicaux possibles, ceci au moins tous les mois pendant au maximum 2 années (cf. schéma de suivi *infra*). Le dernier patient inclus sera donc suivi pendant 1 année, l'inclusion se faisant sur 1 an.

A partir d'un arbre décisionnel construit par grands groupes de pathologies allogreffés (LAM + myélodysplasies, LAL, lymphomes), par méthodes d'analyse du chimérisme sur populations cellulaires triées ou non triées, par type de conditionnement (myéloablatif ou non) et par traitements post-allogreffe proposés, nous pourrions modéliser les comportements et les résultats car les données nécessaires à cette modélisation nous seront fournies par l'étude de cohorte proposée sur la durée du projet (probabilités de transition modèle de Markov non homogène, censure sur les données et sur les coûts).

Nous utiliserons pour cette analyse le logiciel Tree-age et la méthode de Monte Carlo. Une analyse de sensibilité mono et multidimensionnelle sera réalisée sur les paramètres les plus soumis à variation.

*L'utilisation en pratique actuelle de l'analyse du chimérisme ne nous permet pas de réaliser d'emblée une étude randomisée médico-économique car aucun clinicien n'acceptera de ne pas utiliser l'information fournie par le suivi du chimérisme.*

## **Objectifs**

Les objectifs de ce programme s'inscrivent dans le cadre général de l'amélioration des pratiques concernant la prescription et l'utilisation du chimérisme comme outil d'aide à la décision pour le suivi des allogreffes de CSH en tenant compte du bénéfice apporté.

### **Objectif principal**

Modéliser la prescription et l'utilisation du chimérisme dans le suivi des allogreffes de CSH en mettant en place un arbre décisionnel comparatif incluant les différentes approches méthodologiques d'analyse du chimérisme, les paramètres cliniques (notamment le risque de maladie du greffon contre l'hôte et la rechute) et les paramètres de coût.

*Il est nécessaire d'intégrer le fait que le statut du chimérisme et les éventuelles approches thérapeutiques qui en découlent vont influencer la probabilité de survenue des complications post-allogreffe.*

### **Objectifs secondaires**

Afin d'obtenir les paramètres du modèle, nous suivrons les cohortes de patients inclus dans chaque centre selon le schéma de suivi décrit *infra*. Après une hospitalisation classique, le suivi sera réalisé au moins tous les mois avec un recueil d'information médical et économique.

Ce suivi permettra de réaliser les objectifs suivants :

- Caractériser les différentes pratiques de la prescription du chimérisme, notamment la fréquence et la chronologie des prélèvements, pour le suivi des allogreffes de CSH en France

- Analyser la valeur prédictive du chimérisme dans l'efficacité anti-tumorale et le risque de survenue d'effets indésirables d'allogreffe de CSH (non prise de greffe, aGVHD, rechute). Cette analyse sera multivariée, incluant notamment la sensibilité des méthodes, la fréquence du suivi et la chronologie des prélèvements, l'analyse du chimérisme sur les populations cellulaires triées ou non, la pathologie
  
- Analyser la concordance des résultats entre le chimérisme sur populations triées, en particulier les cellules de la lignée tumorale, et les résultats des techniques de référence (gold standard) pour la détection de la maladie résiduelle post-allogreffe. Cette analyse sera réalisée par groupe de pathologie en estimant chaque fois la sensibilité et la spécificité des résultats du chimérisme codés par présence ou absence de cellules d'origine receveur
  
- Rechercher un seuil « optimal » sur critères de minimisation de faux positifs et faux négatifs pondérés à partir d'une courbe ROC utilisant le gold standard précédent et la quantification du chimérisme exprimée en % de cellules d'origine receveur présent dans le prélèvement sanguin considéré
  
- Analyser les modifications des approches thérapeutiques en fonction de l'information apportée par l'étude du chimérisme réalisée selon les différentes méthodes, ces approches visant à minimiser les effets indésirables et maximiser l'effet anti-tumoral de l'allogreffe de CSH
  
- A partir des résultats de la modélisation obtenus dans l'objectif principal, proposer, après discussion avec les professionnels, des recommandations en fonction des paramètres discriminants (pathologies, niveau de sensibilité des techniques,...). En fonction de la capacité prédictive des méthodes d'analyse du chimérisme, leur diffusion à l'ensemble des professionnels pourra être proposée
  
- Après ces choix, définir les modalités des contrôles de qualité interne et externe permettant de s'assurer de la concordance des mesures
  
- Définir, grâce à l'analyse des coûts réalisés pour cette étude, une cotation des actes de chimérisme directement justifiée par le coût de production
  
- Mettre en place une structure chargée d'actualiser, sur la base des résultats de ce programme et des échanges entre professionnels concernés par l'allogreffe de CSH, les recommandations et



d'organiser, avec le concours d'Agence de santé (AFSSAPS, ABM, par exemple), un contrôle de qualité à l'échelle nationale. Cette structure pourrait dépendre de la SFGM/TC.

## **Patients**

### **Critères d'inclusion**

- Patients ayant une hémopathie maligne bénéficiant d'une allogreffe de CSH quelque soit la source cellulaire (moelle osseuse, cellules souches périphériques, unité(s) de sang placentaire) et suivis en chimérisme.
  - Donneurs et receveurs apparentés ou non apparentés
  - Patients adultes et pédiatriques
  - Conditionnements myéloablatifs et non myéloablatifs
  - Patients dont le suivi est possible
- Patients acceptant de participer à l'étude et ayant signé un consentement éclairé.
- Pour les patients mineurs : parents (ou tuteur légal) acceptant de participer à l'étude et ayant signé un consentement éclairé

### **Critères de non-inclusion**

- Patients allogreffés pour hémopathies non malignes
- Patients porteurs d'une hémopathie maligne ne bénéficiant pas d'une allogreffe de CSH
- Patients ayant une hémopathie maligne bénéficiant d'une allogreffe de CSH et non suivis en chimérisme
- Patients n'acceptant pas de participer à l'étude ou refusant le consentement éclairé
- Patient refusant le protocole de l'étude
- Pour les patients mineurs : parents (ou tuteur légal) n'acceptant pas de participer à l'étude ou refusant le consentement éclairé
- Pour les patients mineurs : parents (ou tuteur légal) refusant le protocole de l'étude

## Nombre de patients

Le nombre total de patients allogreffés prévu dans ce projet est de **600** pour une période d'inclusion d'un an. Ce nombre tient compte des paramètres suivants :

- l'activité d'allogreffe de CSH en France en 2006 qui était de 1192 patients allogreffés tout âge et toute pathologie confondus, dont **1074** pour hémopathies malignes (Source SFGM/TC)
- le nombre de patients allogreffés en 2006 dans les 16 centres français prévus pour participer à ce programme (cf. infra) qui était de **758**, tout âge et toute pathologie confondus (Source SFGM/TC), correspondant à **64%** de l'activité totale d'allogreffe de CSH nationale
- la nature de la pathologie : **90%** d'hémopathies malignes, 10% d'hémopathies non malignes (exclues de ce projet), ce qui correspond à un nombre estimé de patients allogreffés pour hémopathies malignes dans les 16 centres participants de **682**
- on estime que l'activité d'allogreffes de CSH pour hémopathies malignes pendant la durée d'inclusion d'un an de ce projet sera au **moins similaire** à celle de 2006. Cette estimation est **par défaut** compte tenu de la croissance régulière de cette activité en France
- enfin, on considère qu'il y aura **10 à 12%** de non inclusion pour des raisons diverses.

## Stratification des patients

Les patients seront regroupés en fonction des critères suivants : l'âge, la nature de l'hémopathie maligne, l'origine du donneur, le conditionnement pré-allogreffe, la source de CSH.

### *Age*

Etant donnée la répartition enfants/adultes, on estime qu'environ 120 patients pédiatriques (< 18 ans) et 480 adultes seront inclus dans ce programme. Il n'y a pas lieu, pour l'innovation considérée, d'envisager des stratifications par tranche d'âge supplémentaires.

### *Type d'hémopathie maligne*

Les trois principales hémopathies malignes allogreffées sont les leucémies aiguës (~57%), les lymphomes (~22%) et les syndromes myélodysplasiques (~12%). Parmi les leucémies aiguës, environ 63% sont des LAM et 37% des LAL. Compte tenu de ces données les prévisions du nombre de patients par pathologie sont les suivantes :

| <b>Pathologie</b>                                  | <b>Nb patients prévus</b> |
|--|---------------------------|
| LAM  | 215                       |
| <i>Hémopathies myéloïdes (LAM+myélodysplasies)</i> | 287                       |
| LAL  | 127                       |
| Lymphomes  | 132                       |
| Autres   | 54                        |

#### *Autres critères*

Concernant le conditionnement pré-allogreffe et la source de CSH, on peut s'attendre à un suivi plus précis du chimérisme chez les patients allogreffés avec conditionnement non myéloablatif et/ou avec une ou deux unités de sang placentaire. Mais il n'existe pas de données plus précises concernant les caractéristiques de ce suivi, qui varient grandement d'un centre d'allogreffe à l'autre. On peut cependant estimer que 60% des patients inclus dans cette étude bénéficieront d'un conditionnement non myéloablatif et 40% d'un conditionnement myéloablatif. Ces paramètres seront, bien sûr, pris en considération dans ce programme.

Les caractéristiques des couples donneurs/receveurs en termes d'origine intrafamiliale ou non apparentée, de sexe et de degré d'appariement HLA n'ont pas *a priori* d'impact sur le suivi du chimérisme. Néanmoins ces données seront renseignées et pourront être prises en compte.

### **Centres d'allogreffes de CSH participant au programme**

16 centres français sur 37 réalisant les allogreffes de CSH (43%) sont prévus dans ce programme. La liste et le nombre de patients atteints d'hémopathies malignes allogreffés par centre, estimé à partir de l'activité d'allogreffe en 2006 (*Source SFGM/TC*), sont indiqués dans le tableau ci-dessous :

| <b>Centres d'allogreffes de CSH</b> | <b>Nb patients prévus</b> |
|-------------------------------------|---------------------------|
| Montpellier                         | 52                        |
| Marseille-Paoli-Calmettes           | 60                        |
| Nantes                              | 61                        |
| Paris-Necker                        | 33                        |

|  |            |
|--|------------|
| Lyon   | 35         |
| Bordeaux   | 64         |
| Nancy  | 36         |
| Paris-Saint-Louis                                    | 97         |
| Besançon   | 41         |
| Strasbourg   | 46         |
| Clermont-Ferrand                                     | 23         |
| Grenoble   | 37         |
| Rouen  | 16         |
| Lille  | 42         |
| Nice   | 17         |
| Angers   | 22         |
| <b>Total</b> (considérant 10 à 12% de non inclusion) | <b>600</b> |

L'activité de ces 16 centres correspond à 64% de l'activité nationale d'allogreffe de CSH.

## Méthodes d'analyse du chimérisme – Aspects pratiques

Trois méthodes d'analyse du chimérisme sont principalement utilisées par les centres français : les méthodes de PCR « GeneScan » soit en format « monoplex » soit en format « multiplex » et la méthode de PCR quantitative (ou RT-PCR) moins diffusée. Ceci permet d'envisager une stratification simple des patients suivis par chimérisme.

### Analyse du chimérisme par PCR « GeneScan » monoplex

L'étude du chimérisme consiste à distinguer, chez le patient après allogreffe, la population de cellules hématopoïétiques issues du donneur (greffon) de celles issues du receveur avant greffe.

Les marqueurs utilisés sont les microsatellites (Variable Number Tandem Repeats, VNTR ou Short Tandem Repeats, STR) du fait de leur simplicité d'étude après amplification de l'ADN génomique *in vitro* par PCR et de leur haut degré de polymorphisme interindividuel permettant leur utilisation dans près de 100% de combinaisons donneurs-receveurs même intrafamiliales. Ils permettent d'atteindre une sensibilité de détection de 1 à 5% en fonction des combinaisons d'allèles du couple donneur-receveur.

A partir d'échantillons sanguins devant parvenir au laboratoire avant la greffe, le ou les marqueurs génétiques pour le(s)quel(s) il existe une différence entre le donneur et le receveur sont recherchés. Pour ceci, on détermine le profil allélique du donneur et du receveur avant l'allogreffe pour un panel d'une dizaine de marqueurs polymorphes. Le marqueur informatif, c'est à dire celui pour lequel au moins 1 allèle du receveur est différent de celui du donneur sera ensuite utilisé pour rechercher la présence de cellules du receveur dans le cadre du suivi post-allogreffe

Le choix définitif du marqueur informatif pour un couple donneur-receveur donné est réalisé en fonction des critères suivants : une différence de polymorphisme entre le donneur et le receveur, le type de marqueur (préférence généralement donnée aux STRs), la configuration du polymorphisme entre donneur et receveur, l'adéquation entre les quantités connues et variables d'ADN du receveur diluées dans celles du donneur et les quantifications obtenues avec le(s) marqueur(s).

Après l'allogreffe, à partir des échantillons prélevés chez le patient, l'ADN génomique est amplifié par PCR en utilisant les amorces oligonucléotidiques fluorescentes spécifiques du marqueur choisi. Après migration électrophorétique des produits de PCR fluorescents sur un séquenceur automatique d'ADN, les allèles sont caractérisés en utilisant le programme « GeneScan » qui permet également de déterminer l'intensité de fluorescence corrélée avec la quantité de produit PCR correspondant à chaque allèle.

En fonction du statut du chimérisme, l'allèle ou les allèles du donneur (chimérisme total donneur) ou du receveur avant greffe (absence de chimère) est ou sont amplifiés. Dans le cas d'un chimérisme partiel, les allèles spécifiques du donneur et du receveur avant greffe sont co-amplifiés. Dans ces conditions de PCR compétitive, la comparaison des intensités de fluorescence obtenues pour l'allèle spécifique du donneur et pour celui du receveur permet d'évaluer la quantité relative de cellules du receveur en se référant à une gamme de dilutions d'ADN du receveur dans celui du donneur. On peut ainsi évaluer le chimérisme de façon quantitative. Pour améliorer la fiabilité de l'évaluation cinétique du chimérisme chez le patient, chaque prélèvement post-greffe est généralement analysé avec le prélèvement précédent. Enfin, les résultats sont rendus en fonction de la sensibilité de la méthode qui est variable selon le(les) marqueur(s) génétiques(s) utilisé(s) pour le couple donneur-receveur considéré.

Les prélèvements sont acheminés au laboratoire à température ambiante habituellement dans la journée. 5 à 7 ml de sang sont nécessaires pour chaque point d'analyse. Le sang doit être

prélevé sur EDTA ou ACD (jamais sur Héparine). Une numération des populations cellulaires, pour lesquelles le chimérisme est analysé, est réalisée le même jour sur le prélèvement sanguin.

Les résultats sont rendus comme suit :

- soit aucune cellule du receveur n'a pu être détectée dans le prélèvement, compte tenu de la sensibilité de la méthode = **chimère totale**,
- soit un pourcentage de cellules du receveur supérieur au seuil de sensibilité de la méthode pour le marqueur génétique considéré est détecté dans le prélèvement = **chimère partielle** (valeur exprimée en pourcentage de cellules du receveur),
- soit aucune cellule du donneur n'a pu être détectée dans le prélèvement, compte tenu de la sensibilité de la méthode = **absence de chimère**.

En pratique pour une raison d'harmonisation des résultats entre les patients, on définit une chimère totale pour un résultat au moins supérieur ou égal à 95 % de cellules d'origine donneur et une chimère partielle pour un résultat inférieur à 95 % de cellules d'origine donneur

Il est important de souligner que, plus qu'un résultat unique, c'est la cinétique des valeurs du chimérisme sur des prélèvements rapprochés (deux ou plus) qui est informative.

### **Analyse du chimérisme par PCR « GeneScan » multiplex**

Peu de différences existent avec la méthode précédente, sinon qu'au lieu d'un marqueur unique spécifique du couple donneur-receveur considéré, c'est une quinzaine de marqueurs, contenue dans un kit commercial, qui est systématiquement utilisée à chaque point d'étude du chimérisme.

Dans ces conditions, une courbe étalon de dilutions de quantités connues et variables d'ADN du receveur dans celui du donneur est difficile, voire impossible, à réaliser rendant la quantification précise du chimérisme moins aisée à obtenir que pour le format monoplex. Néanmoins, pour un patient donné, chaque prélèvement post-greffe est généralement analysé avec le prélèvement précédent.

## Analyse du chimérisme par RT-PCR (PCR quantitative)

L'analyse du chimérisme par RT-PCR est réalisée en France à partir de la méthode décrite par Alizadeh et coll. (*Alizadeh et coll., 2002*).

Cette méthode utilise les polymorphismes bi-alléliques d'insertion/délétion (Short insertion/deletion polymorphism, SIDP) ou de substitution (Single Nucleotide Polymorphism, SNP). Ces polymorphismes sont moins informatifs que les STR (70 à 90% de la population) mais présentent l'avantage de se prêter à une amplification allele-spécifique évaluable quantitativement par PCR en temps réel utilisant la technologie des sondes Taqman.

Onze marqueurs SIDP ou SNP, correspondant à 19 allèles et situés sur neuf chromosomes différents, ont été choisis en fonction de leur taux d'hétérozygotie dans la population. En outre un gène de référence monomorphe est utilisé comme calibrateur de la quantité d'ADN présente dans l'échantillon étudié. Ainsi des couples d'amorces et des sondes TaqMan spécifiques de ces polymorphismes et du gène contrôle sont utilisés pour caractériser le polymorphisme des 11 marqueurs chez le donneur et le receveur. Le choix se porte sur des marqueurs pour lesquels il existe un polymorphisme exclusivement spécifique du donneur (présent chez le donneur et absent chez le receveur) et du receveur (présent chez le receveur et absent chez le donneur).

Par la suite, les points de suivis sont analysés en utilisant ce jeu de marqueurs spécifiques du couple donneur-receveur considéré ainsi que le gène de référence. Pendant la phase d'extension de la PCR, la sonde TaqMan, une fois hybridée spécifiquement à sa cible, est clivée et émet un signal fluorescent qui est analysé par les logiciels de l'appareil de PCR en temps réel. Le signal émis devient détectable après un nombre donné de cycles, nombre très étroitement et linéairement corrélé à la quantité du marqueur (SIDP, SNP) présent dans l'ADN de départ.

L'analyse quantitative est réalisée à l'aide du logiciel d'Applied Biosystems et est basée sur la méthode du  $\Delta(\Delta Ct)$ , Ct étant le cycle seuil. La quantification d'un allèle spécifique du donneur (D) ou du receveur (R) dans un échantillon de suivi post-greffe est égal à :  $2^{-(\Delta Ct_{\text{post}} - \Delta Ct_{\text{pré}})}$ , où  $\Delta Ct_{\text{post}} = \Delta Ct$  de l'allèle spécifique de D ou R dans l'ADN post-greffe et  $\Delta Ct_{\text{pré}} = \Delta Ct$  de l'allèle spécifique de D ou R dans l'ADN pré-greffe. La valeur 2 utilisée dans la formule correspond à une efficacité théorique de PCR de 100 %. La sensibilité de détection des allèles de la population minoritaire est de l'ordre de 0,1%. Chaque analyse de suivi comporte, en plus de l'échantillon du jour, celui du point de suivi précédent afin d'obtenir un contrôle de qualité et de calibration.

La quantité minimale d'ADN nécessaire est de 20µg. Les conditions d'extraction doivent être optimales afin que la qualité et la quantité d'ADN soient adaptées à la quantification par PCR en temps réel. Il est, par exemple, fortement recommandé d'utiliser des kits d'extraction d'ADN de type Qiagen®.

Les résultats sont généralement exprimés en pourcentage de cellules du receveur, compte tenu de la sensibilité de la méthode. La définition fonctionnelle, en particulier la notion de seuil à partir duquel on parle de chimérisme total et de chimérisme partiel est plus complexe à définir et varie en fonction des équipes.

### **Analyse du chimérisme sur populations cellulaires triées**

L'analyse du chimérisme peut être habituellement réalisée sur les populations cellulaires suivantes obtenues à partir du sang périphérique : lymphocytes T CD3, CD4, CD8, lymphocytes B, cellules NK, cellules de la lignée myélo-monocytaire.

L'enrichissement cellulaire est obtenu après un tri sur billes magnétiques couplées avec les anticorps monoclonaux suivants :

- lymphocytes T CD3 : billes magnétiques couplées à l'anticorps monoclonal anti-CD3 ou mélange de billes magnétiques couplées aux anticorps monoclonaux anti-CD4 et anti-CD8
- lymphocytes T CD4 ou CD8 : billes magnétiques couplées à l'anticorps monoclonal anti-CD4 ou anti-CD8,
- lymphocytes B : billes magnétiques couplées à l'anticorps monoclonal anti-CD19,
- cellules NK : billes magnétiques couplées à l'anticorps monoclonal anti-CD3 (tri négatif) puis anti-CD56 (tri positif), la population à analyser étant CD3-, CD56+,
- cellules myélo-monocytaires : mélange de billes magnétiques couplées aux anticorps monoclonaux anti-CD14 et anti-CD15.

L'enrichissement des différentes populations cellulaires est systématiquement contrôlé par cytométrie en flux.



## **Protocole d'étude**

### **Saisie des données**

Toutes les données indiquées ci-après seront saisies en ligne à partir d'un cahier d'observation électronique (eCRF) protégé et anonyme. Une fiche sera créée pour chaque patient inclus qui sera identifié par un numéro d'anonymat identique pour tout son suivi. L'eCRF comportera l'ensemble des informations cliniques, biologiques et économiques à renseigner. L'eCRF sera mis en place et géré à partir de la plateforme de l'équipe du Département de Biostatistiques, Epidémiologie clinique, Santé Publique et Information Médicale du CHU de Nîmes dirigée par le Pr J.P. Daurès.

### **Suivi des patients**

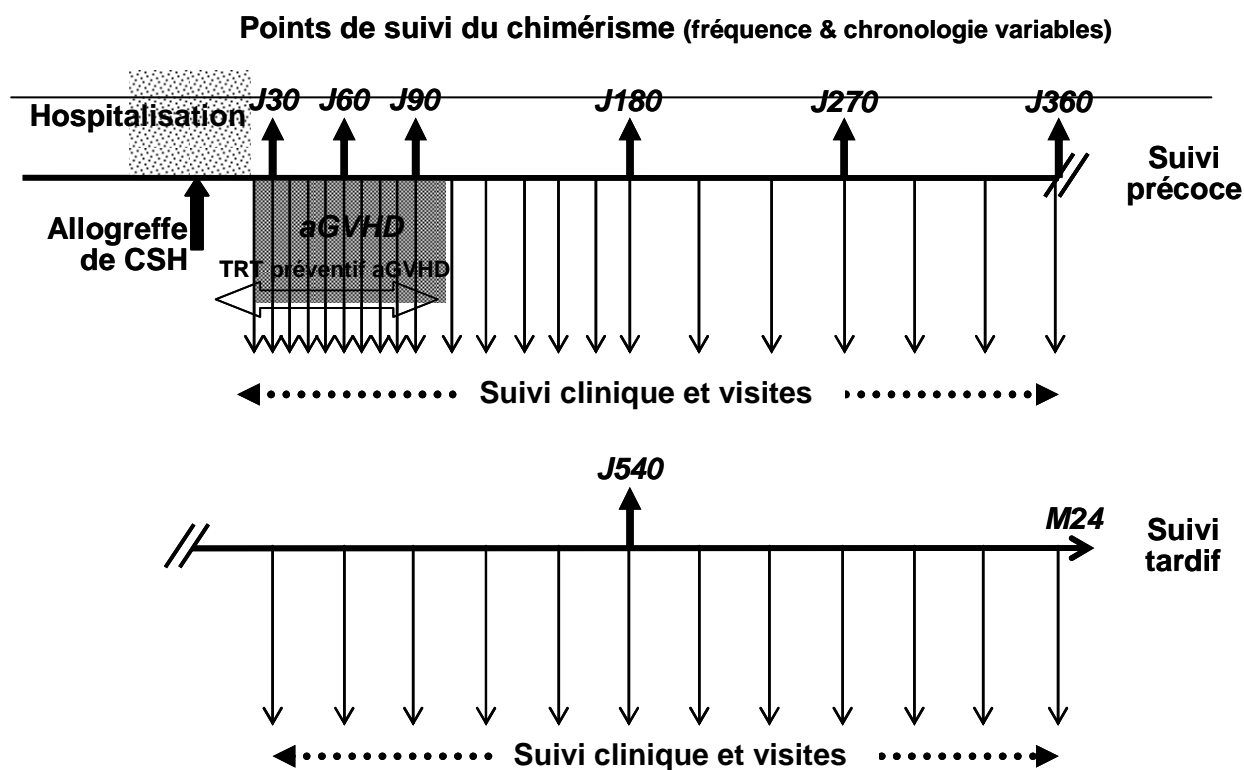
La durée de ce programme est de 2 ans. L'ensemble des 600 patients prévus sera inclus la première année et suivi sur une période maximale de deux ans. Ceci correspond au suivi classique des patients allogreffés par chimérisme (cf. schéma de suivi ci-dessous).

A l'inclusion, les informations suivantes concernant le patient seront notamment saisies du l'eCRF :

- l'âge
- la pathologie
- le statut de la maladie au moment de l'allogreffe
- l'origine du donneur : allogreffe intrafamiliale ou non apparentée
- le sexe donneur/receveur
- l'appariement HLA donneur-receveur
- la compatibilité ABO donneur/receveur
- le statut CMV donneur/receveur
- source de CSH
- le type de conditionnement
- les caractéristiques du traitement prophylactique de l'aGVHD

Tous les patients inclus dans le programme bénéficieront, en fonction des habitudes de chaque centre, d'une analyse suivie du chimérisme par au moins une des trois méthodes, vues ci-dessus, sur population cellulaire globale du sang périphérique et/ou sur populations cellulaires

triées. L'ensemble des centres participants sont associés à un laboratoire à proximité pratiquant ce type d'analyses. Aucun surcoût particulier n'est à prévoir pour cette partie du programme dans la mesure où les analyses de chimérisme font partie du suivi normal des patients allogreffés dans chaque centre participant.



**Schéma de suivi des patients par chimérisme.** Les jours (J) de prélèvements sanguins des patients post-allogreffe pour analyse du chimérisme sont variables d'un centre à l'autre. Sont indiqués les jours de prélèvement qui ont été le plus souvent retrouvés lors de l'enquête préliminaire réalisée auprès d'une dizaine de centres. Ces jours de prélèvement sanguin correspondent également à ceux choisis pour l'analyse du chimérisme par méthode de haute sensibilité sur le sous-groupe de 300 patients (cf. *infra*). Sont indiquées également la **durée d'hospitalisation** encadrant l'allogreffe de CSH et la **période de survenue de l'aGVHD** (classiquement dans les 100 jours après l'allogreffe de CSH) couverte par un **traitement prophylactique** systématiquement réalisé. Le **suivi clinico-biologique des patients** en hospitalisation de jour puis en consultation est indiqué par des flèches verticales. Ce suivi est très rapproché (environ une fois par semaine) pendant les trois premiers mois après l'allogreffe puis devient plus espacé pour être d'environ une fois par mois jusqu'à deux ans post-allogreffe. **C'est au cours de ces visites de suivi que sont réalisés les prélèvements pour analyse du chimérisme.**

A chaque visite, les informations suivantes seront saisies sur l'eCRF :

- données cliniques et biologiques concernant la non prise de greffe (nombres des polynucléaires neutrophiles, des plaquettes), les infections, la GVHD et les rechutes (maladie résiduelle), le décès et ses causes
- le statut du chimérisme

- les éventuelles modifications de l'immunosuppression post-allogreffe (baisse, arrêt ou modification de l'immunosuppression)
- l'existence d'une immunothérapie adoptive (DLI) et son caractère préemptif ou non (la dose des lymphocytes infusés sera précisée).

### **Analyse du chimérisme par méthode de haute sensibilité sur un sous-groupe de patients**

#### *Définition et étude de ce sous-groupe de patients*

Un sous-groupe de 300 patients habituellement suivis avec des techniques peu sensibles dans leur centre respectif sera étudié parallèlement, **sans conséquence décisionnelle**, avec des techniques d'analyse du chimérisme de haute sensibilité sur populations cellulaires triées. Il est envisagé, dans le cadre de ce programme et compte tenu des contraintes budgétaires, de réaliser ces analyses pour 6 points de suivi sur deux populations cellulaires triées : lymphocytes T CD3 et cellules appartenant à la même lignée cellulaire que la population tumorale.

Trois laboratoires effectueront ces analyses de façon centralisée (cf. liste ci-dessous). Pour la moitié de l'effectif global des patients à inclure, chaque centre réalisera une série de prélèvements sanguins d'environ 25 ml dont une partie du volume total (18 à 20 ml) sera adressée à température ambiante et en 24 heures à un des trois laboratoires, l'autre partie du prélèvement servant pour l'analyse du chimérisme avec la méthode habituellement utilisée dans le centre correspondant. Les jours de prélèvements, devant correspondre au suivi habituel des patients dans leur centre respectif, seront les suivants : J30, J60, J90, J180, J360 et J540 pour certains patients inclus précocement dans le programme. Seuls les patients suivis par chimérisme avec une des deux méthodes « GeneScan » sur population cellulaire non triée seront inclus dans cette partie du programme. Les frais d'envoi seront pris en charge par le budget du programme.

Les résultats de ces analyses de chimérisme réalisées en parallèle seront adressés au centre coordonnateur qui les centralisera pour analyse en fin de programme.

Les trois laboratoires en charge de cette partie du programme ainsi que la répartition des centres cliniques sont donnés dans le tableau ci-dessous :

| <i><b>Laboratoire</b></i>                 | <i><b>Répartition des centres cliniques</b></i>                        |
|---|--|
| <b>Lyon</b><br>(équipe V. Dubois)         | Angers<br>Besançon<br>Clermont-Ferrand<br>Lyon<br>Nantes<br>Strasbourg |
| <b>Montpellier</b><br>(équipe J.F Eliaou) | Bordeaux<br>Grenoble<br>Marseille-IPC<br>Montpellier<br>Nice           |
| <b>Paris</b><br>(équipe J.M Cayuela)      | Lille<br>Nancy<br>Paris-Necker<br>Paris-Saint-Louis<br>Rouen           |

Les résultats obtenus pour ce sous-groupe de patients permettront d'évaluer la valeur prédictive du chimérisme de haute sensibilité pour la survenue de l'aGVHD et l'évaluation de la maladie résiduelle.

*Calcul du nombre de sujets nécessaires*

Le nombre de sujets nécessaires pour ce sous-groupe est estimé à partir d'une enquête préliminaire auprès des centres SFGM/TC et d'après les informations détaillées ci-dessus et notamment les données de la littérature

Le calcul de ce nombre est basé sur l'estimation de la courbe ROC du chimérisme partiel par rapport à la survenue de la rechute. On se place à 1 an ½ de suivi et pour une pathologie donnée.

On considère que l'AUC (aire sous la courbe ROC) du chimérisme partiel par rapport à la récurrence, à un temps fixé, doit être de l'ordre 90 % pour que la question du remplacement de l'un par rapport à l'autre ait un sens.

Avec un risque  $\alpha$  de 5% bilatéral et des taux de rechute variant entre 20% et 40% à 1 an ½ de suivi (cf. chapitre « Etat des lieux », paragraphe « Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques »), on obtient le nombre total de sujets avec chimérisme partiel suivant (avec un écart de 10% sur l'AUC) :

|     | Taux de rechute |     |     |
|-----|-----------------|-----|-----|
|     | 20%             | 30% | 40% |
| N = | 86              | 59  | 46  |

Donc, le nombre de sujets avec chimérisme partiel varie entre 46 et 86 avec une valeur intermédiaire à 59.

Si on admet qu'environ 80% des patients seront en chimérisme total donneur, ce nombre doit représenter de l'ordre de 20% des patients, soit un nombre total de sujets à étudier avec méthodes de haute sensibilité pour déterminer le statut de récurrence d'au moins 295. Ce nombre correspond, s'il y a 10% au plus de données ininterprétables, à 328 sujets ce qui est le nombre proposé entre ceux pour qui le chimérisme sera analysé avec méthodes de haute sensibilité dans un des trois laboratoires spécialisés et ceux pour lesquels ces méthodes sont utilisées en routine.

### **Evaluation du chimérisme**

La valeur du chimérisme comme outil d'aide à la décision pour le suivi des patients allogreffés sera évaluée par les critères suivants :

#### *Critères d'évaluation du chimérisme*

- technique utilisée et sensibilité
- analyse sur population cellulaire globale et/ou sur populations cellulaires triées (type cellulaire)
- statut du chimérisme (total donneur, partiel, absence de chimère)
- chronologie des prélèvements pour chimérisme (exprimée en jour post-allogreffe) en l'absence d'incident post-allogreffe

- chronologie des prélèvements pour chimérisme (exprimée en jour post-allogreffe) en cas de persistance, de réapparition d'un chimérisme partiel et/ou d'incidents post-allogreffe (essentiellement échec de l'allogreffe, rechute infra-cytologique, cytologique ou clinique)
- délai de rendu des résultats de chimérisme
- existence d'un protocole particulier de suivi du chimérisme en fonction de la pathologie, de la source de CSH, du type de conditionnement pré-greffe ou de l'âge des patients allogreffés.

#### *Critères pronostiques*

- non prise de greffe. En dehors d'un contexte infectieux ou de aGVHD particulier, cet état sera affirmé essentiellement sur l'absence d'une récupération des polynucléaires neutrophiles ( $> 500/\mu\text{L}$ ) à 2 mois post-allogreffe
- survenue d'une GVHD aigue. Cet état sera affirmé selon les critères habituels de la classification de Glucksberg et/ou ceux de l'IBMTR (cf. annexe)
- survenue d'une rechute post-allogreffe de l'hémopathie. Cet état sera affirmé selon les critères habituels propres à chaque hémopathie
- décès dont la cause sera indiquée
- survie globale
- survie sans rechute (quelle qu'en soit la cause)

#### *Critères d'évaluation du chimérisme comme outil substitutif de l'évaluation de la maladie résiduelle*

Dans la mesure du possible, les patients inclus dans ce programme bénéficient d'une évaluation systématique de la maladie résiduelle par les méthodes conventionnelles (gold standard). La maladie résiduelle des patients atteints de LAL est évaluée, généralement dans le cadre de protocoles nationaux (FRALLE, GRAAL), par la détermination des transcrits de fusion et/ou l'étude du réarrangement des gènes des immunoglobulines et du récepteur des lymphocytes T et/ou l'immunophénotypage en cytométrie en flux. Les patients atteints de LAM ou de syndromes myélodysplasiques ont une évaluation de la maladie résiduelle, habituellement dans le cadre de protocoles nationaux (GOELAMS, ALFA) par la détermination des transcrits de fusion, possible chez 60-70% des patients, et/ou l'immunophénotypage en cytométrie en flux.

*A priori*, seuls les résultats du chimérisme obtenus avec une méthode de haute sensibilité (RT-PCR) sur populations triées seront comparés avec ces méthodes conventionnelles de détermination de la maladie résiduelle. Afin d'établir une éventuelle corrélation, l'analyse du

chimérisme et la détermination de la maladie résiduelle par les méthodes conventionnelles devront être réalisées à partir du même échantillon sanguin ou d'échantillons prélevés au maximum à une semaine d'intervalle.

#### *Critères d'impacts clinique et thérapeutique*

- valeur du chimérisme partiel prise en compte par le médecin greffeur pour débiter un traitement : diminution ou arrêt de l'immunosuppression post-allogreffe, immunothérapie adoptive préemptive ou non, seconde allogreffe de CSH
- paramètres d'évolutivité du chimérisme pris en compte par le médecin greffeur pour débiter un traitement : diminution ou arrêt de l'immunosuppression post-allogreffe, immunothérapie adoptive préemptive ou non, seconde allogreffe de CSH.

### **Analyse statistique**

Une analyse statistique classique sera réalisée par comparaison entre différentes branches de l'arbre décisionnel, les « troncs » correspondant aux différents groupes de pathologies (LAM + myélodysplasies, LAL, lymphomes), aux méthodes d'analyse du chimérisme sur populations cellulaires triées ou non triées, au type de conditionnement (myéloablatif ou non) et aux traitements post-allogreffe proposés, dont l'abstention. Pour la valeur prédictive du chimérisme dans la survenue d'évènements indésirables tels que : non prise de greffe, aGVHD et rechutes, nous utiliserons deux méthodes avec régression logistique multivariée dans laquelle nous introduirons les valeurs des mesures des variables qui seront liées statistiquement à ces évènements indésirables, mais aussi une analyse par courbe ROC avec co-variables.

De manière plus originale, nous analyserons le caractère prédictif de l'analyse du chimérisme, réalisée avec des méthodes de haute sensibilité, par rapport à la rechute analysée avec des méthodes conventionnelles de détermination de la maladie résiduelle, ceci en tenant compte de 2 facteurs : le traitement ou le non-traitement et la répétition des analyses de chimérisme. Concernant les analyses de chimérisme, la question que nous essaierons de résoudre est de savoir à quel moment et avec quelle fréquence elles doivent être réalisées pour être le plus statistiquement prédictives de la rechute. Dans ce cas, la branche privilégiée sera celle sans traitement (*cf. thèse Y. FOUCHER. Montpellier, septembre 2007*).

Pour la détermination du seuil de chimérisme utile cliniquement (notion de point de chimérisme discriminant) la variable à expliquer est la survenue d'un événement important (non prise d'allogreffe, rechute, aGVHD). Le chimérisme total permettra d'estimer la sensibilité et la spécificité, l'événement étudié étant l'aGVHD ; le chimérisme partiel permettra de construire une courbe ROC, l'événement étudié étant la non prise d'allogreffe ou la rechute. Nous déterminerons dans le 1<sup>o</sup> cas une prédiction temporelle et dans le 2<sup>o</sup> cas, nous minimiserons, avec les pondérations définies par les cliniciens, le poids des erreurs des mesures (faux > 0 et faux < 0).

### **Evaluation des coûts – analyse économique**

Elle sera réalisée à partir de l'arbre Markovien décrit précédemment. Le cycle est de 1 mois. Pour chaque cycle, nous recueillerons l'ensemble des coûts directs. Ces coûts directs seront ceux de la Sécurité Sociale (SS) et c'est sous ce point de vue que nous traiterons les coûts.

Pour les hospitalisations et les hospitalisations de jour, le coût sera celui du tarif de l'échelle nationale des coûts, secteur public. Pour les consultations, le coût sera celui de la SS et celui des actes prescrits.

Nous attacherons une attention particulière aux coûts des méthodes biologiques évaluées. Pour ces méthodes nous recueillerons les coûts exacts en quantifiant le coût du matériel, le temps d'amortissement, le coût des kits, des réactifs et des consommables, le temps passé par le(s) technicien(s), le temps passé par le biologiste pour l'interprétation et le coût du fonctionnement de la structure affectée à ces mesures. Ceci sera fait par méthode d'analyse du chimérisme et par centre.

Donc pour un groupe de pathologies, l'arbre de décision débutera par les méthodes d'analyse du chimérisme sur populations cellulaires triées ou non triées et ensuite par les traitements proposés (dont l'abstention) avec un recueil de coûts directs sur la durée du cycle. A partir de ces informations, le modèle nous permettra d'estimer les coûts cumulés sur la durée maximale de 2 années. Nous tiendrons compte de la censure informative en utilisant la méthode IPCW ainsi que des covariables grâce à une régression de Willan, ceci par strate de pathologie x âge x méthode.



Cette information nous permettra, par pathologie et stade de la maladie au moment de la greffe, d'estimer un coût efficacité marginal et le bénéfice net incrémentiel. La mesure du gain sera l'espérance du temps de survie globale, notamment pour le groupe des patients atteints de LAM/syndrome myélodysplasique, et l'espérance du temps de survie sans rechute pour les 3 groupes de pathologies (LAM/syndrome myélodysplasique, LAL, lymphomes).

Avec le BNI (bénéfice net incrémentiel) on déterminera l'IC qui rend le  $\lambda$  utile et ce  $\lambda$  sera comparé à la valeur de la propension à payer classiquement acceptée dans nos sociétés.

Le fait que l'analyse du chimérisme puisse constituer qu'une partie « mineure » de l'ensemble du coût étudié n'est pas pénalisant puisque la différence de coût entre les méthodes d'analyse du chimérisme peut être quand même non négligeable.

## **Organisation générale, coordination et gestion du programme**

### **Centre coordonnateur**

Dans ce programme, le CHRU de Montpellier sera le promoteur dont le rôle est défini par l'article L1121-1 du Code de Santé Publique.

Le Pr. J-F ELIAOU, CHRU de Montpellier, sera l'investigateur principal du programme, assisté du Dr. M. MOHTY, CHU de Nantes (en tant qu'investigateur principal associé). Le centre coordonnateur disposera, en outre, d'un ARC coordonnateur (50% sur 2 ans prévu dans le budget du STIC) ainsi que de l'appui de la Direction de la Recherche Clinique et Innovation du CHRU de Montpellier.

L'investigateur coordonnateur sera responsable de l'organisation, de la coordination générale du programme, de la gestion des aspects cliniques, biologiques et économiques du projet ainsi que de ces aspects éthiques et réglementaires.

L'ARC coordonnateur sera en charge des aspects suivants:

- Data Management : saisie à distance ou sur site, validation des données et queries automatisées
- Coordination de tous les centres associés
- Recueil, validation, saisie des données du centre de Montpellier pour le compte du Promoteur.

L'ensemble de ces tâches sera réalisé en étroite collaboration avec les équipes des Prs. J-P DAURES et G.DURU.

### **Centres investigateurs cliniques associés**

Il est prévu que chacun des 16 centres d'allogreffes de CSH dispose de temps de technicien de recherche clinique (TRC) sur les deux années du programme, prévus dans le budget, afin de pouvoir saisir les données cliniques et biologiques des patients inclus.

## **Comité scientifique de pilotage**

Il sera constitué de l'investigateur coordonnateur principal (Pr. J-F ELIAOU), de l'investigateur principal associé (Dr. M MOHTY), du méthodologiste (Pr. J-P DAURES), de l'économiste (Pr. G DURU) ainsi que des membres suivants : Pr. D BLAISE (IPC, Marseille), Pr. A BUZYN (CHU Necker, Paris), Pr. M MICHALLET (Hospices Civils, Lyon) et Pr. N MILPIED (CHU Bordeaux).

## **Aspects éthiques et réglementaires**

Le coordonnateur principal s'assurera que ce programme est mené conformément aux principes éthiques de la déclaration d'Helsinki et en conformité avec les bonnes pratiques cliniques et biologiques.

### **Soumission du protocole au CPP**

Cette étude est une recherche non interventionnelle ne nécessitant pas le passage devant un Comité de Protection de Personnes.

Il est important de souligner que, de toute façon, l'ensemble des prélèvements pour analyses du chimérisme sera réalisé au cours du suivi habituel et normal des patients allogreffés. Aucun prélèvement sanguin supplémentaire pour les besoins de l'étude n'est prévu dans le programme, seule une quantité de sang supplémentaire sera prélevée pour les 300 patients pour lesquels une analyse avec une méthode haute sensibilité sera réalisée.

### **Déclaration à la CNIL des bases de données**

Les eCRF de l'ensemble des patients inclus ainsi que les bases de données constituées pour l'analyse et l'archivage des informations cliniques et biologiques seront soumis à examen auprès de la Direction de la Recherche Clinique du CHRU de Montpellier pour déclaration au Comité Consultatif sur le Traitement de l'Information en matière de Recherche dans le domaine de la Santé (CCTIRS) puis à La Commission Nationale de l'Informatique et des Libertés (CNIL).

Quoiqu'il en soit ces informations seront anonymes et protégées. Elles seront regroupées au sein d'une base de données localisée à la plateforme du Département de Biostatistique, Epidémiologie clinique, Santé Publique et Information Médicale du CHU de Nîmes dirigée par le Pr J.P. Daurès et archivées pendant 15 ans.

## **Publications**

Seront premiers signataires des publications, les personnes ayant réellement participé à l'élaboration de l'étude et à son déroulement ainsi qu'à la rédaction des résultats. Les autres intervenants seront mentionnés en tant que participants du groupe d'étude.

## Bibliographie

- Acquaviva C, Duval M, Mirebeau D, et al. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation by PCR amplification of microsatellite markers and capillary electrophoresis with fluorescence detection: the Paris-Robert Debré experience. *Leukemia* 2003, 17:241-246.
- Alizadeh M, Bernard M, Danic B, et al. Quantitative assessment of haematopoietic chimerism after bone marrow transplantation by real-time quantitative polymerase chain reaction. *Blood* 2002, 12:4618-4625.
- Antin JH, Childs R, Filipovich AH, et al. Establishment of complete and mixed donor chimerism after allogeneic lymphohematopoietic transplantation: recommendations from a workshop at the 2001 Tandem Meetings of the International Bone Marrow Transplant Registry and the American Society of Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2001, 7:473-85.
- Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W et al. Increasing mixed chimerism defines a high-risk group of childhood acute myelogenous leukemia patients after allogeneic stem cell transplantation where preemptive immunotherapy may be effective. *Bone Marrow Transplant* 2004, 33:815-821.
- Bader P, Kreyenberg H, Hoelle W et al. Increasing mixed chimerism is an important prognostic factor for unfavorable outcome in children with acute lymphoblastic leukemia after allogeneic stem cell transplantation : possible role for pre-emptive immunotherapy ? *J Clin Oncol* 2004, 22:1696-1706.
- Bader P, Niethammer D, Willasch A et al. How and when should we monitor chimerism after allogeneic stem cell transplantation? *Bone Marrow Transplant* 2005, 35:107-19.
- Bagicalupo A. Results of hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. In: R. Hoffman, E.J. Benz Jr. and S.J. Shattil et al., Editors, *Hematology: Basic Principles and Practice* (4th edn.), Churchill Livingstone, Edinburgh (2004), pp. 1713–1725.
- Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE et al. Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning. *Blood*. 2003, 102:1915-1919.
- Baron F, Baker JE, Storb R et al. Kinetics of engraftment in patients with hematologic malignancies given allogeneic hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning. *Blood* 2004, 104:2254-62.
- Baron F, Sandmaier BM. Chimerism and outcomes after allogeneic hematopoietic cell transplantation following nonmyeloablative conditioning. *Leukemia* 2006, 20:1690-700.
- Barrios M, Jimenez-Velasco A, Roman-Gomez J et al. Chimerism status is a useful predictor of relapse after allogeneic stem cell transplantation for acute leukemia. *Haematologica* 2003; 88:801-810.
- Cave H, Van Der Werff Ten Bosch J, Suci S, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *N Engl J Med* 1998, 339: 591-598.
- Choi S, Lee K, Lee J, et al. Prognostic value of haematopoietic chimerism in patients with acute leukaemia after allogeneic bone marrow transplantation: a prospective study. *Bone Marrow Transplant* 2000, 26:327-332.
- Collins RH Jr, Goldstein S, Giralt S et al. Donor leukocyte infusions in acute lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant*. 2000, 26:511-516.

- Dazzi F, Fozza C. Disease relapse after haematopoietic stem cell transplantation: risk factors and treatment. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2007, 20:311-327.
- Frankfurt O, Licht JD, Tallman MS. Molecular characterization of acute myeloid leukemia and its impact on treatment. *Curr Opin Oncol.* 2007, 19:635-49.
- Frassoni F, Labopin M, Gluckman E et al. Are patients with acute leukaemia, alive and well 2 years post bone marrow transplantation cured? A European survey. *Acute Leukaemia Working Party of the European Group for Bone Marrow Transplantation (EBMT).* *Leukemia.* 1994, 8:924-928
- Guimond M, Busque L, Baron C, et al. Relapse after bone marrow transplantation: evidence for distinct immunological mechanisms between adult and paediatric populations. *Br J Haematol* 2000,109:130-137.
- Hancock JP, Goulden NJ, Oakhill A, et al. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic bone marrow transplantation using immunomagnetic selection and fluorescent microsatellite PCR. *Leukemia* 2003, 17:247-251.
- Harries LW, Wickham CL, Evans JC, et al. Analysis of haematopoietic chimaerism by quantitative real-time polymerase chain reaction. *Bone Marrow Transplant* 2005, 35:283-90.
- Haspel RL, Kao G, Yeap BY et al. Preinfusion variables predict the predominant unit in the setting of reduced-intensity double cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2007 Nov 26 [Epub ahead of print].
- Huff CA, Fuchs EJ, Smith BD et al. Graft-versus-host reactions and the effectiveness of donor lymphocyte infusions. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006, 12:414-21.
- Kang HJ, Kho SH, Jang MK et al. Early engraftment kinetics of two units cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2006, 38:197-201.
- Khan F, Agarwal A, Agrawal S. Significance of chimerism in hematopoietic stem cell transplantation: new variations on an old theme. *Bone Marrow Transplant* 2004, 34:1-12.
- Kristt D, Stein J, Yaniv I, Klein T. Assessing quantitative chimerism longitudinally: technical considerations, clinical applications and routine feasibility. *Bone Marrow Transplant* 2007, 39:255-268.
- Lim ZY, Pearce L, Ho AY et al. Delayed attainment of full donor chimaerism following alemtuzumab-based reduced-intensity conditioning haematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndromes is associated with improved outcomes. *Br J Haematol* 2007, 138:517-26.
- Lim ZY, Pearce L, Ingram W, Ho AY, Mufti GJ, Pagliuca A. Chimerism does not predict for outcome after alemtuzumab-based conditioning: lineage-specific analysis of chimerism of specific diseases may be more informative. *Bone Marrow Transplant* 2007 Nov 26; [Epub ahead of print]
- Lion T. Quantitative analysis of chimerism after allogeneic stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat markers and fluorescence detection. *Leukemia* 2001, 15:303-306.
- Lion T, Daxberger H, Dubosky J, et al. Analysis of chimerism within specific leukocyte subsets for detection of residual or recurrent leukaemia in paediatric patients after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2001, 15:307-310.
- Maas F, Schaap N, Kolen S et al. Quantification of donor and recipient hemopoietic cells by real-time PCR of single nucleotide polymorphisms. *Leukemia* 2003, 17:621-9.

- Maris MB, Niederwieser D, Sandmaier BM et al. HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning for patients with hematologic malignancies. *Blood* 2003, 102:2021-30.
- Marks DI, Lush R, Cavenagh J, et al. The toxicity and efficacy of donor lymphocyte infusions given after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 2002, 100:3108-3114.
- Massenkil G, Nagy M, Lawang M, et al. Reduced intensity conditioning and prophylactic DLI can cure patients with high-risk acute leukaemias if complete donor chimerism can be achieved. *Bone Marrow Transplant* 2003; 31:339-345.
- Mattson J, Uzunel M, Tammik L, et al. Leukemia lineage-specific chimerism analysis is a sensitive predictor of relapse in patients with acute myeloid leukaemia and myelodysplastic syndrome after allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2001, 15:1976-1985.
- Michaelis L, Lin S, Joseph L et al. Chimerism does not predict for outcome after alemtuzumab based conditioning. *Bone Marrow Transplant* 2007, 40:181.
- Milfin G, Stainer CJ, Carter GI, et al. Comparative serial quantitative measurements of chimerism following unmanipulated allogeneic transplantation of peripheral blood stem cells and bone marrow. *Br J Haematol.* 1999,107:429-440.
- Mohty M, Avinens O, Faucher C, Viens P, Blaise D, Eliaou JF. Predictive factors and impact of full donor T-cell chimerism after reduced intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Haematologica* 2007, 92:1004-1006.
- Montero A, Savani BN, Kurlander R et al. Lineage-specific engraftment and outcomes after T-cell-depleted peripheral blood stem cell transplant with Flu/Cy/TBI conditioning. *Br J Haematol* 2005, 130:733-9.
- Mortuza F, Papaioannou M, Moreira I, et al. Minimal residual disease tests provide an independent predictor of clinical outcome in adult acute lymphoblastic leukaemia. *J Clin Oncol* 2002, 20:1094-1104.
- Petersen SL, Madsen HO, Ryder LP et al. Chimerism studies in HLA-identical nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation point to the donor CD8(+) T-cell count on day + 14 as a predictor of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004, 10:337-46.
- Raiola AM, Van Lint MT, Valbonesi M et al. Factors predicting response and graft-versus-host disease after donor lymphocyte infusions: a study on 593 infusions. *Bone Marrow Transplant.* 2003, 31:687-93.
- Ringden O et Le Blanc K. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: state of the art and new perspectives, *APMIS.* 2005, 113:813–830.
- Roux E, Helg C, Chapuis B, et al. Mixed chimerism after bone marrow transplantation and the risk of relapse. *Blood* 1996, 87:3984-3992.
- Schaap N, Schattenberg A, Mensink E, et al. Long-term follow-up of persisting mixed chimerism after partially T cell-depleted allogeneic stem cell transplantation. *Leukemia* 2002, 16:13-21.
- Schoemans H, Theunissen K, Maertens J et al. Adult umbilical cord blood transplantation: a comprehensive review. *Bone Marrow Transplant.* 2006, 38:83-93.
- Sedlaeck P, Formankova R, Sary J et al. Role of chimerism in prevention and/or treatment of posttransplant leukemia relapses in children. *Bone Marrow Transplant* 2002; 29:5128.
- Shiobara S, Nakao S, Ueda M et al., Donor leukocyte infusion for Japanese patients with relapsed leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: lower incidence of acute graft-versus-host disease and improved outcome. *Bone Marrow Transplant.* 2000, 26:769-74.



- Szczepański T. Why and how to quantify minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia? *Leukemia*. 2007, 21:622-626.
- Thiede C, Bornhäuser M, Oelschlägel U, et al. Sequential monitoring of chimerism and detection of minimal residual disease after allogeneic blood stem cell transplantation using multiplex PCR amplification of short tandem repeat-markers. *Leukemia* 2001, 15:293-302.
- Wagner J, Champlin R, Petz LD. Fifth Annual International Umbilical Cord Blood Transplantation Symposium, Los Angeles, California, May 11-12, 2007. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2007, 13:1380-92.
- Wäsch R, Bertz H, Kunzmann R, et al. Incidence of mixed chimerism and clinical outcome in 101 patients after myeloablative conditioning regimens and allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol*. 2000,109:743-75.
- Willemse MJ, Seriu T, Hettinger K, et al. Detection of minimal residual disease identifies differences in treatment response between T-ALL and precursor B-ALL. *Blood* 2002, 99:4386-4393.