



UNIVERSITÉ  
PARIS-SUD 11



FACULTE  
DE MEDECINE  
PARIS-SUD XI



**UNIVERSITE PARIS XI- AIX-MARSEILLE II – LYON I - NANCY I -  
PARIS V - PARIS VI - PARIS VII et TOULOUSE III**

**DIPLOME INTER- UNIVERSITAIRE D’ONCOLOGIE PEDIATRIQUE**  
**Année Universitaire 2004 – 2005**

**RECONSTITUTION IMMUNITAIRE APRES GREFFE DE CELLULES  
SOUCHES DE SANG PLACENTAIRE NON APPARENTEES**  
**(A propos d’une série de 56 cas)**

**Mémoire présenté le 13 octobre 2005**

**Par le Dr Maria EL KABABRI**

**Directeur de mémoire :**

**Dr Gérard MICHEL, Hôpital Timone Enfants, Marseille**

## **REMERCIEMENTS**

### **A Monsieur le Professeur Michel**

Je vous remercie pour m'avoir accueilli au sein de votre service et pour avoir accepté de rapporter sur ce travail. Les six mois passés dans votre service ont été riches en enseignement et en rigueur médicale.

J'admire vos compétences et votre investissement dans les soins comme dans notre formation.

### **A Madame le Docteur Curtillet**

Merci de m'avoir épaulée et soutenue dans la réalisation de ce travail

Je vous remercie pour vos nombreux coups de mains.

**Je remercie enfin, tout le personnel du service d'hématologie pédiatrique pour l'ambiance chaleureuse à laquelle il contribue**

# PLAN

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	p 3
<b>I. INTRODUCTION</b>	p 4
<b>II. GENERALITES SUR LES GREFFES DE SANG PLACENTAIRE</b>	p6
<b>A/ <u>DEFINITION</u></b>	p 6
<b>B/ <u>UTILISATION ACTUELLE</u></b>	p 6
1) Sélection des donneurs	p 6
2) Richesse cellulaire du greffon	p 7
3) Modalités de prélèvement	p 7
4) Banques de sang de cordon	p 7
5) Conservation des unités de sang placentaire	p 8
6) Suivi des donneurs	p 8
7) Décongélation	p 8
8) La transplantation en elle-même	p 8
<b>C/ <u>PRINCIPES DES GREFFES DE SANG PLACENTAIRE</u></b>	p9
1) Compatibilité HLA	p 9
2) Prévention de la maladie du greffon contre l'hôte	p 9
<b>D/ <u>INTERETS ET PARTICULARITES IMMUNOLOGIQUES DU SANG PLACENTAIRE</u></b>	p 10
1) Intérêts	p 10
2) Particularités du profil immunitaire des cellules du sang de cordon	p 12
<b>III. PATIENTS ET METHODES</b>	p 13
<b>A/ <u>CARACTERISTIQUES DES PATIENTS ET DE LEURS MALADIES</u></b>	p 13
1) Age	p 13
2) Sexe	p 13
3) Poids	p 13
4) Pathologies	p 14

5) Statut CMV du receveur	p 14
<b>B/ <u>CARACTERISTIQUES DES GREFFONS</u></b>	p 15
1) Richesse des greffons	p 15
2) Compatibilité HLA	p 15
3) Compatibilité ABO	p 16
4) Statut CMV du greffon	p 16
5) Provenance des greffons	p 16
<b>C/ <u>PROCEDURES DE GREFFE</u></b>	p 17
1) Préparations	p 17
2) Prévention GvH	p 18
3) Prévention des infections	p 18
<b>D/ <u>LES METHODES D'EVALUATION DE LA RECONSTITUTION</u></b>	p 20
<b>E/ <u>LES METHODES STATISTIQUES</u></b>	p 20
<b>IV. RESULTATS</b>	p 22
<b>A/ <u>RESULTATS GLOBAUX</u></b>	p 22
<b>B/ <u>RESULTATS DE RECONSTITUTION IMMUNITAIRE</u></b>	p 25
1) Reconstitution spécifique aux lymphocytes T : CD 3, CD4, CD8	p 25
2) Reconstitution des lymphocytes B : CD19	p 30
3) Reconstitution de la population NK	p31
<b>V. DISCUSSION</b>	p 35
<b>A/ <u>RECONSTITUTION DE LA POPULATION LYMPHOCYTAIRE T</u></b>	p 36
<b>A/ <u>RECONSTITUTION DE LA POPULATION LYMPHOCYTAIRE B</u></b>	p 37
<b>A/ <u>RECONSTITUTION DE LA POPULATION LYMPHOCYTAIRE NK</u></b>	p 38
<b>VI. CONCLUSION</b>	p 39
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

GCS : Greffe de cellules souches

GSP ou GSC : Greffe de sang placentaire = Greffe de sang de cordon

LA : Leucémie aigue

LAL : Leucémie aigue lymphoblastique

RC : Rémission complète

GvH : : Graft versus Host

GVHD : Graft versus host disease : maladie du greffon contre l'hôte

PCR : Polymerase Chain Reaction

CNT : Compte de cellules nucléées totales

PNN : Polynucléaires neutrophiles

GB : Globules blancs

NK : cellules Natural Killer

EFS : Event Free Survival : Probabilité de survie sans rechute

Effet GVL : effet graft-versus-leukemia : effet anti-leucémique du greffon

## **I. INTRODUCTION**

Les greffes des cellules souches hématopoïétiques (CSH) représentent le seul traitement curateur de nombreuses hémopathies malignes et non malignes de l'enfant. L'utilisation du sang de cordon est devenue une alternative intéressante à la greffe de moelle depuis la fin des années 80 en raison de sa richesse en progéniteurs et du caractère immature des cellules immunocompétentes. (1)

La greffe allogénique aussi appelée allogreffe, est effectuée avec des cellules issues d'un donneur. Il s'agit de remplacer la moelle malade ou dysfonctionnelle par un greffon qui va apporter à la fois une nouvelle hématopoïèse, un nouveau système immunitaire et une fonction intacte dans le cadre de la prise en charge de pathologies congénitales. Ces caractéristiques confèrent à la greffe allogénique son caractère thérapeutique et non plus de simple support hématopoïétique.

Les greffes allogéniques peuvent se faire à partir de CSH médullaires, périphériques ou placentaires provenant d'un membre de la fratrie (greffe apparentée) ou d'un donneur anonyme inscrit dans l'un des fichiers internationaux existants (greffe non apparentée).

Depuis plus de quarante ans, les greffes de cellules souches hématopoïétiques provenant d'une moelle de donneur HLA identique apparenté sont réalisées avec succès chez l'enfant.

Or trop souvent, ces greffes médullaires dites génoidentiques ne peuvent être réalisées devant l'absence de donneur HLA-identique dans la fratrie.

L'unique alternative était jusqu'alors aux greffes médullaires phénoïdentiques à partir de donneurs anonymes inscrits sur fichiers.

En 1988, l'utilisation du sang du cordon placentaire comme issue curative à certaines pathologies hématologiques a pris un plein essor depuis les travaux de Gluckman et son équipe (2). Sa simplicité d'obtention, les possibilités de conservation par congélation, et surtout les premiers succès de transplantation en 1988 pour un enfant atteint d'une maladie de Fanconi à partir du sang de cordon de sa sœur HLA identique, ont permis au sang placentaire d'être considéré comme un substitut au don de moelle, au moins pour l'enfant.

La première greffe de sang placentaire non apparenté a été effectuée en 1993 par l'équipe américaine de Kurtzberg (3). Depuis, environ 4000 greffes de sang placentaire ont été réalisées. L'immense majorité de celle-ci a été réalisée en situation non apparentée, à partir de banques de sang placentaire (4).

A de très rares exceptions près (un seul cas de greffe autologue rapporté dans la littérature), l'utilisation du sang placentaire en greffe est exclusivement allogénique (5). Les pathologies concernées sont les mêmes que celles prises en charge par les greffes de moelle ou de cellules souches périphériques, à savoir hémopathies malignes (6.7), aplasies médullaires idiopathiques ou congénitales (8.9), déficits immunitaires sévères (10-13), hémoglobinopathies (drépanocytose, thalassémie) (14-16) et maladies de surcharge (maladie de Hunter, de Hurler) (17,18).

Un des avantages majeurs de la greffe de sang placentaire est la diminution de l'incidence et de la sévérité de la GvH. En revanche il existe un inconvénient majeur qui est le risque de survenue d'infections opportunistes du fait de l'immunodépression T globale dans les six premiers mois post-greffe de sang placentaire, c'est la raison pour laquelle on doit comprendre la reconstitution immunitaire et en dégager les facteurs déterminants.

Notre étude porte sur l'exploration de la reconstitution immunitaire de 56 enfants qui ont bénéficié d'une greffe de sang placentaire non apparenté dans le service du Pr MICHEL, Hôpital de la Timone à Marseille entre 1997 et 2004.

L'objectif de cette étude est de définir quels peuvent être les corrélations entre certains paramètres clinico-biologiques des patients et la qualité de leur reconstitution immunitaire.

## **II. GENERALITES SUR LES GREFFES DE SANG PLACENTAIRE**

### **A/ DEFINITION**

On entend par sang du cordon placentaire, le sang contenu dans la partie fœtale du placenta après la naissance de l'enfant et le clampage du cordon. Biologiquement, il s'agit de sang fœtal, identique en qualité au sang qui circule chez le nouveau né.

Quantitativement, selon la technique utilisée pour le prélèvement et l'habileté de l'équipe qui prélève, 80 à 140 ml peuvent être récupérés à des fins de conservation. (19)

Le sang de nouveau-né à terme contient un pourcentage de cellules précurseurs comparable voire supérieure à celle de la moelle adulte (20,21)

De plus, les cellules souches de sang placentaire sont dotées d'un potentiel de prolifération plus important que les cellules souches adultes, lié en partie à la taille des télomères (22-24).

Le caractère immature des cellules de nouveau-né leur confère par ailleurs une relative tolérance immune.

Ces démonstrations ont permis d'envisager la possibilité de greffes de sang placentaire à partir de donneur non apparenté partiellement compatible.

### **B/ UTILISATION ACTUELLE**

#### **1) Sélection des donneurs**

Le sang du cordon peut être recueilli soit dans le but d'une greffe allogénique familiale (en cas d'enfant atteint dans la fratrie), soit dans le but de contribuer à la constitution de banque de sang de cordon.

Les critères de sélection sont :

- la signature du consentement éclairé : la mère est informée en cours de grossesse sur l'utilité du don, son innocuité, son caractère bénévole et anonyme, et sur la nécessité d'un suivi post-natal (consultation à trois mois).
- les antécédents médicaux et chirurgicaux : les critères d'exclusion sont les mêmes que pour le don de sang en ajoutant les antécédents de maladies génétiques chez la mère, le père ou la fratrie.
- obstétricaux : les grossesses pathologiques, les contextes infectieux au moment de l'accouchement, la prématurité mais aussi l'hypotrophie sont des critères d'exclusion.



## **2) Richesse cellulaire du greffon**

Du fait du faible volume de sang placentaire disponible, les techniques de recueil et de conservation des greffons visent à optimiser et préserver la richesse cellulaire du greffon. Le volume moyen recueilli varie entre 80 et 140 ml suivant les centres.

Il est reconnu par toutes les équipes que la richesse cellulaire du greffon influence significativement la prise de greffe. (25)

## **3) Modalités de prélèvement**

Le recueil doit être réalisé par un personnel entraîné dans le but d'optimiser le volume collecté et doit être fait de façon stérile avec des contrôles sérologiques (VIH1 et 2, Hépatite B et C, HTLV 1 et 2, CMV, Syphilis) ainsi que des cultures bactériologiques.

Deux techniques de collection sont couramment employées :

- le sang de cordon est prélevé par les sages-femmes alors que le placenta est encore in utero, juste après le clampage (26,27).
- Le sang placentaire est prélevé après la délivrance dans une pièce adjacente à la salle de travail par un technicien de la banque (28). Cette technique a comme inconvénient un moindre volume collecté et un risque de contamination bactérienne plus important de 14% contre 4% selon l'étude de Bertolini (29).

Un clampage précoce du cordon a pu être recommandé par de nombreux auteurs pour majorer le volume collecté. Actuellement, l'intérêt d'un court délai de clampage est discuté ; les auteurs privilégient la classique position du nouveau-né sur l'abdomen de la mère dès sa naissance pour optimiser le volume recueilli (30).

## **4/ Banques de sang de cordon**

Après avoir obtenu la confirmation que le sang de cordon était une source alternative de CSH, de nombreuses banques de sang de cordon se sont développées, notamment aux Etats-Unis et en Europe, dans le but de pallier l'absence de donneur HLA compatibles. Fin 2002, le Bone Marrow Donors Worldwide rapportait l'existence de 29 banques de sang de cordon de part le monde (Amérique du nord, Argentine, Australie, Chine, Europe de l'Ouest et l'Europe de l'Est) et la conservation d'environ 130 000 unité de sang placentaire. Trente à 40 000 unités supplémentaires sont recrutées chaque année (19).

Actuellement les banques européennes sont réunies dans le cadre du groupe Eurocord (31). Il regroupe les différents centres européens dans le but de :

- standardiser les méthodes de recueil et de congélation.

- étudier les propriétés des cellules précurseurs et des lymphocytes du sang de cordon.
- faciliter les possibilités de greffes entre les différents pays européens.
- centraliser les résultats et les comparer à ceux des greffes de moelle allogéniques phénoïdétiques.

La création en 1998 de Netcord a permis de centraliser par Internet les données de chacune des unités de sang placentaire localisées dans les différentes banques à travers le monde. Ce registre permet d'évaluer rapidement les possibilités de donneur dans le monde entier, en fonction du typage HLA, de la richesse cellulaire du greffon (32).

### **5/ Conservation des unités de sang placentaire**

Dans les heures qui suivent le prélèvement, le sang doit être congelé et conservé dans de l'azote liquide après une éventuelle erythrodéplétion permettant ainsi des conservations très prolongées (33).

### **6/ Suivi des donneurs**

Pour éviter le risque d'un prélèvement pendant une éventuelle fenêtre sérologique, il convient de vérifier à 3 mois les sérologies maternelles à l'occasion d'une consultation post-natale. Le prélèvement cryopréservé est mis en quarantaine jusqu'à l'obtention des résultats.

A plus long terme, les parents sont incités à signaler au centre de prélèvement l'apparition de pathologies congénitales ou génétiques chez l'enfant.

### **7/ Décongélation**

Le greffon retenu pour le candidat à la greffe est acheminé vers le receveur dans l'azote liquide. Le greffon est décongelé en milieu stérile dans un bain à 37°C. Il est alors centrifugé après addition d'un volume égal de dextran-albumine.

### **8) La transplantation en elle-même**

Elle se fait par voie intraveineuse sur environ une heure. Par convention, le jour de la transplantation est appelé J0. Les cellules souches hématopoïétiques administrées par voie veineuse se dirigent spontanément vers les cavités médullaires et adhèrent au stroma médullaire grâce à des récepteurs cellulaires spécifiques.

Comme pour toute greffe de cellules souches hématopoïétiques, le patient doit être isolé en milieu protégé dans une chambre à flux d'air laminaire ou à pression positive afin de limiter les risques d'infection grave et en attendant la sortie d'aplasie.

## **C/ PRINCIPES DES GREFFES DE SANG DE CORDON PLACENTAIRE**

### **1) Compatibilité HLA**

Le système HLA représente l'ensemble des gènes situés sur le bras court du chromosome 6, codant pour des glycoprotéines transmembranaires à la surface des cellules nucléées de l'organisme. Il se subdivise en classes I et II. Les gènes de classe I sont situés sur les locus A, B et C du chromosome 6, ceux de classe II sur les locus DR, DP, DQ du même chromosome.

Dans le cas des greffes de sang placentaire non apparenté, on recherche un phénotype HLA identique ou partiellement identique. En effet, une compatibilité HLA incomplète est tolérée du fait du caractère immature des lymphocytes T du nouveau-né (34).

Cette immaturité leur confère une relative « tolérance » immune, expliquant la moindre fréquence des réactions du greffon contre l'hôte dans les greffes de sang placentaire (35)

Pour chaque unité de sang placentaire, les données de compatibilité HLA disponibles sur fichiers concernent les locus HLA A et B de classe I en méthode sérologique et le locus DR de classe II par technique de biologie moléculaire. Les donneurs présentant au moins 4 antigènes identiques par rapport aux six du receveur sont ainsi sélectionnés. Un typage HLA plus complet du donneur et du receveur est secondairement réalisé en biologie moléculaire pour les antigènes HLA de classe I (locus A, B et C) et de classe II (locus DR et DP) permettant ainsi un compte sur 10.

### **2) Prévention de la maladie du greffon contre l'hôte**

La maladie du greffon contre l'hôte ou « Graft Versus Host Disease » (GVHD) représente la complication la plus grave survenant dans 30 à 50 % des greffes de moelle allogénique (36). Si elle est responsable de 20 à 40 % de la mortalité après greffe de moelle, elle est en revanche moins fréquente et rarement sévère après greffe de sang placentaire du fait de l'immaturité des lymphocytes T.

- La GVHD aiguë correspond à l'agression des lymphocytes T matures du donneur contre les antigènes majeurs et mineurs d'histocompatibilité du receveur.

Elle se produit dans les 100 premiers jours qui suivent la greffe et se traduit par des atteintes cutanées, hépatiques et digestives. Dans les formes sévères, elle s'accompagne d'une immunodépression importante qui grève le pronostic vital.

- La GVHD chronique correspond à l'échec de la tolérance immune du thymus vis à vis du système immunitaire du receveur. En effet, les cellules souches hématopoïétiques du donneur vont se différencier dans la moelle osseuse puis se diriger vers le thymus pour « apprendre la mémoire immunitaire » du receveur. La GVHD chronique résulte d'un problème de reprogrammation des lymphocytes du donneur.

Elle a lieu après le 100ème jour post-greffe et peut se traduire par des atteintes pluriviscérales comparables à une maladie auto-immune. Elle est dite limitée lorsqu'il s'agit d'une atteinte cutanée localisée et/ou d'un dysfonctionnement hépatique. Elle est qualifiée d'extensive lorsqu'elle concerne une atteinte cutanée généralisée isolée, ou localisée mais associée à une atteinte sévère d'un autre organe.

- La prophylaxie de la GVHD consiste en un traitement immunosuppresseur associant Ciclosporine A et corticothérapie.

## **D/ INTERETS ET PARTICULARITES IMMUNOLOGIQUES DU**

### **SANG PLACENTAIRE**

#### **1) Intérêts**

Ils sont multiples :

Il s'agit d'une source potentielle de cellules hématopoïétiques car le sang de cordon est riche en progéniteurs dont la capacité de prolifération et d'expansion est importante :

- supérieure à celle des cellules souches du sang périphérique adulte
- supérieure à celle des cellules progénitrices de la moelle osseuse

Nous soulignons tout d'abord la facilité d'accès au greffon puisque le cordon et le placenta sont habituellement détruits à la naissance.

Le prélèvement du greffon au moment de l'accouchement, n'est ni invasif, ni nocif pour la mère et le nouveau-né.

Les unités de sang placentaire présentent aussi l'avantage de ne pas transmettre les différents agents infectieux comme le Cytomégalo virus et l'Ebstein Barr Virus.

Ces prélèvements, réalisés à grande échelle, accroissent considérablement les chances, pour un candidat à la greffe, de trouver un donneur potentiel.

La présence de banques dans le monde entier permet de recueillir des greffons provenant d'ethnies très diverses. Les unités de sang placentaire offrent ainsi une possibilité de greffe à des minorités ethniques caractérisées par des phénotypes HLA spécifiques et souvent sous représentées dans les fichiers de donneurs de moelle.

L'immaturation des cellules immunocompétentes du greffon le rend plus « tolérant » vis à vis du receveur, cette constatation repose sur des données phénotypiques et fonctionnelles in vitro et représente un espoir dans le cadre de greffes de sang placentaire non apparenté réalisées en situation HLA partiellement identique sans induire plus de GVHD létales.

La centralisation des données par le biais de Netcord, ainsi que le typage HLA systématique de classes I et II (pour les locus A, B et DR), permettent d'identifier très rapidement un ou quelques greffons potentiels. En revanche, les donneurs potentiels de moelle osseuse sont répertoriés grâce à un typage initial de classe I uniquement. Les réponses positives peuvent alors être très nombreuses mais nécessitent toutes un typage complémentaire souvent long à obtenir.

Ces différentes données permettent d'augmenter considérablement les possibilités et la rapidité d'obtention d'un greffon, lorsqu'une greffe de cellules souches hématopoïétiques est indiquée et urgente. Alors que les greffes de cellules souches hématopoïétiques s'adressent dans un grand nombre de cas à des enfants porteurs d'hémopathies malignes incurables par chimiothérapie seule, la disponibilité rapide du greffon représente un élément capital de la prise en charge thérapeutique.

Enfin, il pourrait s'agir d'un espoir pour la thérapie génique, puisque des études ont montré que la transfection par des vecteurs rétroviraux semble plus efficace dans les cellules du cordon que dans des cellules progénitrices obtenues chez l'adulte.

## **2) Particularités du profil immunitaire des cellules du sang de cordon**

a) Données phénotypiques

Les résultats de plusieurs études sont concordants et montrent que la comparaison en cytométrie de flux du sang de cordon au sang périphérique de l'adulte permet d'observer :

- un taux plus faible en valeurs absolues de lymphocytes T CD3+, CD4+ et CD8+,
- une expression de surface plus faible du CD3,
- un rapport CD4+/CD8+ augmenté,
- la présence d'une population CD3- CD8+ non retrouvée chez l'adulte et pouvant correspondre à des précurseurs hématopoïétiques de la lignée T
- une proportion largement supérieure de cellules naïves CD45RA+
- une population de cellules NK CD3-CD16+CD56+ comparable au sang périphérique
- une population de lymphocytes B CD19+ comparable mais dont 50% porte un marqueur d'immatunité CD5+

Le sang de cordon semble donc contenir une population lymphocytaire plus primitive et plus immature que le sang périphérique.

b) Explorations des fonctions lymphocytaires

Plusieurs études ont exploré les fonctions lymphocytaires des cellules de sang placentaire et ont permis d'obtenir ces résultats concordants :

- Cultures mixtes lymphocytaires : faiblesse de la réponse cytotoxique, avec par rapport au sang périphérique une plus forte proportion de lymphocytes T CD4+ que de T CD8+
- Stimulation allogénique des lymphocytes T : réponses prolifératives secondaires aux alloantigènes 10 à 1000 fois moindre par rapport aux cellules T périphériques de l'adulte
- Etude de la sécrétion de lymphokines : faible capacité de sécrétion : GM-CSF plus que IL2, IL4, IL6 ; pas d'IFN gamma ni alpha.

Le risque de GVHD paraît donc bien diminué et offre la possibilité de greffer entre phénotypes plus incompatibles, par rapport à la moelle osseuse. Les auteurs soulèvent toutefois les objections suivantes : dans la plupart des cas de greffes de sang de cordon il s'agit d'enfants, chez lesquels l'incidence de GVH est déjà réduite et qui tolèrent un HLA mismatch plus élevé que l'adulte. Il serait aussi intéressant d'obtenir les mêmes données à partir de cellules issues de la moelle.

### **III. PATIENTS ET METHODES**

Cette étude rétrospective porte sur 56 patients pris en charge dans le Service d'Hématologie Pédiatrique du Centre Hospitalier Universitaire de Marseille à l'Hôpital pour enfants de « la Timone ». Ils ont tous bénéficié d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques à partir de sang placentaire non apparenté. Les greffes ont eu lieu entre le 6 Février 1997 et le 24 Décembre 2004. Le recul vis à vis de ces greffes au moment de l'étude varie de 6 mois à 8 ans 4 mois avec un recul médian de 45 mois.

#### **A/ CARACTERISTIQUES DES PATIENTS ET DE LEURS MALADIES**

##### **1. Age**

L'âge médian est de 6 ans et 1 mois au moment de la greffe avec des extrêmes allant de 6 mois à 18 ans et 1mois.

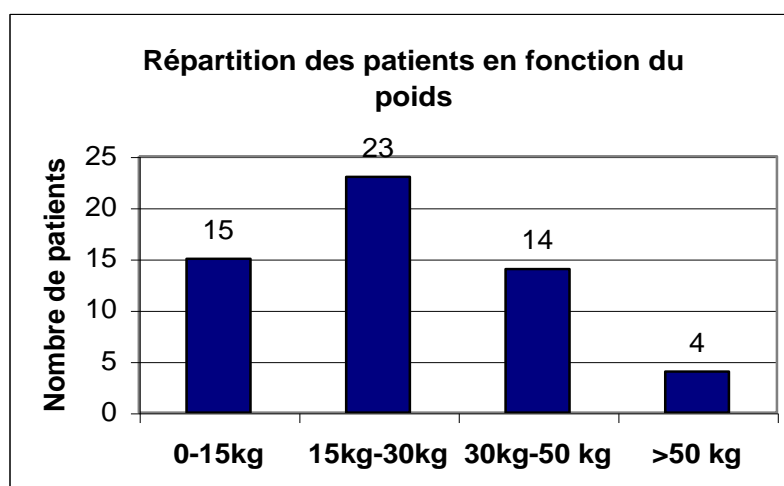
##### **2. Sexe**

Parmi les 56 patients, on dénombre 30 filles et 26 garçons avec un sex ratio de 0,86

##### **3. Poids**

Au moment de la greffe, parmi les 56 patients, 15 pèsent moins de 15 kg, 23 entre 15 et 30 kg, 14 entre 30 et 50 kg et 4 patient plus de 50 kg.

La médiane de poids se situe à 21 kg, dans des extrêmes de 6 kg à 63 kg.



##### **4. Pathologies**

Les pathologies initiales étaient malignes dans 46 cas (82 %) et non malignes dans 10 cas (18 %). Parmi les enfants porteurs de pathologies malignes, six étaient en rechute de leur leucémie aiguë au moment de la greffe. Les différentes pathologies sont résumées dans le tableau I

Pathologies initiales	Nombre de cas	Pourcentage %
<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>Leucémies aiguës</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ LA. Lymphoblastique</li> <li>  Lignée B</li> <li>  Lignée T</li> <li>✓ LA. Myéloblastique</li> <li>✓ LA Biphénotypique</li> </ul> </li> </ul>	41	<b>74 %</b>
▪ <b>Lymphome malin non hodgkinien</b>	3	<b>5 %</b>
▪ <b>Myélodysplasie</b>	2	<b>3 %</b>
▪ <b>Aplasie médulaire</b>	3	5 %
▪ <b>Agranulocytose de Kostmann</b>	1	2 %
▪ <b>Ostéopétrose</b>	1	2 %
▪ <b>Adrénoleucodystrophie</b>	1	2 %
▪ <b>Muccopolysaccharidose</b>	2	3 %
▪ <b>Lymphohistiocytose</b>	1	2 %
▪ <b>Leucodystrophie métachromatique</b>	1	2 %

### **5. Statut CMV du receveur**

Il est important de connaître avant la greffe, le statut CMV du patient, ceci afin de pouvoir éviter toute primo-infection après la greffe ou de pouvoir prévenir les réactivations virales. Le statut CMV du receveur conditionne également l'emploi de produits sanguins adaptés pour éviter toute contamination lors des transfusions.

Dans notre étude, 18 patients avaient un statut CMV positif avant le greffe à type d'immunisation ancienne pour le CMV (IgG+, IgM-).

### **B/ CARACTERISTIQUES DES GREFFONS**



## 1. Richesse des greffons

La richesse cellulaire des greffons est déterminée par :

- ✓ Le compte de cellules nucléées totales /kg de poids du receveur avant congélation et après décongélation,
- ✓ Le compte de cellules CD34+ / kg de poids du receveur avant congélation et après décongélation. Les cellules portant le marqueur CD34 sont les cellules précurseurs, c'est à dire les cellules souches et progéniteurs précoces.

Le compte cellulaire obtenu avant congélation correspond aux caractéristiques du greffon au moment du prélèvement. Celui obtenu après décongélation correspond aux caractéristiques du greffon au moment de la greffe. Les différentes valeurs sont répertoriées dans le tableau II

	<b>Cellules nucléées congelées x 10<sup>7</sup> /Kg</b>	<b>Cellules nucléées injectées x 10<sup>7</sup> /Kg</b>	<b>Cellules CD34 congelées x 10<sup>5</sup> /Kg</b>	<b>Cellules CD34 Injectées x 10<sup>5</sup> /Kg</b>
Médianes	6	3,3	2,3	1,4
Extrêmes	3 - 15	0,8 - 12	0,3 - 10	0,2 – 9,5

## 2. Compatibilité HLA

La compatibilité HLA est étudiée en comparant le nombre de loci identiques de chaque donneur avec son receveur.

Les loci étudiés sont les loci A et B par technique sérologique (groupage générique) et le locus DR par biologie moléculaire haute résolution (groupage allélique)

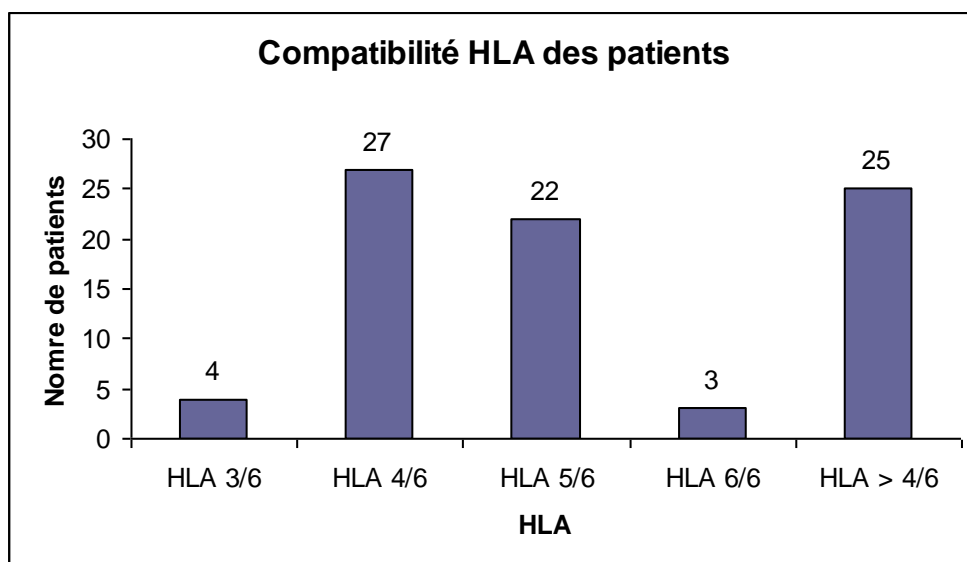
Ainsi, 27 greffes parmi les 56 ont été réalisées avec un greffon compatible à 4/6.

22 parmi les 55 avec un greffon compatible à 5/6

4 parmi les 55 avec un greffon compatible à 3/6.

3 parmi les 55 avec un greffon compatible à 6/6

La médiane de compatibilité en compte sur 6 est donc de 4/6 pour des extrêmes entre 3 et 6.



### **3. Compatibilité ABO**

Parmi les 56 patients, 17 présentent une incompatibilité ABO majeure (soit 30% des cas).

On parle d'incompatibilité majeure dans les cas suivants :

- Donneur de groupe A / Receveur de groupe O ou B.
- Donneur de groupe B / Receveur de groupe O ou A.
- Donneur de groupe AB / Receveur de groupe O.

### **4. Statut CMV des greffons**

Dans 27 cas sur 56 (48%), les greffons étaient porteurs d'Anticorps de type IgG, témoignant de la seule transmission passive d'Anticorps maternels pendant la grossesse. Dans chacun de ces 27 cas, l'absence d'infection active a été confirmée par la négativité des IgM ou de l'antigénémie à CMV.

### **5. Provenance des greffons**

Les 56 greffons provenaient de 14 banques de sang de cordons placentaires différentes, leur provenance respective est résumée dans le tableau III.

<b>ORIGINE DU CORDON</b>	<b>NOMBRE DE CORDONS GREFFES</b>
<b>BESANCON</b>	5
<b>BORDEAUX</b>	5
<b>PARIS</b>	3
<b>POITIERS</b>	1
<b>ANNEMASSE</b>	14
<b>SAINT LOUIS (USA)</b>	1
<b>DUSSELDORF</b>	7
<b>LEUVEN</b>	1
<b>LONDRES</b>	6
<b>MALAGA</b>	2
<b>MILAN</b>	4
<b>MINNEAPOLI</b>	1
<b>NEW YORK</b>	5
<b>NEW JERSEY</b>	1

## **C/ PROCEDURES DE GREFFE :**

### **1. les préparations**

- L'irradiation Corporelle Totale a été utilisée dans 35 cas soit 62 % des cas (12 Grays fractionnés sur 6 séances de 2 Grays réparties sur 3 jours).
  - ✓ Dans 28 cas (50 %), le conditionnement a consisté en l'association de :
    - Irradiation Corporelle Totale
    - Cyclophosphamide à la dose de 60 mg/kg/jour pendant 2 jours.
    - Sérum Anti-Lymphocytaire de lapin à la dose de 2.5 mg/kg par jour pendant 3 jours.
  - ✓ 7 préparations plus lourdes du fait d'un statut leucémique plus avancé : dans 6 cas, il s'agit de l'ajout simple de VP16, dans le dernier cas l'Endoxan était remplacé par une association d'Aracytine et de Melphalan.

- 21 cas n'ont pas eu une irradiation Corporelle Totale pour au moins une des raisons suivantes :
- ✓ Age de moins de 2 ans
- ✓ Pathologie non maligne
- ✓ Irradiation préalable du système nerveux central
- ✓ Pathologie myéloïde

Dans ces cas les associations utilisées ont été :

- ✓ Busulfan (30 mg/m<sup>2</sup> en 4 prises par jour pendant 4 jours), Cyclophosphamide (50 mg/kg/jour pendant 4 jours) et Sérum Anti-Lymphocytaire dans 19 cas.
- ✓ Dans 2 cas on a rajouté le VP16 à l'association précédente à la dose de 30 mg/Kg.

## **2. Prévention GvH,**

Dans 54 cas sur 56, la prévention de la GVHD consiste en l'association de Ciclosporine A et d'une corticothérapie.

- La Ciclosporine A est administrée par voie intra-veineuse continue à partir de J-1 de la greffe à la dose théorique de 3 mg/kg/jour puis la posologie est adaptée en fonction des taux résiduels (100 et 200 ng/ml). Un relais per os est réalisé à partir de J14 ou plus tard en cas d'anorexie totale ou de troubles digestifs majeurs à la dose de 6 mg/kg/jour en 2 prises orales pendant 3 mois avec adaptation de la posologie en fonction des taux résiduels (80 et 150 ng/ml). La posologie est ensuite diminuée progressivement sur 3 mois jusqu'à l'arrêt définitif au sixième mois.
- La corticothérapie est utilisée à la dose de 1,5 mg/kg/jour en 3 prises de J5 à J18 puis réduite à 1mg/kg/jour en 2 prises de J19 à J25, puis 0,75 mg/kg/jour en 2 prises de J26 à J32, 0,5 mg/kg/j en une prise de J33 à J39, 0,25mg/kg/j en une prise de J40 à J46 et arrêt à J47.

Dans 2 cas sur 56, la prévention de la GVHD s'est faite par Ciclosporine A seule. Ce type de prévention est utilisé en situation blastique, le but étant de privilégier l'effet anti-leucémique du greffon en réduisant l'immunosuppression.

## **3. Prévention des infections**

Les infections opportunistes sont systématiquement prévenues par différentes mesures :

- ✓ **Hospitalisation en chambre stérile à flux d'air laminaire** débutée en cours de conditionnement, et après séances d'irradiation corporelle totale le cas échéant.

- ✓ **Décontamination digestive anti-bactérienne et antifongique avec alimentation stérile :**
  - A commencer en flux, après fin du traitement par Busulfan le cas échéant pour ne pas risquer de diminuer l'efficacité de la chimiothérapie per os par des vomissements provoqués.
  - A poursuivre jusqu'à ce que les polynucléaires neutrophiles atteignent 200 ou jusqu'à obtention de coprocultures stériles sur 2 prélèvements.
  - Décontamination digestive anti-bactérienne : association antibiotique de colimycine, gentamycine et vancomycine.
  - Décontamination digestive antifongique : Fungizone
- ✓ **Les infections à streptocoque** sont prévenues par la prise de 50 mg/kg/jour d'Amoxicilline IV en 3 injections jusqu'à l'initiation d'une antibiothérapie large spectre motivée par un fièvre. A l'arrêt de l'antibiothérapie large spectre, prendre le relais par un traitement préventif anti pneumococcique par Péné G à la dose de 50 000 UI/Kg en 2 ou 3 prises pendant un an au moins. Ce traitement est poursuivi 18 mois en cas d'irradiation corporelle totale.
- ✓ **Une prévention spécifique des infections à Pneumocystis carinii** est réalisée par un aérosol de Pentamidine à la dose de 300 mg toutes les trois semaines. Lorsque le taux de plaquettes est supérieur à 50 000 G/l, un relais par Bactrim per os à la dose de 25 mg/kg /jour est réalisé à raison de 3 prises par semaine.
- ✓ **Prévention des infections à CMV** par Zovirax : indiquée lorsque donneur et/ou receveur sont séropositifs pour le CMV. Traitement réalisé de J-5 à J30 post greffe à la dose de 500 mg /m<sup>2</sup> en 3 injections par jour.
- ✓ **Perfusion d'immunoglobulines polyvalentes intraveineuses** à la dose de 500 mg /kg /semaine jusqu'au J60, poursuivie au moins jusqu'au sixième mois avec espacement des perfusions en fonction du dosage résiduel IgG et de la synthèse IgM.
- ✓ **Les infections fongiques** sont prévenues par l'administration de Fluconazole à la dose de 6 mg/kg/jour en une perfusion puis un relais par Itraconazole en sortie d'aplasie et lorsqu'il y a une bonne réalimentation entérale à la dose de 10 mg/kg/jour en une prise.
- ✓ **Prévention des herpès virus par Acyclovir, Valacyclovir**  
En cas de séropositivité prégreffe du receveur pour varicelle – zona ou herpès simplex, le traitement par Zovirax est relayé par le Zélitrex jusqu'à T4 > 500/mm<sup>3</sup>.

## **D/ LES METHODES D'EVALUATION DE LA RECONSTITUTION**

Dans le cadre de la surveillance de la reconstitution immunitaire, un phénotypage lymphocytaire a été réalisé à J30 et J90 après la greffe des cellules de sang placentaire puis à un rythme trimestriel jusqu'à la fin de la première année semestriel la seconde année puis tous les ans.

Le bilan a pour but d'effectuer la numération des populations et sous populations lymphocytaires T et des populations lymphocytaires B et NK par marquage membranaire en immunofluorescence directe. Les déterminants antigéniques étudiés étaient CD3, CD4, CD8, CD19, CD16, CD56.

Le prélèvement sanguin est recueilli sur EDTA et doit être traité dans les meilleurs délais (conservation 36h maximum). Parallèlement à ce prélèvement, une numération formule sanguine doit être effectuée sur EDTA pour permettre la numération des sous-populations leucocytaires. Le nombre absolu de lymphocytes présents dans le prélèvement a été mesuré sur automate d'hématologie.

## **E/ LES METHODES STATISTIQUES**

- Calculs des probabilités de survie et de survie sans événement : ces probabilités ont été calculées selon la technique classique de Kaplan-Meir.
- Définition des marqueurs de reconstitution immunitaire : les seuils de reconstitution utilisés dans notre analyse sont les suivants
  - Lymphocytes T CD3+ > 500/mm<sup>3</sup>,
  - Lymphocytes T CD3+ > 1000/mm<sup>3</sup>
  - Lymphocytes T CD3+ > 1500/mm<sup>3</sup>
  - Lymphocytes T CD4+ > 500/mm<sup>3</sup>
  - Lymphocytes T CD8+ > 250/mm<sup>3</sup>
  - Lymphocytes B CD19+ > 200/mm<sup>3</sup>
  - Lymphocytes NK CD56+ > 100/mm<sup>3</sup>

- Calcul des probabilités de reconstitution immunitaire selon la technique des risques compétitifs : Pour chacun de ces seuils, la probabilité de reconstitution immunitaire a été calculée en terme d'incidence cumulée. La courbe d'incidence cumulée a été calculée selon la méthode de Gooley et al. (37). Cette méthode permet la prise en considération d'événement compétitifs qui peuvent ne pas être indépendants de l'événement d'intérêt (ici la reconstitution immunitaire). Ainsi, un décès précoce peut être du à l'absence de reconstitution et une rechute précoce est susceptible d'empêcher la reconstitution. Les risques compétitifs inclus dans notre modèle sont : décès, rechute, seconde greffe.
- Les effets des facteurs de risque potentiels sur les taux de reconstitution au cours du temps ont été étudiés par le modèle de Fine et Gray (38). Les variables utilisées sont les suivantes : Statut de la maladie au moment de la greffe (rechute vs rémission vs non malin), poids et âge du receveur, nombre de cellules nucléées et de cellules CD34+ injectées par kg de receveur (4 variables continues), compatibilité HLA (3 et 4/6 vs 5 et 6/6), sérologie CMV du receveur, irradiation corporelle totale pré-greffe. Les variables significatives lors de l'analyse univariée ( $p \leq 0.10$ ) ont été incluses dans un modèle multivarié selon une procédure pas-à-pas ascendante (avec  $p \leq 0.10$  comme seuils d'entrée et de sortie). Les rapports des taux spécifiques (hazard ratios, HR) ont été estimés avec leur intervalle de confiance (CI) à 95 %. L'analyse statistique a été effectuée avec le package cmprsk (Gray, 2004) (39) sous le logiciel R (40).

## IV. RESULTATS

### A/ RESULTATS GLOBAUX :

L'évolution de nos patients a été suivie jusqu'au 20 Juin 2005 donnant ainsi un recul médian de 45 mois

avec des extrêmes allant de 6 mois à 8 ans 4 mois .

Nous avons constaté :

- 31 malades vivants dont un en rechute de sa maladie
- 25 décès dont 13 dus à une rechute et 12 suite à une complication liée à la greffe

Les rechutes sont au nombre de 14 dont 5 des 6 malades greffés en rechute de leur pathologie maligne (il s'agit dans tous les cas de leucémie aiguë), le délai médian de la rechute a été de 33 jours.

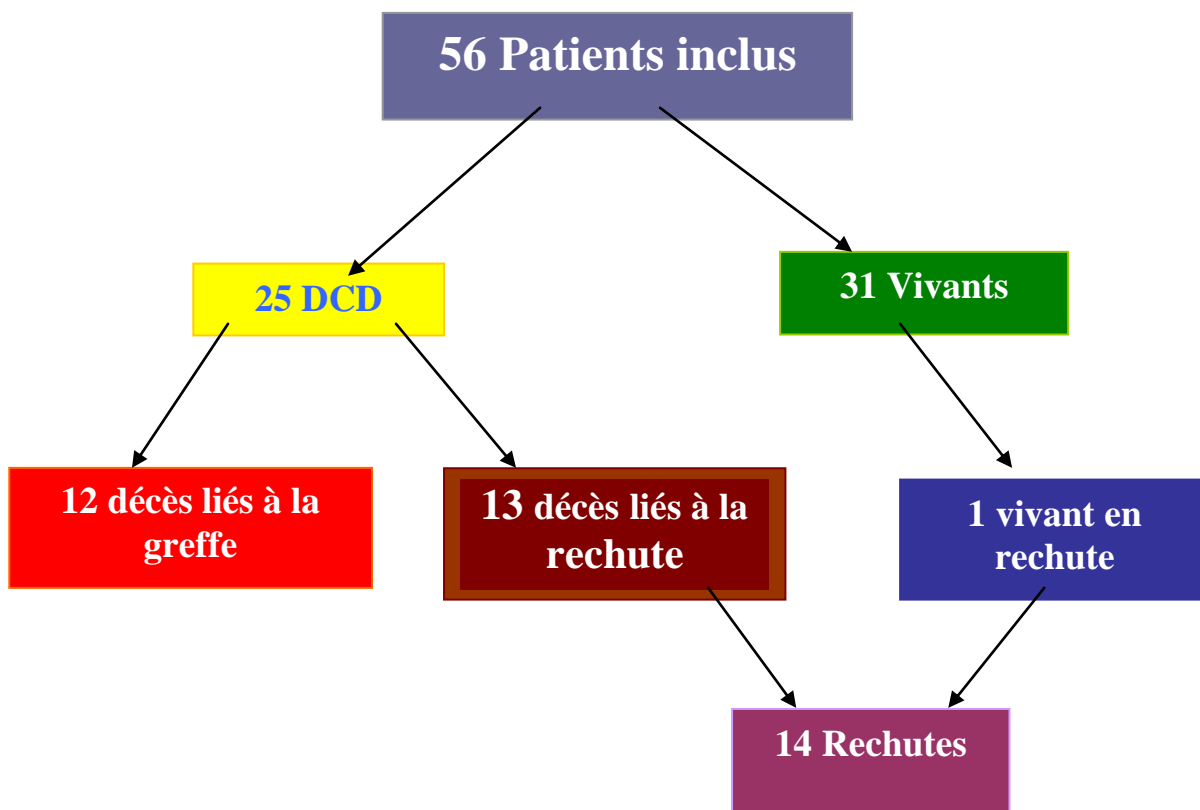


Figure 1 : Evolution globale (recul médian = 45 mois)



On a étudié le devenir de la totalité des malades ( les 56 patients) et celui des 50 malades après exclusion des 6 enfants transplantés en rechute.

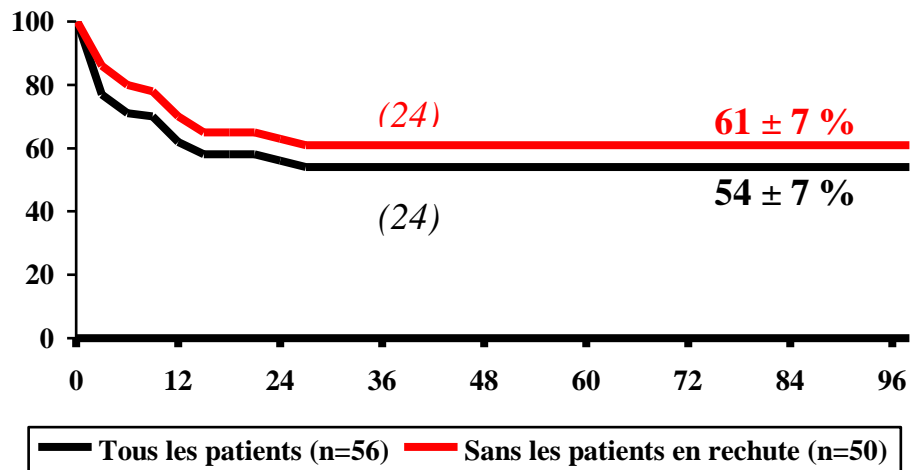
Le taux de survie globale (OS) de l'ensemble des patients et des 50 malades a été respectivement de 61 % +/- 7 % et de 54 % +/- 7 % .

Le taux de survie sans récurrence (EFS) a été de 59 % +/- 7 % pour les 56 malades et de 52 % +/- 7 % pour les 50 malades.

Les 25 décès sont dus pour 13 d'entre eux à une rechute, Les 12 autres patients sont décédés de complications liées à la greffe :

- Il s'agit de complications infectieuses dans 5 cas :
  - Un patient est décédé à 2 mois de la greffe de légionellose pulmonaire et hépatique
  - Un patient est décédé également précocement de toxoplasmose et d'aspergillose cérébrale
  - Un décès suite à une toxoplasmose pulmonaire
  - Un patient est décédé d'une infection bactérienne.
  - Un cas de varicelle grave
  
- Dans 7 cas il s'agit des causes suivantes : GVH aiguë, GVH chronique, 3 détresses respiratoires sans documentations microbiologique, insuffisance multiviscérale et un dernier malade atteint d'une ostéopétrose décédé de sa maladie après échec de prise de greffe.

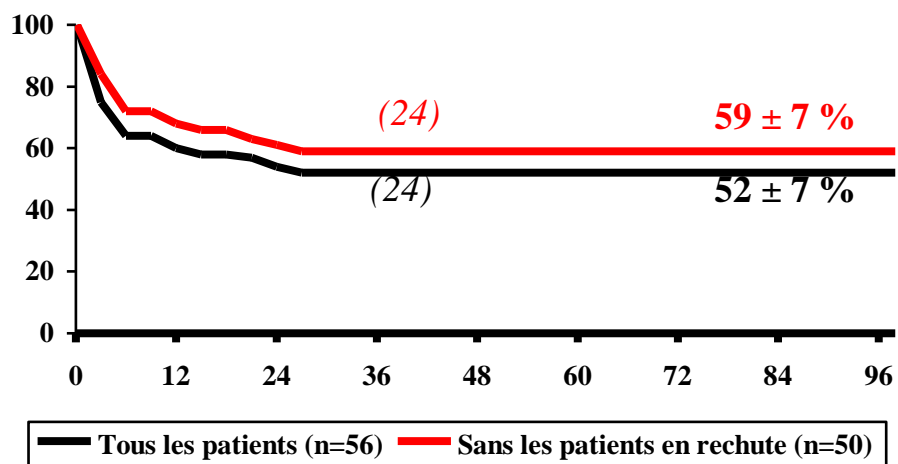
## 1. Survie globale (OS)



Le taux de survie globale (OS) de tous les malades est de 61 % +/- 7 %

Le taux de survie globale (OS) des 50 malades est de 54 % +/- 7 % .

## 2. Survie sans récurrence (EFS)



Le taux de survie sans récurrence (EFS) de tous les malades est de 59 % +/- 7 %

Le taux de survie sans récurrence (EFS) des 50 malades est de 52 % +/- 7 %

## **B/ RESULTATS DE RECONSTITUTION IMMUNITAIRE**

La reconstitution immunitaire est appréciée par l'évolution après la greffe du nombre de lymphocytes totaux, des lymphocytes T, B et des cellules Natural Killer.

## **1. Reconstitution T**

### **a) CD3**

- CD3 > 500/mm<sup>3</sup>

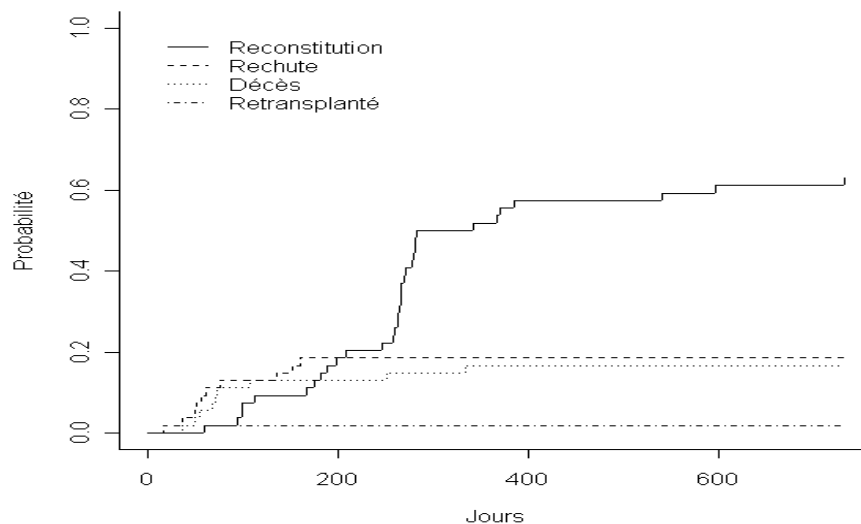
La reconstitution des lymphocytes CD3+ est lente à obtenir après greffe de sang de cordon placentaire avec 34 patients ayant atteint un taux de CD3 supérieur à 500/mm<sup>3</sup> avec un délais médian de 256 jours (extrêmes allant de 59 à 733 jours)

- Au 6<sup>ème</sup> mois, la probabilité d'avoir un taux de lymphocyte CD3 >500/mm<sup>3</sup> est de 18% +/- 10
- Au 10<sup>ème</sup> mois, cette probabilité est de 50% +/- 13
- Entre le 13<sup>ème</sup> et le 16<sup>ème</sup> mois, elle est de 57% +/- 13
- Au delà du 20<sup>ème</sup> elle est de 61% +/- 13

En analyse univariée, les facteurs de risque influençant la probabilité d'atteindre un taux de CD3 >500/mm<sup>3</sup> sont :

- la greffe en situation de rechute (p < 0,0001)
- le nombre de cellules nucléées totales /kg de poids du receveur (p = 0,004)
- le nombre de cellules CD34+ / kg de poids du receveur (p = 0,061)

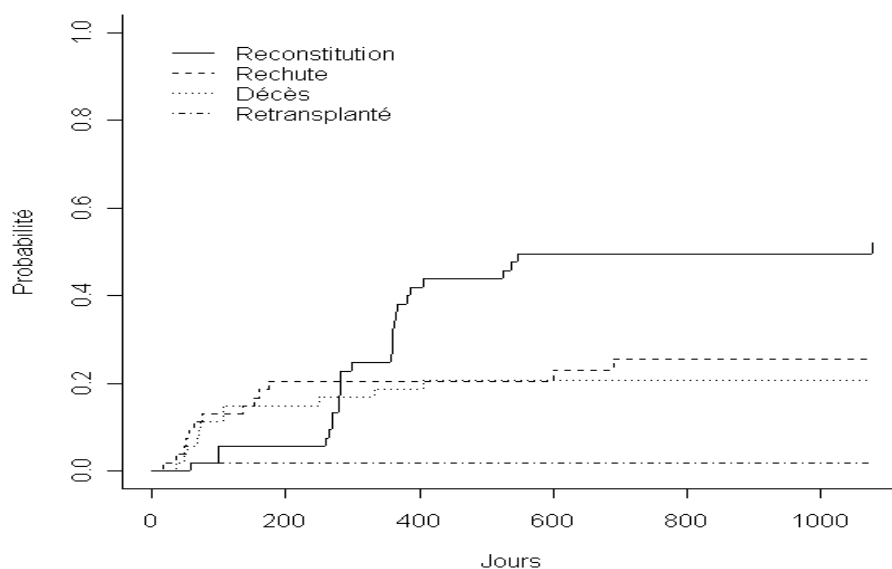
En analyse multivariée, Le risque relatif (RR) de reconstitution est multiplié par 1,13 pour chaque tranche de 1 x 10<sup>7</sup> cellules nucléées totales injectées /kg de poids du receveur.



CD3 > 1000/ mm<sup>3</sup>

Chez 27 patients un taux de CD3 supérieur à  $1000/ \text{mm}^3$  a été atteint avec un délais médian de 358 jours (extrêmes allant de 59 à 1077 jours)

- Au 6<sup>ème</sup> mois, la probabilité d'avoir un taux de lymphocyte CD3  $>1000/ \text{mm}^3$  est de 6% +/- 5
  - Au 13<sup>ème</sup> mois, cette probabilité est de 42% +/- 13
  - Au delà du 20<sup>ème</sup>, elle est de 50% +/- 13
- En analyse univariée, les facteurs de risque influençant la probabilité d'atteindre un taux de CD3  $>1000/\text{mm}^3$  sont : la greffe en situation de rechute ( $p < 0,0001$ ) et l'âge à la greffe ( $p = 0,023$ )
- En analyse multivariée, le risque relatif (RR) de reconstitution est multiplié par 1,11 pour chaque tranche d'âge de 1 an



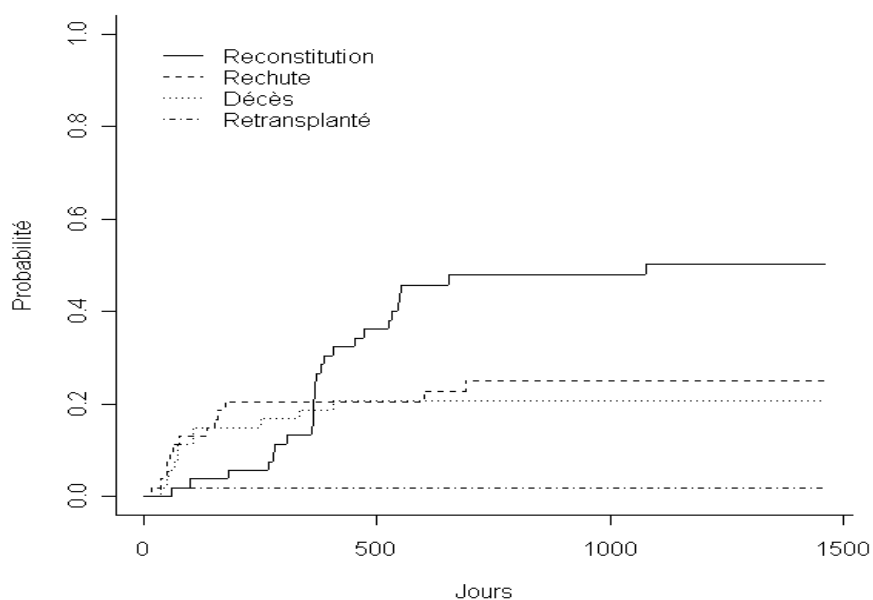
- CD3  $> 1500/ \text{mm}^3$

26 patients ont atteint un taux de CD3 supérieur à 1500/mm<sup>3</sup> avec un délais médian de 368 jours (extrêmes allant de 59 à 1077 jours)

- Au 13<sup>ème</sup> mois, la probabilité d'avoir ce taux est de 30% +/- 12
- Au 20<sup>ème</sup> mois, cette probabilité est de 46% +/- 13
- Entre le 26<sup>ème</sup> et le 33<sup>ème</sup> mois, elle est de 48 % +/- 14
- Au delà du 40<sup>ème</sup> elle est de 50 % +/- 14

- En analyse univariée, les facteurs de risque influençant la probabilité d'atteindre un taux de CD3 supérieur à 1500/ mm<sup>3</sup> sont : la greffe en situation de rechute (p < 0,0001) et l'âge à la greffe (p = 0,011)

- En analyse multivariée, le risque relatif (RR) de reconstitution est multiplié par 1,12 pour chaque tranche d'âge de 1 an.



### **b) CD4 > 500/ mm3**

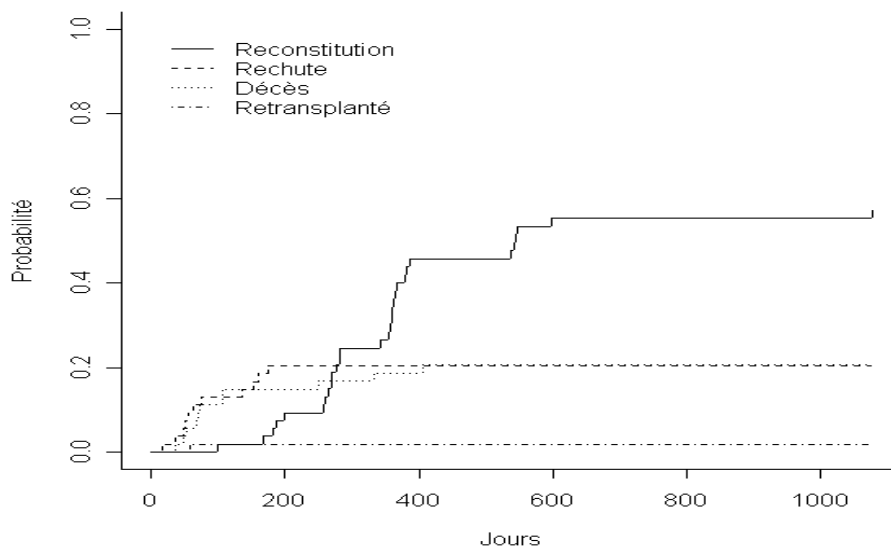
La reconstitution des lymphocytes CD3+ CD4+ est aussi très lente à obtenir, parmi les 56 patients, 30 ont atteint un taux de CD4 supérieur à 500/ mm<sup>3</sup> avec un délais médian de 356 jours (extrêmes allant de 99 à 1077 jours)

- Au 6<sup>ème</sup> mois, la probabilité d'avoir ce taux est de 9 % +/- 7
- Au 13<sup>ème</sup> mois, cette probabilité est de 46 % +/- 13
- Au delà du 20<sup>ème</sup>, elle est de 55 % +/- 14

En analyse univariée, les facteurs de risque influençant la probabilité d'atteindre un taux de CD4 > 500/ mm<sup>3</sup> sont :

- la greffe en situation de rechute (p < 0,0001) et
- le nombre de cellules nucléées totales /kg de poids du receveur (p = 0,005)

En analyse multivariée, Le risque relatif de reconstitution est multiplié par 1,16 pour chaque tranche de  $1 \times 10^7$  cellules nucléées totales injectées /kg de poids du receveur.



### c) CD8 >250/mm<sup>3</sup>

Parmi les 56 patients, seuls 29 ont atteint un taux de CD8 supérieur à  $250/\text{mm}^3$  avec un délais médian de 266 jours (extrêmes allant de 32 à 1077 jours)

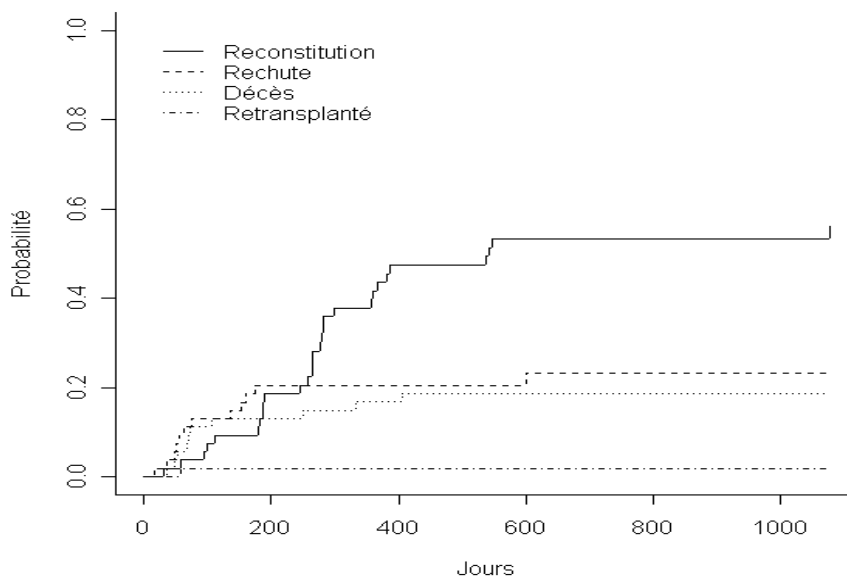
La reconstitution des lymphocytes CD3+ CD8+ est aussi lente à obtenir :

- Au 6 ème mois, la probabilité d'avoir un taux de lymphocyte CD8  $>250/\text{mm}^3$  est de 18% +/- 10
- Au 13 ème mois, cette probabilité est de 47% +/- 13
- Après le 20 ème, elle devient constante 53% +/- 14

En analyse univariée, les facteurs de risque influençant la probabilité d'atteindre un taux de CD8  $>250/\text{mm}^3$  sont :

- la greffe en situation de rechute ( $p < 0,0001$ )
- l'âge à la greffe ( $p = 0,087$ )

En analyse multivariée, la rechute est le seul facteur qui ressort.



## **2. Reconstitution B : CD19 > 200/ mm3**

Chez 34 patients un taux de CD19 supérieur à  $200/\text{mm}^3$  a été atteint avec un délais médian de 100 jours (extrêmes allant de 83 à 588 jours)

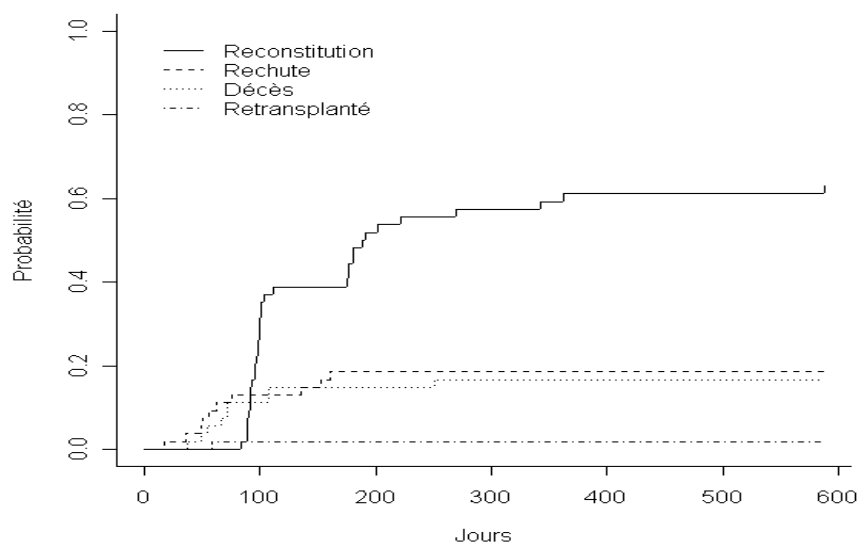
La reconstitution des lymphocytes B est rapide à obtenir en la comparant avec celle des lymphocytes T :

- Au 3<sup>ème</sup> mois, la probabilité d'avoir un taux de lymphocyte CD19+  $>200/\text{mm}^3$  est de 31% +/- 12
- Au 6<sup>ème</sup> mois, cette probabilité est de 52% +/- 13
- Au 10<sup>ème</sup> mois, on retrouve 57% +/- 13
- Après elle est de 61% +/- 14

- En analyse univariée, les facteurs de risque influençant la probabilité d'atteindre un taux de

- CD19 supérieur à 200/ml sont : la greffe en situation de rechute ( $p < 0,0001$ ) et le nombre de cellules nucléées totales /kg de poids du receveur ( $p = 0,031$ )

- En analyse multivariée, la greffe en situation de rechute reste le seul facteur qui pourrait influencer la reconstitution des CD19



### 3. Reconstitution NK : NK > 100/ml



La reconstitution des cellules Natural Killer est la plus précoce à obtenir avec 43 patients ayant un taux supérieur à  $100/ \text{mm}^3$  avec un délais médian de 54 jours (extrêmes allant de 29 à 129 jours).

La population de cellules Natural Killer reste majoritaire jusqu'au 4<sup>ème</sup> mois puis garde un taux quasi constant durant les mois suivants :

- Au 40<sup>ème</sup> jour, la probabilité d'avoir un taux de cellules Natural Killer  $>100/ \text{mm}^3$  est de 37% +/- 13
- Au 2<sup>ème</sup> mois, cette probabilité est de 43% +/- 13
- A partir du 4<sup>ème</sup> mois elle est de 78% +/- 11

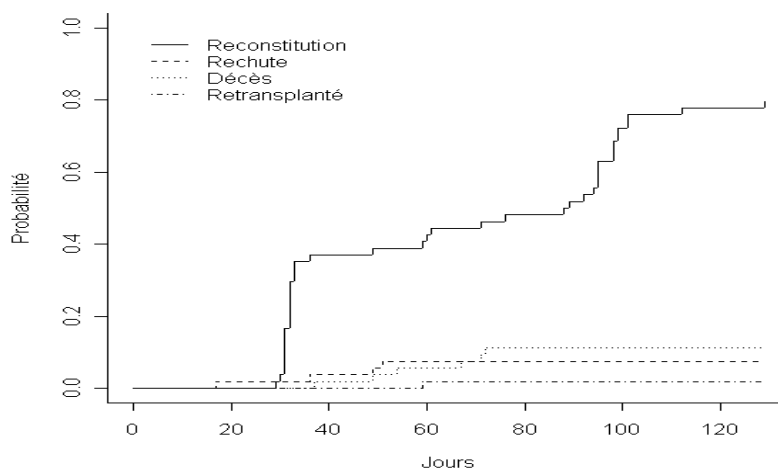
- En analyse univariée, les facteurs de risque influençant la probabilité d'atteindre un taux de cellules Natural Killer  $>100/ \text{mm}^3$  sont :

- ✓ la greffe en situation de rechute ( $p = 0,092$ )
- ✓ Le caractère non malin ( $p = 0,048$ )
- ✓ Le statut CMV du receveur ( $p = 0,038$ )
- ✓ le nombre de cellules nucléées totales /kg de poids du receveur ( $p = 0,005$ )

- En analyse multivariée, le statut CMV du receveur ne ressort pas comme facteur influençant la reconstitution des cellules Natural Killer.

Le risque relatif de reconstitution est multiplié par :

- ✓ 0,21 pour la greffe en situation de rechute
- ✓ 1,13 pour chaque tranche de  $1 \times 10^7$  cellules nucléées totales injectées /kg de poids du receveur.
- ✓ 0,41 pour le caractère non malin de la pathologie initiale



**TABLEAU IV : FACTEURS PRONOSTIC DE LA RECONSTITUTION  
IMMUNITAIRE (ETUDE UNIVARIEE)**

<b>Evénement pris en compte</b>	<b>Facteurs significatifs en étude univariée</b>	<b>Risque relatif en univarié</b>	<b>p en univarié</b>
<b>CD3 &gt; 500/ mm3</b>	- Greffe en situation de rechute	< 10 <sup>-4</sup>	< 0,0001
	- Cellules nucléées injectées /kg	4	0,004
	- Nombre de cellules CD34+ / kg	3	0,061
<b>CD3 &gt; 1000/ mm3</b>	- Greffe en situation de rechute	< 10 <sup>-4</sup>	< 0,0001
	- Age	0,90	0,023
<b>CD3 &gt; 1500/ mm3</b>	- Greffe en situation de rechute	< 10 <sup>-4</sup>	< 0,0001
	- Age	0,88	0,011
<b>CD4 &gt; 500/ mm3</b>	- Greffe en situation de rechute	< 10 <sup>-4</sup>	< 0,0001
	- Cellules nucléées injectées /kg	5,49	0,005
<b>CD8 &gt;250/mm3</b>	- Greffe en situation de rechute	< 10 <sup>-4</sup>	< 0,0001
	- Age	0,93	0,087
<b>CD19 &gt; 200/ mm3</b>	- Greffe en situation de rechute	< 10 <sup>-4</sup>	< 0,0001
	- Cellules nucléées injectées /kg	2,55	0,031
<b>NK &gt; 100/ml</b>	- Greffe en situation de rechute	0,25	0,092
	- Caractère non malin	0,52	0,048
	- Cellules nucléées injectées /kg	3,45	0,005
	- Statut CMV du receveur	0,51	0,038

**TABLEAU V : FACTEURS PRONOSTIC DE LA RECONSTITUTION  
IMMUNITAIRE (ETUDE MULTIVARIEE)**

<b>Evénement pris en compte</b>	<b>Facteurs significatifs en étude multivariée</b>	<b>Risque relatif en multivarié</b>	<b>p en multivarié</b>
<b>CD3 &gt; 500/ mm<sup>3</sup></b>	- Greffe en situation de rechute - Cellules nucléées injectées /kg	< 10 <sup>-4</sup> 1,13 par tranche de 10 <sup>7</sup> cellules injectées /kg	< 0,0001 0,016
<b>CD3 &gt; 1000/ mm<sup>3</sup></b>	- Greffe en situation de rechute - Age	< 10 <sup>-4</sup> 1,11 par tranche d'âge de 1 an	< 0,0001
<b>CD3 &gt; 1500/ mm<sup>3</sup></b>	- Greffe en situation de rechute - Age	< 10 <sup>-4</sup> 1,12 par tranche d'âge de 1 an	< 0,0001 0,025
<b>CD4 &gt; 500/ mm<sup>3</sup></b>	- Greffe en situation de rechute - Cellules nucléées injectées /kg	< 10 <sup>-4</sup> 1,16 par tranche de 10 <sup>7</sup> cellules injectées /kg	< 0,0001 0,013
<b>CD8 &gt;250/mm<sup>3</sup></b>	- Greffe en situation de rechute	< 10 <sup>-4</sup>	< 0,0001
<b>CD19 &gt; 200/ mm<sup>3</sup></b>	- Greffe en situation de rechute	< 10 <sup>-4</sup>	< 0,0001
<b>NK &gt; 100/ml</b>	- Greffe en situation de rechute - Caractère non malin - Cellules nucléées injectées /kg	0,21 0,41 1,13	0,064 0,004 0,007

**TABLEAU VI : DELAIS DE RECONSTITUTION**

	<b>n</b>	<b>Médiane (jours)</b>	<b>Extrêmes (jours)</b>
<b>CD3 &gt; 500/ mm<sup>3</sup></b>	34	265	59 - 733
<b>CD3 &gt; 1000/ mm<sup>3</sup></b>	27	358	59 - 1077
<b>CD3 &gt; 1500/ mm<sup>3</sup></b>	26	368	59 - 1077
<b>CD4 &gt; 500/ mm<sup>3</sup></b>	30	356	99 - 1077
<b>CD8 &gt;250/mm<sup>3</sup></b>	29	266	32 - 1077
<b>CD19 &gt; 200/ mm<sup>3</sup></b>	34	100	83 - 588
<b>NK &gt; 100/ml</b>	43	54	29 - 129

**V. DISCUSSION**

La greffe de cellules de sang de cordon est progressivement devenue, au cours des quinze dernières années, une alternative intéressante à la transplantation de moelle allogénique. Malgré un nombre de cellules greffées très inférieur à celui retrouvé en greffe de moelle (1 log de différence), la reconstitution des différentes populations lymphocytaires qualitative ou quantitative s'avère possible.

La reconstitution immunitaire T après greffe de moelle est classiquement décrite dans la littérature comme un processus en deux vagues (41) :

- la première correspond à une expansion des lymphocytes matures du donneur, cette phase est « thymo-indépendante » et conduit à une diversité dans le répertoire T limitée.
  
- la deuxième vague suit la première et est constituée par l'apparition de lymphocytes naïfs issus de la différenciation dans le thymus de l'hôte, des cellules souches hématopoïétiques du donneur. Cette seconde voie conduit à des lymphocytes T tolérants et dont le répertoire est étendu.

La première vague décrite dans ce modèle ne peut qu'être moins effective dans les greffes de sang de cordon étant donné le plus faible nombre de lymphocytes injectés ainsi que leur immaturité. L'absence de cette « première vague » est classiquement décrite dans la littérature comme responsable de l'incidence plus grande des complications infectieuses après greffe de sang de cordon.

La « deuxième vague » est prépondérante dans les greffes de sang de cordon et fait suite à la recolonisation par les cellules des organes hématopoïétiques et leur différenciation. Leur éducation dans le thymus reste un point clé pour la diversité du répertoire T et se pose ici le problème de l'involution thymique qui pourrait être un phénomène limitant.

## **A. RECONSTITUTION DE LA POPULATION LYMPHOCYTAIRE T**

La reconstitution du contingent lymphocytaire T est classiquement décrite comme très lente et nous constatons la même chose dans notre population.

L'étude de Moretta retrouve des médianes de reconstitution du compartiment T entre 12 et 15 mois après la greffe (41).

De même, dans l'étude du groupe Eurocord, les médianes de lymphocytes T rejoignent les valeurs normales de la population étudiée aux alentours de 12 mois (42, 43).

Dans notre étude les médianes de reconstitution des lymphocytes T ont été atteintes entre 9 et 12 mois après la greffe. Ces délais observés sont en accord avec la littérature.

Les données concernant les greffes de moelle allogéniques montrent les mêmes délais ce qui témoigne de la lenteur avec laquelle le compartiment T se régénère.

Nous avons montré que du nombre de cellules injectées/kg de poids du receveur influence la reconstitution du contingent lymphocytaire T lorsque l'événement pris en compte est un taux de lymphocyte CD3  $>500/\text{mm}^3$ , cette influence est en accord avec Eurocord.

Par contre lorsque on examine des événements plus tardifs de la reconstitution T (CD3  $>1000/\text{mm}^3$ , CD3  $>1500/\text{mm}^3$ ), le nombre de cellules injectées/kg de poids du receveur perd sa signification statistique tandis que le jeune âge devient un facteur prédominant.

Nous formulons l'hypothèse que les deux vagues de reconstitution lymphocytaire T pourraient avoir des déterminants différents. Ainsi la première vague, qui est une expansion des lymphocytes T matures du greffon serait directement liée à la quantité des cellules injectées. La seconde vague, thymodépendante pourrait être facilitée par le jeune âge de l'enfant. On sait en fait que le thymus involue avec l'âge.

L'étude de Talvensaaari a déjà montré l'influence de l'involution thymique sur la qualité de reconstitution du contingent T (44).

Enfin, aucune différence significative n'a été soulignée concernant le mismatch HLA. Ceci rejoint des données de la littérature selon lesquelles malgré des disparités du système HLA les cellules de cordon restent plus tolérantes et permettent de reconstituer un compartiment T fonctionnel. De même, les cellules de cordon sont reconnues comme ayant de meilleures capacités d'interaction avec les cellules épithéliales thymiques leur permettant de régénérer les sous populations T dans un contexte de disparité HLA.

## **B. RECONSTITUTION DE LA POPULATION LYMPHOCYTAIRE B**

Le contingent lymphocytaire B est la deuxième population à se reconstituer dans cette étude. Chez 34 patients un taux de CD19 supérieur à  $200/\text{mm}^3$  a été atteint après un délais médian de 3 mois (2 mois 23 jours – 19 mois). Ces données sont, elles aussi, en accord avec les données actuelles de la littérature (45).

Nos résultats apparaissent superposables à ceux décrits dans l'étude de Thomson sur la reconstitution immunitaire de 27 enfants après greffe de cellules issues de sang de cordon : La population lymphocytaire B est reconstituée à 6 mois (46).

Les travaux de Gluckman et du groupe Eurocord décrivent la même rapidité avec laquelle les lymphocytes B retrouvent des valeurs normales (43).

Déjà en 1996, Locatelli décrivait la notion d'expansion de la population lymphocytaire B en dehors de toute infection virale (notamment EBV) après greffe de sang placentaire (47).

Cette rapide reconstitution B est associée au fait qu'un plus grand nombre de cellules précurseur B sont présentes dans le sang de cordon (47).

Les travaux de Locatelli ont montré l'absence de cellules B mémoire dans le sang de cordon alors que les cellules B naïves y sont prépondérantes (48). Un nombre plus important de cellules B est donc nécessaire pour assurer l'immunité humorale, ce qui expliquerait en partie la rapidité avec laquelle les cellules lymphoïdes B se régénèrent.

Cette croissance rapide des lymphocytes B semble liée aux capacités de prolifération accrue du lymphocyte B dans les premiers mois de vie en réponse aux stimulations antigéniques. Les lymphocytes B de sang de cordon semblent donc conserver après transplantation leur potentiel intrinsèque de prolifération rapide.

Dans notre étude, les facteurs de risque qui pourrait influencer la reconstitution des CD19 sont : la greffe en situation de rechute et le nombre de cellules nucléées totales /kg de poids du receveur.

Les données retrouvées sont pas en accord avec quelques études, dont celle publiées par Gluckman et le groupe Eurocord où les deux facteurs de risque principaux à prendre en compte avant la greffe restent le nombre de cellules injectées ainsi que le mismatch HLA (42, 43, 49).

### **C. RECONSTITUTION DE LA POPULATION LYMPHOCYTAIRE NK**

Dans ce groupe de patients, nous constatons que la population lymphocytaire NK est majoritaire en sortie de greffe.

En effet 43 patients ont atteint un taux de lymphocytes NK supérieur à  $100/ \text{mm}^3$  avec un délais médian de 54 jours après la greffe, ce qui constitue un profil de reconstitution très particulier que nous ne retrouvons décrit dans la littérature que pour les greffes de cellules issues de sang de cordon (39, 47, 48).

Il est classiquement décrit dans la littérature la rapidité avec laquelle la population lymphocytaire NK se reconstitue après greffe de sang de cordon. Dans notre étude, la population NK est la première population à se reconstituer et le retour à des valeurs normales de lymphocytes NK se fait en moins de 3 mois ce qui est en accord avec la littérature (50, 51). Les valeurs absolues de lymphocytes NK restent par ailleurs stables dans la période post greffe. En effet, même si les pourcentages de lymphocytes NK diminuent après la greffe, le nombre de lymphocytes totaux augmente ce qui normalise les valeurs absolues. Ces données sont, elles aussi, en accord avec les données actuelles de la littérature (45).

Parmi les paramètres observés dans notre étude, la greffe en situation de rechute, le caractère non malin de la pathologie initiale et le nombre de cellules nucléées totales /kg de poids du receveur ont été reconnus comme influençant la reconstitution immunitaire NK.

Les mécanismes de reconstitution NK sont peu décrits dans la littérature et restent encore à caractériser. Peu d'équipes ont tenté d'élucider cette « explosion » NK en sortie de greffe, suivi d'un retour à la normale très rapide (3 mois ou moins selon les études).

Cependant, malgré des valeurs chiffrées en accord avec les valeurs normales de lymphocytes NK, nous n'avons pas testé la fonctionnalité de ces lymphocytes. Les travaux de Gluckman, sur l'étude des activités cytotoxiques aspécifiques fonctionnelles des lymphocytes NK après greffe de sang placentaire, présentent une similitude avec les greffes de moelle allogéniques (43).

De même, une étude de Thomson en 2000 (46), insiste sur le retour à une activité cytotoxique très rapide des lymphocytes NK avec des fonctions normales retrouvées à un mois après la greffe chez l'ensemble des enfants de la cohorte.

## **VI. CONCLUSION**



Les greffes allogéniques de sang placentaire font partie depuis plusieurs années de l'arsenal thérapeutique des équipes d'hématologie. En effet La greffe de cellules issues de sang placentaire offre aujourd'hui de nombreux intérêts dont les plus importants sont sans doute la rapidité avec laquelle un donneur peut être trouvé et la GVHD qui reste moins fréquente et moins sévère que dans la greffe de moelle osseuse.

Dans notre étude, les délais de reconstitution sont comparables aux données de la littérature.

Nous suggérons que les facteurs déterminants de la deuxième vague de la reconstitution T puissent être différents des facteurs de la première vague.

Ainsi, la quantité de cellules injectées intervient pendant la première vague, l'âge intervient au cours de la seconde vague probablement du fait que la thymopoïèse est plus importante chez le jeune enfant.

Nous en tirons un intérêt thérapeutique qui est d'augmenter le nombre de cellules injectées ou d'utiliser deux greffons pour la première vague et prescrire des facteurs qui stimulent la thymopoïèse pour la deuxième vague.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

**1. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A et al**

Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. N Engl J Med. 1998 Nov 26;339(22):1565-77.

**2. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD.**

Hematopoietic reconstitution in a patient with fanconi's anemia by means of umbilical cord blood from an HLA identical sibling.  
New England Journal of Medicine 1989; 17: 1174-8

**3. Kurtzberg J, Laughlin M, Graham M et al.**

Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients.  
New Engl J Med 1996 Jul 18 ; 335 (3): 157-66.

**4. Gluckman E, Rocha V.**

History of the clinical use of umbilical cord blood hematopoietic cells.  
Cytotherapy. 2005;7(3):219-27.

**5. Ferreira E, Pasternak J, Bacal N et al**

Autologous cord blood transplantation.  
Bone Marrow Transplant. 1999 Nov;24(9):1041

**6. Gluckman E, Rocha V.**

Cord blood transplantation for children with acute leukaemia: a Eurocord registry analysis.  
Blood Cells Mol Dis. 2004 Nov-Dec;33(3):271-3.

**7. Yossi Cohen and Arnon Nagler**

Umbilical cord blood transplantation – how, when and for whom?  
Blood Reviews, Volume 18, Issue 3, September 2004, Pages 167-179

**8. Fruchtman SM, Hurlet A, Dracker R et al**

The successful treatment of severe aplastic anemia with autologous cord blood transplantation.  
Biol Blood Marrow Transplant. 2004 Nov; 10 (11):741-2

**9. Bielorai B, Hughes MR, Auerbach AD et al**

Successful umbilical cord blood transplantation for Fanconi anemia using preimplantation genetic diagnosis for HLA-matched donor.  
Am J Hematol. 2004 Dec;77(4):397-9.

**10. Vibhakar R, Radhi M, Rumelhart S et al.**

Successful unrelated umbilical cord blood transplantation in children with Shwachman-Diamond syndrome.  
Bone Marrow Transplant. 2005 Aug 22;

**11. Alan P. Knutsen MD, Marsha Steffen RN, Kris Wassmer and Donna A. Wall MD**

Umbilical cord blood transplantation in Wiskott Aldrich syndrome  
The Journal of Pediatrics. Volume 142, Issue 5 , May 2003, Pages 519-523

**12. F Fagioli, E Biasin, M Berger et al**

Successful unrelated cord blood transplantation in two children with severe combined immunodeficiency syndrome.  
Bone Marrow Transplantation 31, 133-136 (01 Jan 2003)

**13. A Bhattacharya, M A Slatter, C E Chapman et al**

Single centre experience of umbilical cord stem cell transplantation for primary immunodeficiency  
Bone Marrow Transplantation 36, 295-299 (01 Aug 2005)

**14. Tang-Her Jaing, Iou-Jih Hung, Chao-Ping Yang et al**

Rapid and Complete Donor Chimerism after Unrelated Mismatched Cord Blood Transplantation in 5 Children with  $\beta$ -Thalassemia Major  
Biology of Blood and Marrow Transplantation, Volume 11, Issue 5, May 2005, Pages 349-353

**15. Christiane Vermeylen**

Hematopoietic stem cell transplantation in sickle cell disease  
Blood Reviews, Volume 17, Issue 3, September 2003, Pages 163-166

**16. Locatelli F, Rocha V, Reed W et al; Eurocord Transplant Group.**

Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease.  
Blood. 2003 Mar 15;101(6):2137-43

**17. V Lee, C K Li, M M K Shing et al**

Umbilical cord blood transplantation for Maroteaux–Lamy syndrome (mucopolysaccharidosis type VI)  
Bone Marrow Transplantation 26, 455-458 (09 Aug 2000)

**18. Staba SL, Escolar ML, Poe M et al**

Cord-blood transplants from unrelated donors in patients with Hurler's syndrome.  
N Engl J Med. 2004 May 6;350(19):1960-9

**19. Dalle JH.**

[Cord blood banking: public versus private banks--facts to ponder and consider]  
Arch Pediatr. 2005 Mar;12(3):298-304..

**20. Broxmeyer HE, Gluckman E, Auerbach AD, Douglas GW, Friedman H, Cooper S et al.**

Human umbilical cord: a clinically useful source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells .  
Int J Cell Cloning 1990; 8: 76-91

**21. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, et al.**

Human umbilical cord as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells .  
Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 3828-32

**22. Mayani H, Landscorp PM.**

Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem / progenitor cells.  
Stem cells 1998; 16: 153-65

**23. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, Ribeiro C, Graves V et al.**

Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults.  
Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 4109-13

**24. Hows JM, Bradley BA, Marsh JCV et al**

Growth of human umbilical cord blood in long term hematopoietic cultures.  
Lancet 1992; 340: 73-76

**24. Vaziri H, Dragowska, Allsop RC et al.**

Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age.  
Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 9857-60

**25. K K Ballen, M Wilson, J Wu et al.**

Bigger is better: maternal and neonatal predictors of hematopoietic potential of umbilical cord blood units  
Bone Marrow Transplantation 27, 7-14 (18 Jan 2001) Original Article

**26. Kögler G, Callejas J, Hakenberg P, Enczmann J, Adams O, et al.**

Hematopoietic Transplant Potential of Unrelated Cord Blood : critical issues  
J Hematother 1996; 5: 105-116

**27. Lazzari L, Corsinni C, Curioni C, Lecchi L, Scalamogna M, Rebulla P et al.**

The Milan Cord Blood Bank and the Italian Cord Blood Network  
J Hematother 1996; 5: 117-122

**28. Rubinstein P, Dobrila L, Rosenfield RE, et al.**

Processing and cryopreservation of placental /umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution.  
Proc.Natl.Aca.Sci USA 1995; 92: 10119-22

**29. Bertolini F, Lazzari L, Lauri E et al.**

A comparative study of different procedures for the collection and banking of umbilical cord blood .

J Hematother 1995; 4: 29-36

**30. Grisaru D, Deutsch V, Pick M, Fait G, Lessing JB, Dolberg S, et al.**

Placing the newborn on the maternal abdomen after delivery increases the volume and CD34+ cell content in the umbilical cord blood collected : an old maneuver with new applications.

Am J Obstet Gynecol 1999; 180: 1240-3

**31. Gluckman E, Rocha V, Chastang C.**

Cord blood banking and transplant in Europe. Eurocord.

Bone Marrow Transplant. 1998 Jul; 22 Suppl 1: S68-74.

**32. Gluckman E.**

Current status of umbilical cord blood hematopoietic stem cell transplantation.

Exp Hematol. 2000 Nov; 28 (11): 1197-205.

**33. Michel Raba and Gérard Souillet**

Greffe de sang de cordon: données actuelles et perspectives

Revue Française des Laboratoires, Volume 1998, Issue 307, November 1998, Pages 71-74

**34. Griffiths-Chu S, Patterson JA, Berger CL, Edelson RL, Chu AC.**

Characterisation of immature T cell subpopulations in neonatal blood.

Blood 1984; 64(1): 296-300

**35. Madrigal JA, Cohen SB, Gluckman E, Charron DJ.**

Does cord blood transplantation result in lower graft-versus-host disease? It takes more than two to tango.

Hum Immunol. 1997 Aug-Sep; 56(1-2): 1-5.

**36. Deeg HJ, Cottler-Fox M et al.**

Clinical spectrum and pathophysiology of acute graft-versus host disease.

In: Burakoff SJ, Deeg HJ et al. Graft versus host disease : Immunology, pathophysiology, and treatment, New York, Marcel Dekker Inc 1990: 311-336

**37. Gooley TA, Leisenring W, Crowley J, Storer BE.**

Estimation of failure probabilities in the presence of competing risks: new representation of old estimators. Statistics in Medicine 1999; 18:695-706.

**38. Fine JP, Gray RJ.** A proportional hazards model for subdistribution of a competing risk.

Journal of the American Statistical Association 1999; 94:496-509.

**39. Bob Gray (2004).** cmprsk: Subdistribution Analysis of Competing Risks. R package version 2.1-5. <http://www.r-project.org>, <http://biowww.dfci.harvard.edu/~gray>.

**40. R Development Core Team (2004).** R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>

**41. Moretta A, Maccario R, Fagioli F, Giraldi E, Busca A, Montagna D, Miniero R, Comoli P, Giorgiani G, Zecca M, Pagani S, Locatelli F.**

Analysis of immune reconstitution in children undergoing cord blood transplantation

Exp Hematol. 2001 Mar;29(3):371-9.

**42. Niehues T, Rocha V, Filipovich AH, Chan KW, Porcher R, Michel G, Ortega JJ, Wernet P, Gobel U, Gluckman E, Locatelli F.**

Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children a Eurocord analysis.

Br J Haematol. 2001 Jul;114(1):42-8.

**43. Gluckman E, Rocha V, Michel G, et al.**

Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: Guidelines for donor choice.  
Experimental Hematology 2004; 32: 397-407

**44. Talvensaaari K, Clave E, Douay C, Rabian C, Garderet L, Busson M, Garnier F, Douek D, Gluckman E, Charron D, Toubert A.**

A broad T-cell repertoire diversity and an efficient thymic function indicate a favorable long-term immune reconstitution after cord blood stem cell transplantation.  
Blood. 2002 Feb 15;99(4):1458-64.

**45. Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, Neijens HJ, Hop WCJ, Groeneveld K et al.**

Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood : Reference values for lymphocyte subpopulations.  
Journal of Pediatrics 1997; 130 (3).

**46. Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, Heilman D, Broxmeyer HE, Emanuel D, Kotylo P, Brahma Z, Smith FO.**

Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation  
Blood. 2000 Oct 15; 96 (8): 2703-11.

**47. Locatelli F, Maccario R, Comoli P, Bertolini F, Giorgiani G, Montagna D, Bonetti F, De Stefano P, Rondini G, Sirchia G, Severi F.**

Hematopoietic and immune recovery after transplantation of cord blood progenitor cells in children.  
Bone Marrow Transplant. 1996 Dec;18(6):1095-101.

**48. Locatelli F, Rocha V, Chastang C, Arcese W, Michel G, Abecasis M, Messina C, Ortega J, Badell-Serra I, Plouvier E, Souillet G, Jouet JP, Pasquini R, Ferreira E, Garnier F, Gluckman E.**

Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord-Cord Blood Transplant Group.  
Blood. 1999 Jun 1; 93 (11): 3662-71.

**49. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, Souillet G, Ferreira E, Laporte JP, Fernandez M, Chastang C.**

Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors.  
Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group.  
N Engl J Med. 1997 Aug 7; 337 (6): 373-81.

**50. Frassoni F, Podesta M, Maccario R, et al.**

Cord blood transplantation provides better reconstitution of hematopoietic reservoir compared with bone marrow transplantation.  
Blood 2003; 102: 1138-1141

**51. Giraud P, Thuret I, Reviron D, Chambost H, Brunet C, Novakovitch G, Farnarier C, Michel G.**

Immune reconstitution and outcome after unrelated cord blood transplantation: a single paediatric institution experience.  
Bone Marrow Transplant. 2000 Jan;25(1):53-7.