

# **Analyse des facteurs génétiques pouvant influencer la capacité de mobilisation des cellules souches hématopoïétiques : rôle du polymorphisme des gènes SDF1 et GNB3 et perspectives d'optimisation de la collecte de greffons sanguins**

## **Etude du groupe TTT de la SFTS**

**I Desbois<sup>1</sup>, S Lissandre<sup>2</sup>, H Watier<sup>2</sup>, L Benboubker<sup>2</sup>, B Hérault<sup>1</sup>, N Azar<sup>3</sup>, F Norol<sup>3</sup>, S Lesage<sup>4</sup>, JP Jouet<sup>5</sup>, F Boulanger<sup>6</sup>, N Ifrah<sup>7</sup>, N Piard<sup>8</sup>, B Drenou<sup>9</sup>, C Le Berre<sup>10</sup>, , F Lefrere<sup>11</sup>, F Audat<sup>11</sup>, JM Boiron<sup>12</sup>, B Dazey<sup>12</sup>, P Turlure<sup>13</sup>, JL Deprade<sup>13</sup>, J Domenech<sup>2</sup>**  
**CRB Touraine**

1- EFS Centre Atlantique; 2 - CHU de TOURS ; 3 - CHU La Pitié Salpêtrière ; 4 - CHU Saint Antoine ; 5 - CHU Lille ; 6 - EFS Nord de France ; 7 - CHU Angers ; 8 - EFS Pays de la Loire ; 9 - CHU Rennes ; 10 - EFS Bretagne ; 11 - CHU Necker ; 12 EFS Aquitaine Limousin ; 13 - CHU Limoges

*Financements ART et ARC*

# CSH sanguines et mobilisation

---

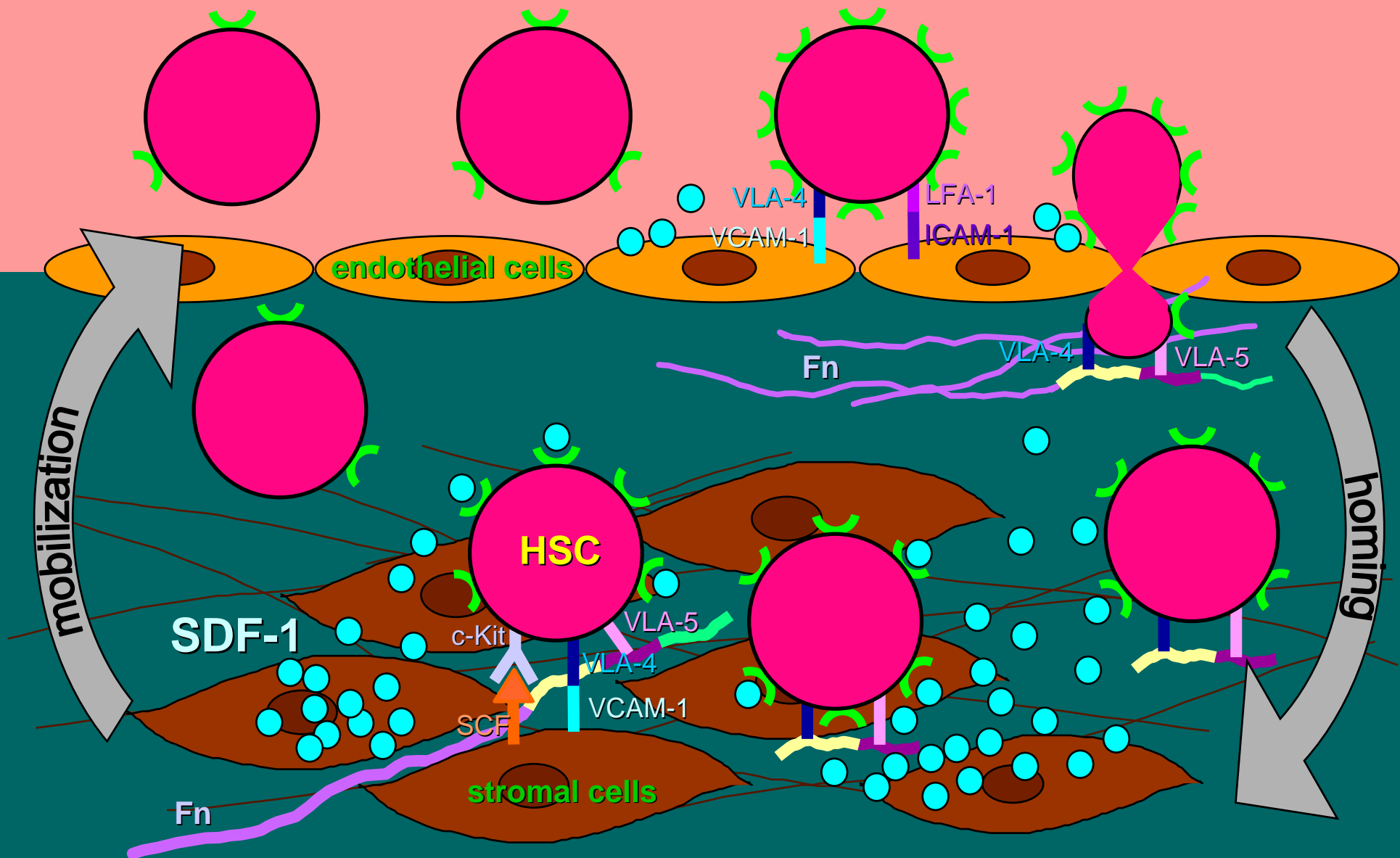
- ◆ CSH sanguines majoritairement utilisées lors des traitements anti-tumoraux intensifs
- ◆ Pour collecter les greffons  $\Rightarrow$  mobilisation nécessaire (facteurs de croissance  $\pm$  CT)
- ◆ Facteurs connus influençant la mobilisation des CSH  $\Rightarrow$  age, pathologie, stade maladie, CT antérieures, protocole de mobilisation
- ◆ Echecs de mobilisation inexplicables chez certains patients (~10 %)

# Mécanismes de mobilisation des CSH

---

- ◆ **Mécanismes de mobilisation des CSH mal connus :**
  - ↓ adhérence des CSH au microenvironnement médullaire
  - par ↓ de l'expression et/ou la fonction des intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 2$
  - par dégradation de la MEC : rôle des protéases (?)
  - rôle des chimiokines (?)
- ◆ **Chez la souris, la mobilisation des CSH pourrait dépendre au moins partiellement de facteurs génétiques**  
*(Roberts, Blood 1997; Hasegawa, Blood 2000)*
- ◆ **Chez l'homme, facteur génétique jamais démontré**

# HSC trafficking and microenvironment



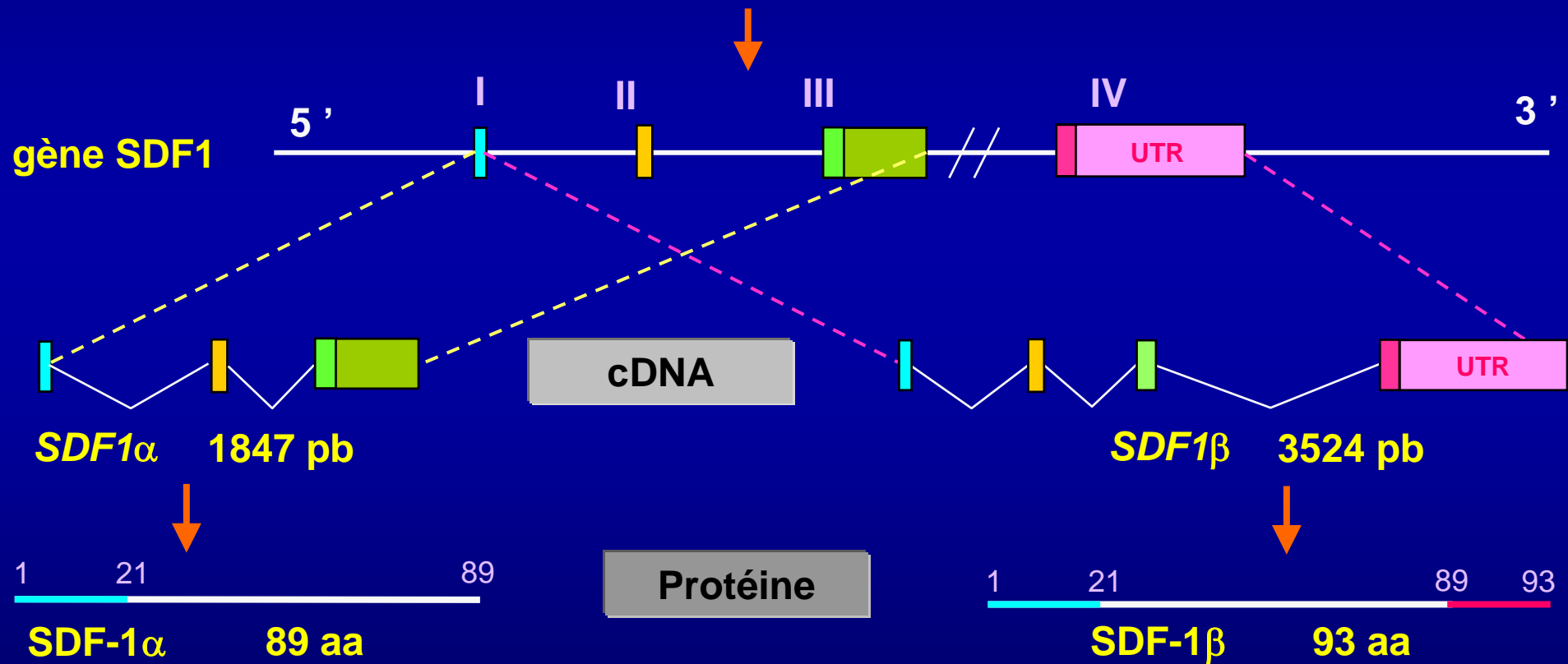
# La chimiokine SDF-1

---

- ◆ Chimiokine SDF-1 (ou CXCL12) a été isolée à partir de cellules stromales médullaires  
*(Tashiro, Science 1993; Nagasawa, PNAS 1994; Shirozu, Genomics 1995)*
- ◆ Appartient à la famille des CXC chimiokines sans motif ELR  
(sans activité sur les PNN)
- ◆ Structure SDF-1 particulièrement conservée au cours de l'évolution  
(seulement 1 AA différent entre homme et souris)
- ◆ Un récepteur unique CXCR-4 (LESTR/ fusine) qui a pour seul ligand SDF-1 *(Bleul, Nature 1996; Oberlin, Nature 1996)*

# Structure et localisation chromosomique du gène SDF1

Chromosome 10 q11.1



Shirozu, Genomics 1995

# Polymorphisme du gène *SDF1* et infection par VIH

---

- ◆ **Polymorphisme dans gène *SDF1*** (*Winkler, Science 1998*) :
  - Substitution **G → A** en 3'UTR (position 801)
  - Fréquence de l'allèle 3'A :  
caucasiens 21% ; Américains d'origine africaine 6%
- ◆ **Chez patients infectés par VIH si génotype 3'A/3'A**
  - ↓ **progression vers SIDA** (*Winkler, Science 1998*)  
⇒ résistance naturelle aux souches de VIH à tropisme T
- ◆ **Base moléculaire de cette résistance inconnue :**
  - **Génotype 3'A/3'A associé à ↑ production de SDF-1 (?)**  
⇒ down-regulation du co-récepteur CXCR-4 pour infection VIH (?)

# ETUDE PRELIMINAIRE

---

**Benboubker et al. Br J Haematol, 2001, 113:  
247-250**

Etude du rôle du polymorphisme du gène *SDF1*  
sur la capacité de mobilisation des CSH  
sous l'action du G-CSF ou du GM-CSF



# PATIENTS

---

- ◆ 63 patients inclus dans un programme d'autogreffe de CSH pour hémopathie lymphoïde ou cancer
- ◆ Age médian : 48 ans (18-63 ans)
- ◆ Procédure de mobilisation incluant l'injection de G-CSF ou GM-CSF
- ◆ 100 témoins

# MÉTHODES

---

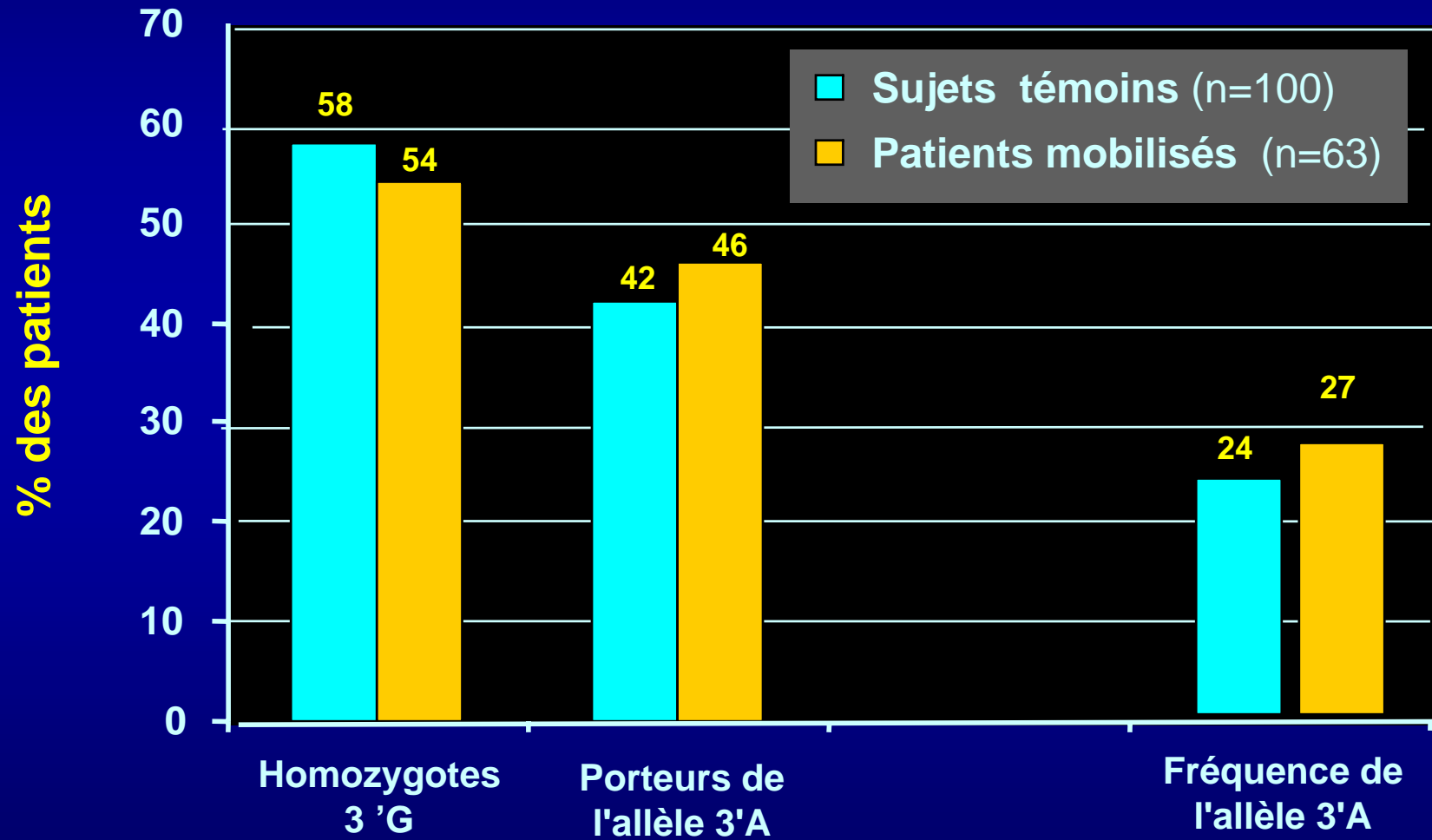
- ◆ Numération des cellules CD34+ circulantes
  - Au moment de la mobilisation avant la cytophérèse programmée
  - Ac anti-CD34-PE (HPCA-2, Becton-Dickinson)
- ◆ Génotypage SDF1
  - extraction de l'ADN (Qiagen)
  - amplification de la région 3'UTR du gène *SDF1*
  - digestion par l'enzyme de restriction *MspI*

# Collecte des CSH

## CD34<sup>+</sup> circulantes (n=57)

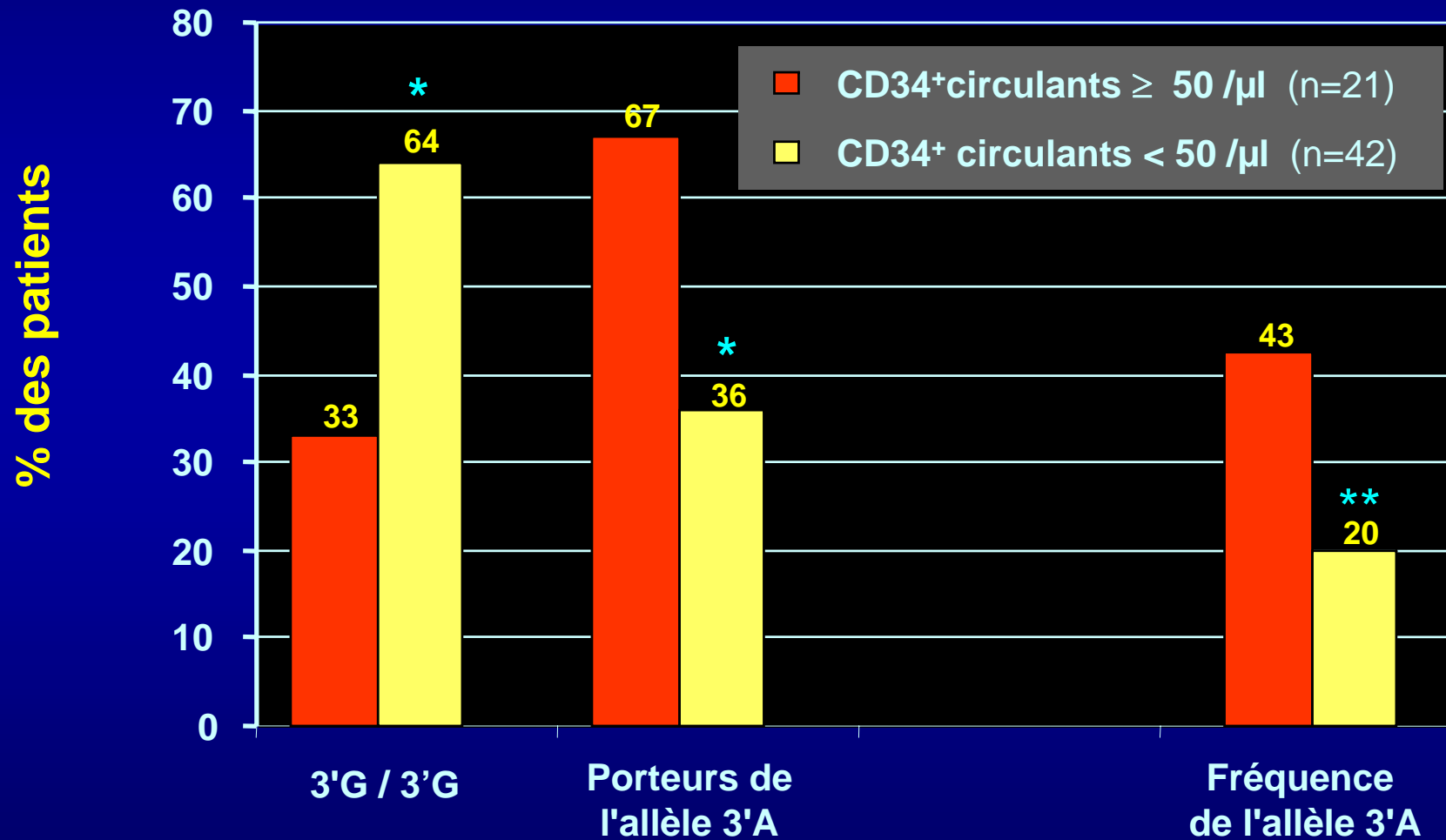
Médiane (extrêmes)	< 50/ $\mu$ L (n=36)	$\geq$ 50/ $\mu$ L (n=21)	p
CD34 <sup>+</sup> / $\mu$ L de sang	12 (0.3 – 49)	104 (54 – 381)	< 0.0001
Nombre de cytophèreses	2 (1 – 4)	1 (1 - 2)	0.0001
cellules CD34 <sup>+</sup> x 10 <sup>6</sup> / kg	2.2 (0.4 – 7.6)	5.5 (2.7 – 25.5)	< 0.0001
CFU-GM x 10 <sup>5</sup> / kg	1.8 (0.1 – 19.4)	11.4 (2.6 - 32.4)	< 0.0001
CFC x 10 <sup>5</sup> / kg	6.7 (0.5 – 47.7)	22.2 (5.7 – 50.1)	0.0002

## Génotype SDF1



# Génotype SDF1

des 63 patients mobilisés



# CONCLUSIONS

---

- ◆ Forte **association** entre présence de l'allèle *SDF1-3'A* et capacité accrue à mobiliser les cellules CD34+ dans le sang
- ◆ Pour la 1<sup>ère</sup> fois chez l'homme, mise en évidence d'un **facteur génétique** pour la mobilisation des CSH
- ◆ Possible implication de la chimiokine SDF-1 dans le processus de **mobilisation** des CSH

# Protocole multicentrique

## objectifs de l'étude

---

- ◆ Confirmer les résultats sur une cohorte de sujets plus importante (250)
- ◆ Mieux discriminer les les sujets répondeurs (**CD34 > 2 10<sup>6</sup>/kg**)
- ◆ Confirmer ce facteur génétique chez les donneurs sains
- ◆ critères d'inclusion :
  - patients porteurs de **lymphomes, myélomes, cancer du sein** pour lesquels un recueil de CSH périphériques est programmé
  - donneurs allogéniques de CSP

# Critères de sélection

---

## ◆ Donneurs et patients:

- adultes âgés de plus de 18 ans
- **donneurs d'allogreffe :**
  - répondant aux critères de sélection habituels
  - mobilisés par 4 jours minimum de facteurs de croissance
- **patients**
  - LMNH, myélomes, cancers du sein avec autogreffe de CSH sanguines
  - mobilisation par FC et/ou chimiothérapie



# Effectif

---

- ◆ **Au minimum 125 patients et 125 donneurs**
- ◆ si possible inclure plus pour pouvoir faire ensuite des stratifications en fonction:
  - du diagnostic
  - de la richesse du greffon,
  - .....

# Examens réalisés dans chaque centre

---

- ◆ Numération des cellules CD 34 :
  - sang circulant
  - produit de cytophérèse
- ◆ co expression du CX CR4 par les cellules CD34 +
- ◆ cultures de progéniteurs selon habitudes de chaque centre

# Examens centralisés à Tours stockage au CRB Touraine

---

- ◆ **Dosage des protéines (sur plasma) par technique ELISA :**
  - SDF-1
  - IL- 8
  - MIP-1 $\alpha$
  - MMP-9
  
- ◆ **génotypage SDF1, GNB3**
  - SDF 1
  - GN B3

# Calendrier

---

- ◆ Dossier CCPPRB mars 2002
- ◆ Janvier 2003 : dépôt de dossier pour information ministère de la recherche et AFSSAPS
- ◆ Avis du CPPRB favorable mars 2003
- ◆ Démarrage étude avril 2003
- ◆ Fin de l'étude (prolongation 6 mois ) décembre 2004
- ◆ Analyses statistiques (Mann et Whitney)

# Résultats préliminaires

---

- ◆ **14 centres inclus : 9 actifs**
- ◆ **Au total, 183 sujets ont été inclus dans l'étude**
  - **167** ont eu un prélèvement interprétable d'ADN et/ou de plasma sanguin :
    - **40 donneurs sains,**
    - **127 patients**
      - 77 LMNH,
      - 13 maladies de Hodgkin,
      - 30 myélomes,
      - 7 tumeurs solides.

# Résultats préliminaires

## ◆ 127 patients inclus

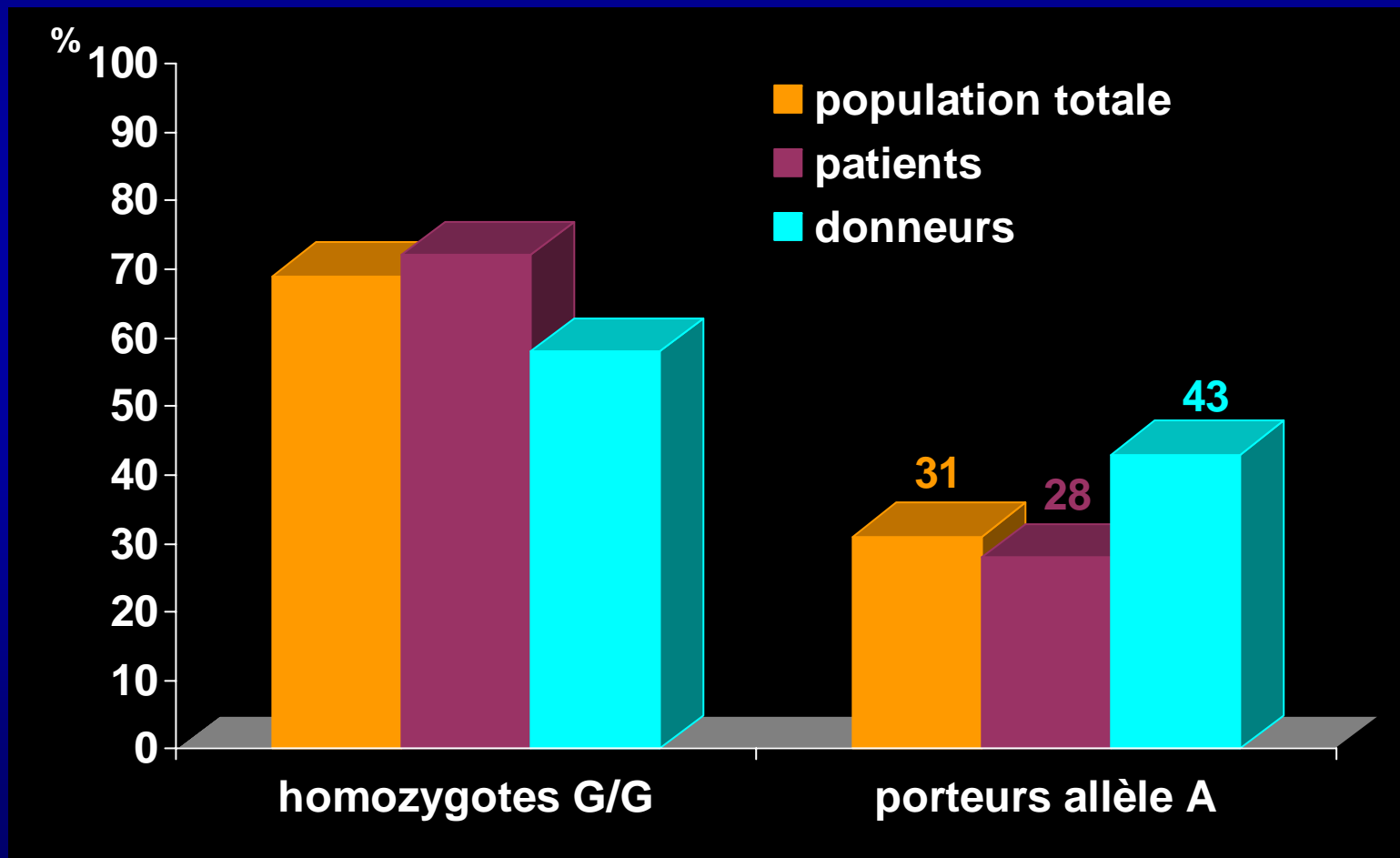
	<b>Moyenne</b>	<b>Médiane (extrêmes)</b>
âge	<b>49,6</b>	<b>51 (19 – 67)</b>
Nbe de cures de cyta avant	<b>4</b>	<b>4 (0 – 15)</b>
Nbe de cytas	<b>1,3</b>	<b>1 (0 – 4)</b>
% CD34 circulants	<b>0,5</b>	<b>0,5 (0 – 1,67)</b>
CD34 ( $10^6$ /kg) 1 <sup>ère</sup> Cyta	<b>4,72</b>	<b>1 (0 – 30)</b>
CD34 totales collectées( $10^6$ /kg)	<b>7,05</b>	<b>7 (0 – 30)</b>
CFU totales collectées( $10^4$ /kg)	<b>78</b>	<b>70 (0 – 247)</b>

# Résultats préliminaires

◆ 40 donneurs inclus

	Moyenne	Médiane (extrêmes)
âge	48	48,5 (33 – 70)
Nbe de cytas	1,1	1 (1 – 2)
% CD34 circulants	0,17	0,14 (0,05 – 0,51)
CD34 ( $10^6$ /kg) 1 <sup>ère</sup> cyta	6,28	5,13 (1,61 – 14)
CD34 totales collectées ( $10^6$ /kg)	7,4	5,9 ( 2,6 – 21, 8)
CFU totales collectées ( $10^4$ /kg)	87	65 (17 – 308)

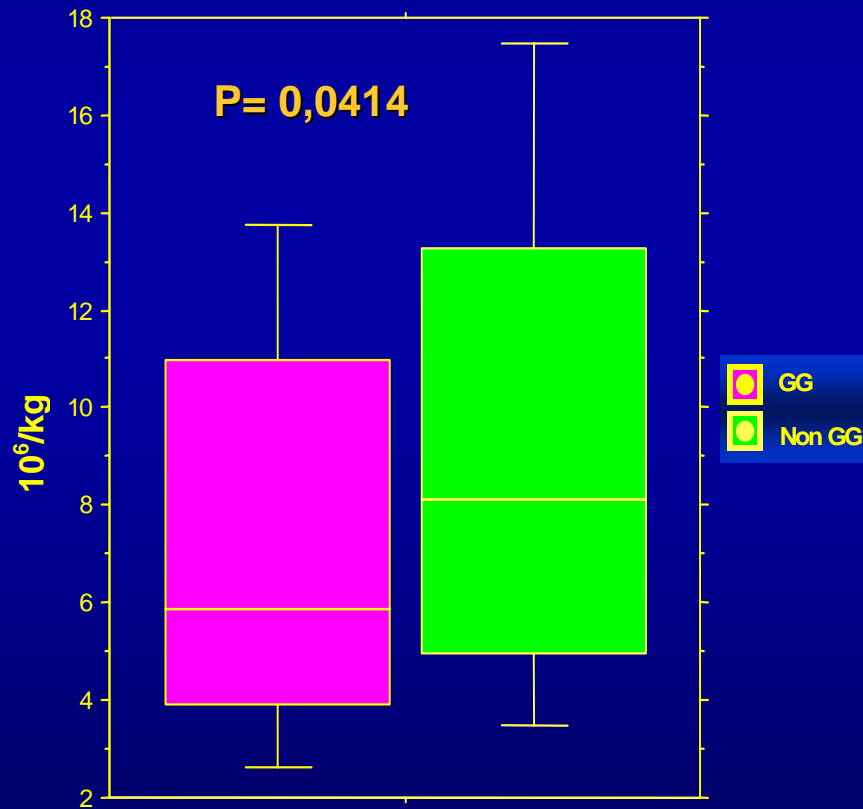
# Résultats : fréquence des génotypes



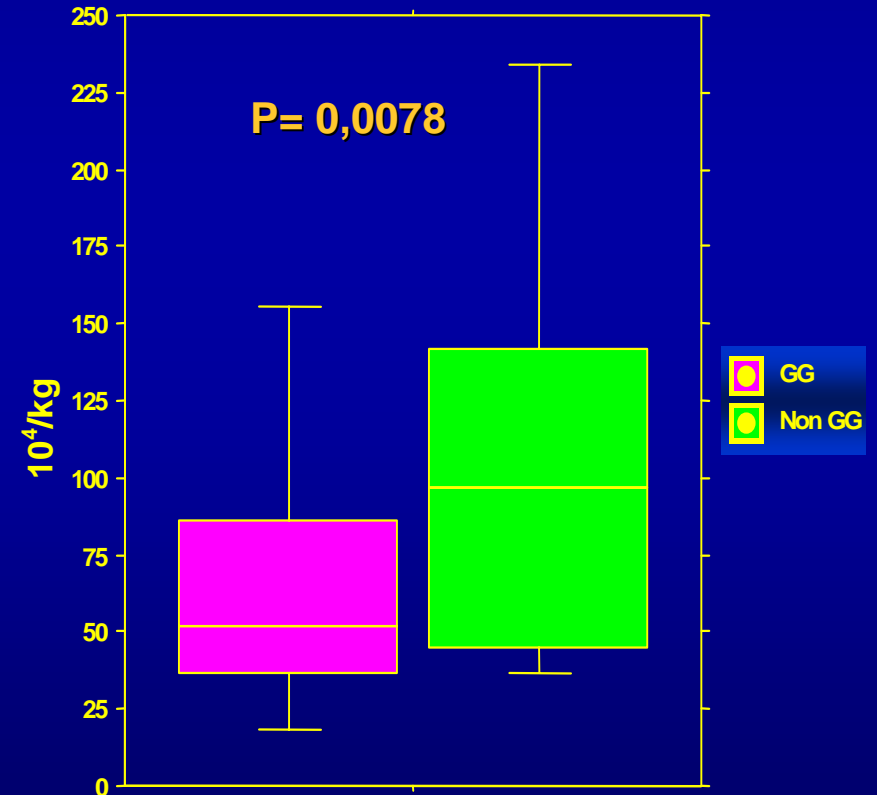


# Résultats : population des patients

PATIENTS : CD34 collectées / kg

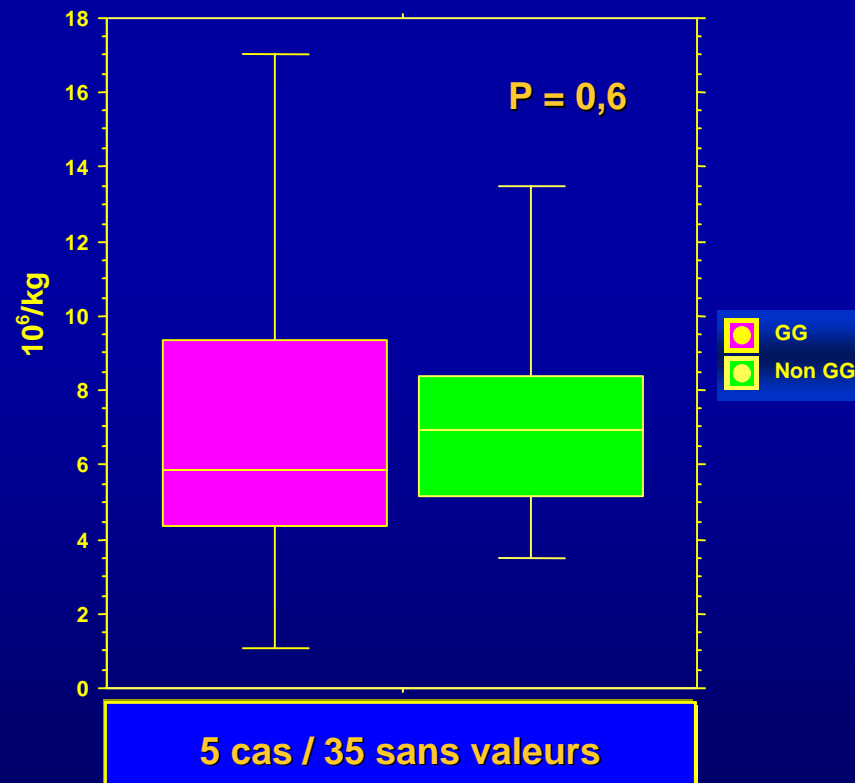


PATIENTS : CFU totales collectées / kg

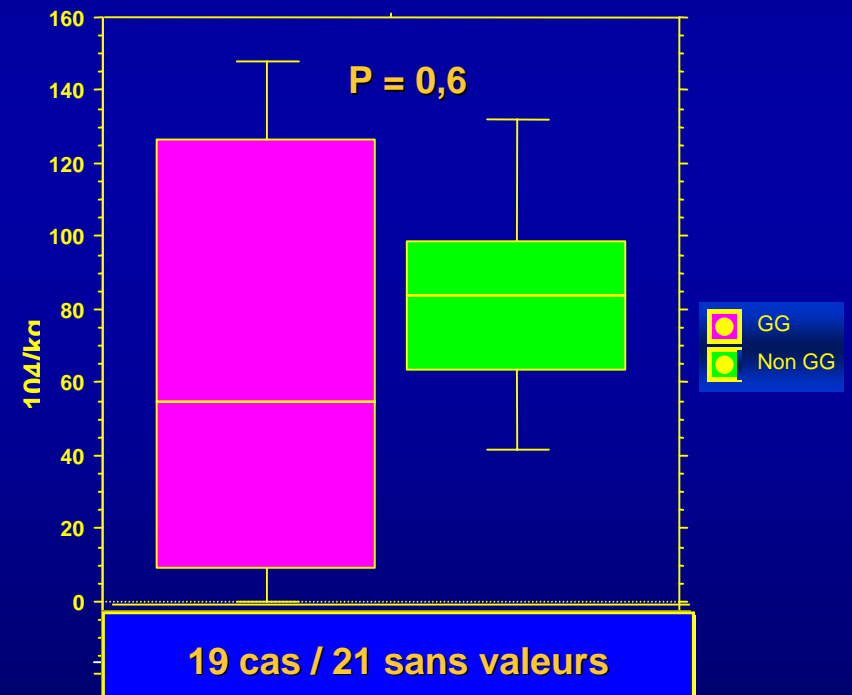


# Résultats: Donneurs

DONNEURS : CD34 totales collectées / kg



DONNEURS : CFU totales collectées



## CONCLUSIONS

- ◆ Influence de l'allèle A retrouvée dans la catégorie des patients
- ◆ Influence de l'allèle A non retrouvée dans la population des donneurs : effectif trop faible
- ◆ Homozygotes A/A : effectif trop faible
- ◆ comparaison polymorphisme GNB 3 et SDF1

### OBJECTIF :

- ◆ corriger certaines données
- ◆ récupérer les données manquantes
- ◆ analyse des taux plasmatiques SDF1, MMP9
- ◆ augmenter l'effectif des donneurs ???

# Collaborations

## CHU ANGERS

Norbert IFRAH  
Nicole PIARD

## CHU BORDEAUX

Jean Michel BOIRON  
Bernard DAZEY

## CHU COCHIN

Farhad HESMATI  
Marie Catherine QUARRE

## CHU LILLE

Jean Pierre JOUET  
Florence VILLARD

## CHU LIMOGES

Dr TURLURE  
Jean Luc DEPRADE

## CHU Pitié-Salpêtrière-PARIS

Nabih AZAR  
Françoise NOROL

## CHU RENNES

Bernard DRENOU  
Claudine LE BERRE

## CHU Saint-Antoine-PARIS

Sylvie LESAGE  
Anne LEON

## CHU TOURS

Centre de santé EFS  
Béatrice HERAULT

laboratoire d'immunologie  
Hervé WATIER

laboratoire d'hématologie  
Jorge DOMENECH

service d'oncologie médicale  
Séverine LISSANDRE

## CRB Touraine

Cécile BRUNEAU

## FINANCEMENTS

ARC

ART