Évaluation du procédé de mise en banque d'unités de sang placentaire à usage thérapeutique au sein de la banque EFS Rhône-Alpes, site de Saint-Ismier

Anaïck Moisan

▶ **To cite this version:**

Anaïck Moisan. Évaluation du procédé de mise en banque d'unités de sang placentaire à usage thérapeutique au sein de la banque EFS Rhône-Alpes, site de Saint-Ismier. Sciences pharmaceutiques. 2010. dumas-01021639

HAL Id: dumas-01021639

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01021639

Submitted on 9 Jul 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Joseph Fourier
GRENOBLE
PHARMACIE

SICD1
Bibliothèques
de l'UJF et de Grenoble INP

AVERTISSEMENT

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

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

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

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

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ JOSEPH FOURIER

FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2010 **N°**

ÉVALUATION DU PROCÉDÉ DE MISE EN BANQUE D'UNITÉS DE SANG PLACENTAIRE À USAGE THÉRAPEUTIQUE AU SEIN DE LA BANQUE EFS RHÔNE-ALPES – SITE DE SAINT ISMIER

THÈSE PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN PHARMACIE

DIPLÔME D'ÉTAT

M^lle^ Anaïck MOISAN

Née le 14 mai 1982 À Cormeilles en Parisis

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT A LA FACULTÉ DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Le 30 novembre 2010

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury : Dr. Benoît ALLENET

Membres : Dr. Nicole COUDURIER

Dr. Frédéric GARBAN

Dr. Walid RACHIDI

Dr. Marie-Jeanne RICHARD, Directrice de thèse

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UFR
DE PHARMACIE
DE GRENOBLE

UNIVERSITE
JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ.

GRENOBLE 1

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice –Doyen et Directeur des Etudes : Mme **Edwige NICOLLE**

Année 2009-2010

MAITRES DE CONFERENCES DE PHARMACIE (n = 32)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie - Mycologie (L.A.P.M)
ALLENET	Benoît	Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / MCU-PH)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B - LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (U.V.H.C.I)
CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A.)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S.)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M.)
GERMI	Raphaële	Microbiologie (U.V.H.C.I. / MCU-PH)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M.)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie –Pharmacologie (HP2)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M.)
MELO DE LIMA	Christelle	Probabilités Biostatistiques (LE.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Organique (D.P.M.)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M)
PINEL	Claudine	Parasitologie - Mycologie Médicale (CIB / MCU-PH)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M.)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M.)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie organique (D.P.M.)
VILLET	Annick	Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M.)

ENSEIGNANTS ANGLAIS (N = 3)

COLLE Pierre Emmanuel	Maître de Conférence
FITE Andrée	Professeur Certifié
GOUBIER Laurence	Professeur Certifié

ATER (N = 5)

ATER	**ELAZZOUZI** Samira	Pharmacie Galénique
ATER	**SHEIKH HASSAN** Amhed	Pharmacie Galénique
ATER	**MAS** Marie	Anglais Master ISM
ATER	**ROSSI** Caroline	Anglais Master ISM
ATER	**SAPIN** Emilie	Physiologie Pharmacologie

ATER : Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherches
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogenèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogenèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

UFR
DE PHARMACIE
DE GRENOBLE

UNIVERSITE
JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Domaine de la Merci 38700 LA TRONCHE

Doyen de la Faculté : Mme le Professeur **Renée GRILLOT**
Vice –Doyen et Directeur des Etudes : Mme **Edwige NICOLLE**

Année 2009-2010

PROFESSEURS A L'UFR DE PHARMACIE (N=17)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (LR)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wilhelm	Physique (U.V.H.C.I)
CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (GREPI – TIMC)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2 / PU-PH)
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
GRILLOT	Renée	Parasitologie - Mycologie Médicale (Directeur UFR / LAPM, PU-PH)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (Therex, TIMC)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
SEVE	Michel	Biochimie - Biotechnologie (IAB, PU-PH)
RIBUOT	Christophe	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
ROUSSEL	Anne-Marie	Biochimie Nutrition (L.B.F.A)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

UFR
DE PHARMACIE
DE GRENOBLE

UNIVERSITE
JOSEPH FOURIER
SCIENCES.TECHNOLOGIE.SANTÉ.

GRENOBLE 1

PROFESSEUR EMERITE (N=1)

FAVIER	Alain

PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (N=2)

RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché - CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier - CHU)

PROFESSEUR AGREGE (PRAG) (N=1)

GAUCHARD	Pierre Alexis	Chimie (D.P.M.)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot
LBFA : Laboratoire de Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
PAST : Professeur Associé à Temps Partiel
PRAG : Professeur Agrégé
UVHCI: Unit of Virus Host Cell Interactions

Mise à jour le 03/09/2009

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord remercier les membres de mon jury :

Monsieur le Docteur Benoît ALLENET,

Tu as accepté de juger mon travail et tu me fais l'honneur de présider ce jury de thèse. Je t'en remercie sincèrement. Je te remercie également pour l'encadrement pédagogique et les conseils que tu nous as apportés tout au long de notre internat.

Madame le Docteur Marie Jeanne RICHARD,

Qui a su me transmettre sa passion de la thérapie cellulaire et me guider dans les méandres de la cellule souche…. Merci de m'avoir proposé ce travail et merci pour ton soutien et pour le temps que tu m'as consacré pendant sa réalisation. C'est avec beaucoup de plaisir que j'ai travaillé avec toi et suivi tes précieux conseils.

Madame le Docteur Nicole COUDURIER,

Vous me faites le plaisir de participer à ce jury et je tiens à vous remercier d'avoir accepté de juger ce travail.

Monsieur le Docteur Frédéric GARBAN,

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Je tiens à vous remercier également pour m'avoir fait part de vos connaissances sur l'hématologie, la greffe de cellules souches hématopoïétiques et de votre expérience clinique lors de mon passage dans votre service. Cela m'a permis de comprendre le vécu des patients, d'apprécier l'importance d'une telle thérapie et de me guider dans mes choix professionnels.

Monsieur le Docteur Walid RACHIDI,

Tu as accepté de juger mon travail avec ton regard d'enseignant chercheur, je t'en remercie sincèrement. Je n'ai pas eu la chance de bénéficier de ton enseignement lors de mes études mais j'ai pu en apprécier la qualité au travers de mon interaction avec les étudiants. J'ai beaucoup apprécié de débuter mon activité d'enseignement à tes côtés et je te remercie de la confiance que tu m'accordes dans ce domaine.

J'aimerai également remercier l'ensemble des personnes ayant participé, de prés ou de loin, à ce travail :

L'ensemble de l'équipe de l'Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire

un grand merci aux techniciens, Amélie, Charles, Danielle, Lise-Reine, Marie-Claire et Sonia pour leur aide dans la réalisation de ce travail, pour leur accueil chaleureux et leur bonne humeur. Merci infiniment à Harald et Virginie qui m'ont toujours accordé de leur temps quand j'en avais besoin et sans qui ce travail n'aurait pu aboutir, c'est un réel plaisir de travailler à vos côtés.

Toute l'équipe de l'UM « Biochimie des Cancers et Biothérapie » *et plus particulièrement,*

un grand merci à Florence, Corinne et Valérie pour votre bonne humeur, votre accueil amical et les connaissances que vous m'avez apportées au cours de ce travail. C'est avec grand plaisir que nous poursuivrons, je l'espère, notre collaboration sur les projets en cours et ceux à venir.

Ma famille,

Voyez dans ce travail l'achèvement de mes longues années d'études. Ca n'a pas toujours été facile et malgré la distance au cours de ces dernières années, vous avez toujours été présents …merci pour votre soutien irremplaçable et pour tout ce que vous m'avez apporté depuis 28 ans.

Stéphane,

Merci pour ton soutien dans les moments difficiles, pour tout ce que nous avons déjà partagé et tout ce qui nous attend...

Mes alliés dans l'univers de la recherche, *Alexia, Frank, Margot et les deux Nicolas qui me supportent depuis plus d'un an dans la pièce R070. Merci pour les bons moments passés ensemble dans cette ambiance tropicale. Merci à Audrey pour son soutien amical. Merci à Chantal, Manu et Olivier.*

Tous mes amis, *pour leur précieuse présence...*

Nassira, Mehdi, Hélène, Clara et Lionel. Sans vos étonnantes personnalités, ces quatre années d'internat n'auraient pas été ce qu'elles ont été….Merci pour tous les bons moments que nous avons partagés.

Laurianne, Baptiste, July et Benjamin. Où que vous soyez, je peux toujours compter sur vous....

Mes collègues internes, *pour les chaleureux moments partagés ensemble.*

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 13
RAPPEL HISTORIQUE ET BIBLIOGRAPHIE 16
1. Le sang de cordon ombilical 16
1.1. Définition 16
1.2. Cellules souches issues du sang de cordon ombilical 17
1.2.1. Les cellules souches embryonnaires du sang de cordon 17
1.2.2. Les cellules souches mésenchymateuses 18
1.2.3. Les progéniteurs endothéliaux circulants 21
1.3. Autres cellules du sang de cordon 22
1.3.1. Les lymphocytes T régulateurs 22
1.3.2. Les cellules mononuclées 23
2. L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) 23
2.1. Les différentes sources de CSH 23
2.1.1. CSH médullaires et du sang périphérique 24
2.1.2. CSH du sang placentaire ou unités de sang placentaire (USP) 26
2.2. Avantages des CSH du sang placentaire 29
2.3. Inconvénients des CSH du sang placentaire 30
2.4. Historique des allogreffes d'USP 31
2.4.1. Allogreffes apparentées 31
2.4.2. Cryoconservation et allogreffes non apparentées 32
2.5. Indications des allogreffes d'USP 32
3. Avancées dans l'allogreffe d'USP 38
3.1. Double allogreffe d'USP 38
3.2. Conditionnements d'allogreffe 39
3.2.1. Conditionnement myéloablatif 39
3.2.2. Conditionnement non myéloablatif 40
3.3. Expansion ex vivo des CSH 40
3.4. Co-transplantation CSM/CSH 42
3.5. Administration intra-osseuse des CSH 43
4. Banques de sang de cordon 44
4.1. Historique et loi de bioéthique 44
4.2. Réseaux de banques d'USP 46
4.3. Quelles spécifications pour les USP ? 50
4.3.1. Spécifications à réception 51
4.3.2. Spécifications pour une entrée en production 51
4.3.3. Spécifications en cours de procédé 52
4.3.4. Spécifications de conservation en quarantaine 52
4.3.5. Critères libératoires 53
4.3.6. Spécifications lors de la cession 54

MATÉRIELS ET MÉTHODES 56
1. Critères cliniques et biologiques 56
1.1. Critères cliniques 56
1.2. Critères biologiques 56
2. Qualité du prélèvement 57
2.1. Spécifications attendues 57
2.2. Contrôle qualité du produit entrant et du produit fini 58
3. Méthodes de transformation 59
3.1. Étape de réduction de volume 59
3.2. Étape de congélation 60
3.3. Validation du procédé de congélation 62
3. Analyse statistique 63
RÉSULTATS 65
1. Impact des critères cliniques et biologiques dans les étapes de prélèvement/conservation 65
1.1. Causes de non prélèvement de sang placentaire 65
1.2. Causes d'élimination des USP au cours du procédé 66
1.3. Sécurisation (J60) et conservation des USP 66
2. Évaluation de la qualité du produit entrant 67
2.1. Qualité cellulaire 67
2.2. Délai d'acheminement 70
3. Évaluation de la qualité cellulaire du produit fini 71
3.1. Validation de l'étape de réduction de volume 71
3.2. Validation de l'étape de congélation 73
3.3. Évaluation du procédé de congélation 73
3.4. Évaluation du mini-échantillon comme matériel pilote pour l'ultime contrôle 74
3.5. Caractéristiques des USP cryoconservées 76
DISCUSSION 78
CONCLUSION 88
BIBLIOGRAPHIE 90
ANNEXES 103

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I. Algorithme de choix d'une USP selon le nombre de disparités HLA, la dose cellulaire et le diagnostic 37

Tableau II. Causes de non éligibilité/exclusion au don de sang placentaire 65

Tableau III. Exclusion des USP sur critères cliniques et biologiques au cours du procédé 66

Tableau IV. Causes de mise en quarantaine des USP conformes 67

Tableau V. Causes de destruction des USP à réception 68

Tableau VI. Délais d'acheminement des USP répartis selon leur devenir 70

Tableau VII. Résultats des tests de transfert de technologie du procédé de miniaturisation 71

Tableau VIII. Résultats du contrôle de routine du procédé de miniaturisation des USP congelées entre le 1er janvier 2009 et le 1er juillet 2010 71

Tableau IX. Causes de destruction des USP après l'étape de miniaturisation. 72

Tableau X. Contrôles qualité réalisés sur la suspension cellulaire contenue dans la poche avant congélation et après décongélation 73

Tableau XI. Contrôles qualité réalisés sur la suspension cellulaire contenue dans la poche et dans le mini-échantillon après décongélation 75

Tableau XII. Résumé du devenir des 554 USP prélevées entre le 1er janvier 2009 et le 1er juillet 2010 77

LISTE DES FIGURES

Figure 1. A) Cordon ombilical constitué d'une veine et de deux artères entourées d'un tissu mésodermique appelé « gelée de Wharton »; B) Prélèvement de sang de cordon ombilical par ponction de la veine ombilicale 16

Figure 2. Cord Blood derived embryonic stem cells 17

Figure 3. Cellules souches mésenchymateuses issues de sang de cordon ombilical 18

Figure 4. Colonie de progéniteurs endothéliaux 21

Figure 5. Cellules souches hématopoïétiques isolées de sang de cordon ombilical 26

Figure 6. Localisation du processus d'hématopoïèse au cours du développement embryonnaire .27

Figure 7. Différentiation cellulaire à partir d'une cellule souche hématopoïétique au cours du processus d'hématopoïèse 27

Figure 8. Comparaison des caractéristiques fonctionnelles des CSH issues du sang de cordon et de la MO 29

Figure 9. Probabilités de sortie d'aplasie (A) polynucléaires neutrophiles et (B) plaquettes, selon la source de CSH. 31

Figure 10. Répartition du nombre d'allogreffe de CSH (%) selon l'indication, en France, en 2008 (CSH médullaires et USP).....34

Figure 11. Processus de recherche d'un donneur non apparenté pour allogreffe de CSH 35

Figure 12. Nombre de greffes de CSH réparti par source cellulaire en France (1995-2008).....35

Figure 13. Principales étapes du procédé de mise en banque d'une unité de sang placentaire. 47

Figure 14. Carte du Réseau Français du Sang Placentaire (RFSP) 49

Figure 15. Distribution continentale des banques allogéniques d'USP au 1er janvier 2009.....49

Figure 16. Du prélèvement à l'inscription au registre des donneurs de MO France Greffe de Moelle: les étapes de traitement d'une unité de sang placentaire au sein d'une banque 50

Figure 17. Critères de qualification nécessaires à la validation et libératoires pour l'inscription d'une USP sur le registre FGM 55

Figure 18. Miniaturisation par le système Sepax 59

Figure 19. Congélation d'USP 61

Figure 20. USP miniaturisée accompagnée de ses 3 mini-échantillons nécessaires à la réalisation de l'ultime contrôle qualité 62

Figure 21. Evolution du nombre d'USP prélevées entre le 1er janvier 2009 et le 1er juillet 2010.68

Figure 22. A) Répartition des USP réceptionnées par volume; B) Nombre d'USP prélevées et volume moyen de prélèvement par maternité préleveuse 69

Figure 23. Nombre et volumes (ml) des USP prélevées à l'HCE entre le 1er janvier 2009 et le 1er juillet 2010.....70

Figure 24. Courbe de descente en température validée au sein de l'UMTCT 73

Figure 25. Droites de corrélation entre A) le nombre de CNT et de cellules CD34+ avant congélation contenues dans les USP réceptionnées et congelées à la banque de Saint Ismier et B) le nombre de CNT avant congélation et le nombre de cellules CD34+ dans la poche après décongélation.....74

Figure 26. Droites de corrélation entre A) le nombre de CNT dans la poche et dans le mini-échantillon après décongélation; B) le nombre de cellules CD34+ dans la poche et dans le mini-échantillon après décongélation ; C) la viabilité totale ; D) la viabilité en cellules mononuclées dans la poche et dans le mini-échantillon après décongélation.....75

Figure 27. Répartition des USP congelées et conformes au 1er juillet 2010 selon le nombre de CNT et le nombre de cellules CD34+ 77

ABREVIATIONS, ACRONYMES

ABM : Agence de Biomédecine

AFSSAPS : Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé

CBEs : cellules souches embryonnaires du sang de cordon

CFU : colony forming unit (cellules formant des colonies)

CMN : cellules mononuclées

CNT : cellules nucléées totales

CSM : cellules souches mésenchymateuses

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CSP : cellules souches hématopoïétiques issues du sang périphérique

DMSO : dimethylsulfoxyde

EFS : Établissement Français du Sang

FACT : Foundation for the Accreditation in Cellular Therapy

FDA : Food and Drug Administration

FGM : France Greffe de Moelle

GVHD : graft *versus* host disease

GVL : réaction du greffon contre la leucémie (graft *versus* leukemia)

HLA : histocompatibility leucocyte antigen

IMDS : international marrow donor information system

LTreg : lymphocytes T régulateurs

MO : moelle osseuse

PEC : progéniteurs endothéliaux circulants

RFSP : Réseau Français du Sang Placentaire

SFGM-TC : Société Française de Greffe de Moelle et Thérapie Cellulaire

UMTCT : Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire

USP : unité de sang placentaire

WMDA : association mondiale des registres de donneurs de moelle osseuse

INTRODUCTION

Le sang de cordon ombilical contient plusieurs types de cellules souches qui présentent de nombreux avantages par rapport aux cellules souches adultes et embryonnaires. Ce sang de cordon est devenu porteur d'espoir en thérapie régénérative, domaine qui reste à ce jour au stade de la recherche clinique. Parmi ces cellules souches, il a été identifié il y a 30 ans, des cellules souches hématopoïétiques (CSH), identiques à celles isolées de la moelle osseuse. Ces CSH sont utilisées en routine clinique, pour leur capacité à restaurer les fonctions hématopoïétiques et/ou immunologiques.

La première greffe allogénique apparentée de CSH de sang de cordon a été réalisée en 1988 par Gluckman *et al*. (Gluckman *et al.*[40]). Aujourd'hui, en l'absence de donneur de moelle osseuse (MO) compatible, des allogreffes non apparentées sont proposées comme alternative aux allogreffes de CSH médullaires dans plusieurs indications : hémopathies malignes, aplasies médullaires, tumeurs solides, hémoglobinopathies ou maladies génétiques (Sullivan[129]). Dès les années 1970, ces cellules ont pu être cryoconservées (conservées sous forme congelée) en tant qu'unités de sang placentaire (USP), sans altération de leur fonctionnalité (Broxmeyer *et al.*[20] ; Rubinstein *et al.*[120]). Les USP sont alors apparues comme une source facile (prélèvement du sang de cordon ombilical à la naissance) et rapidement accessible pour le traitement d'un patient. Malgré un nombre de CSH limité (faible volume), les USP ont des avantages non négligeables par rapport aux CSH de la MO : un prélèvement sans risque pour la mère et l'enfant, un risque moindre d'alloréactivité délétère (GVHD) (Grewal *et al.*[48]), un accroissement de la diversité HLA sur les registres des donneurs de MO (Samuel *et al.*[122]) et enfin une mise à disposition immédiate du greffon. En 2005, des CSH de sang de cordon ombilical provenant de deux donneurs différents (double allogreffe d'USP) ont pu être greffées chez un même patient, ce qui a

permis d'élargir les indications aux adultes de poids supérieur à 50 kg. L'allogreffe d'USP s'est également étendue aux patients âgées et porteurs de comorbidités avec l'utilisation de conditionnements d'allogreffe non myéloablatifs (Ballen *et al.*[8] ; Barker *et al.*[13] ; Barker *et al.*[15]). Depuis 2006, les allogreffes d'USP ont ainsi dépassé le nombre d'allogreffes de MO, en France[151] , en Europe (Gratwohl *et al.*[47]) et au niveau international (Broxmeyer[157]). Pour répondre à ce besoin croissant d'USP à travers le monde, des banques de sang placentaire se sont développées.

En France, ces banques, autorisées par les autorités compétentes, sont regroupées sous le nom de « Réseau Français de Sang Placentaire » (RFSP) qui est piloté par l'agence de biomédecine (ABM). Elles doivent respecter les critères de qualité ou spécifications imposées par la réglementation française et déposer un dossier auprès de l'AFSSAPS. En effet, la prise de greffe (définie par le délai de sortie d'aplasie) et la survie après allogreffe d'USP sont fonction d'un certain nombre de facteurs : comptabilité HLA entre donneur et receveur, quantité de cellules nucléées totales (CNT), nombre et fonctionnalité des CSH (Migliaccio *et al.*[97] ; Prasad *et al.*[107] ; Rocha *et al.*[112] ; Goodwin *et al.*[45]). Les USP, doivent donc respecter des critères de qualité stricts, pour être inscrites sur le registre France Greffe de Moelle (FGM) de l'ABM et ainsi être disponibles pour tous patients nationaux ou internationaux. Ces exigences de qualité, nationales (bonnes pratiques, loi de bioéthique, recommandations du RFSP) ou internationales (WMDA, FACT) sont imposées tout au long du procédé conduisant à la mise en banque d'une USP: sélection des donneuses, prélèvement, réception, transformation (miniaturisation, congélation), contrôles biologiques et stockage. C'est pourquoi, afin de fournir des greffons de qualité, chaque banque doit valider, en interne, le procédé de conservation qu'elle utilise. L'objectif de ce travail a donc été d'évaluer le procédé de mise en banque des USP à usage thérapeutique utilisé au sein

de la banque de Saint Ismier (Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire (UMTCT), EFS Rhône Alpes/CHU de Grenoble) et de cibler les points d'amélioration à apporter en vue d'une demande d'accréditation internationale (FACT).

1. Le sang de cordon ombilical

1.1. Définition

Dans le mois précédent la naissance, le cordon ombilical achemine chaque jour vers le fœtus plus de 300 litres de sang puisant l'oxygène et les nutriments à travers le placenta. Ce cordon, attaché au placenta, est le lien vital entre le fœtus et sa mère. Il contient deux artères et une veine dans lesquelles circule le sang du cordon ombilical, encore appelé sang placentaire (Figure 1).

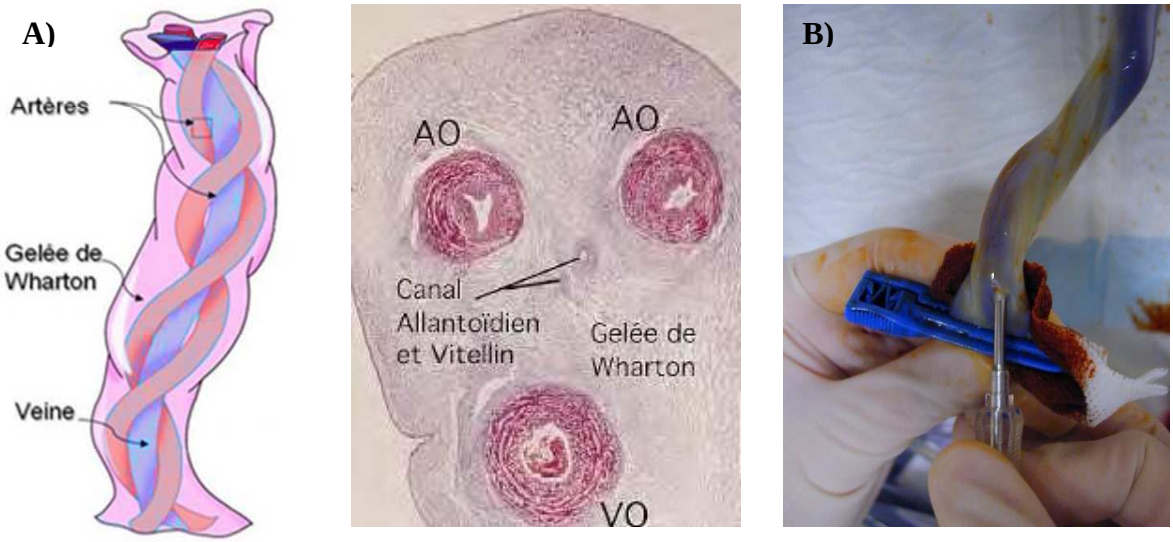


Figure 1. A) Cordon ombilical constitué d'une veine et de deux artères entourées d'un tissu mésodermique appelé « gelée de Wharton » (schéma et coupe histologique). VO : veine ombilicale, AO : artère ombilicale. **B)** Prélèvement de sang de cordon ombilical par ponction de la veine ombilicale.

Le prélèvement de sang de cordon ombilical est un don anonyme, bénévole et gratuit. Il est réalisé, uniquement dans les maternités conventionnées avec les banques de sang de cordon, par un personnel formé et entraîné afin d'obtenir des USP de bonne qualité. Il a lieu dans les minutes qui suivent l'accouchement, lorsque le cordon ombilical vient d'être coupé et que le placenta est encore dans l'utérus. Il est réalisé par ponction dans la veine ombilicale, juste

après le clampage du cordon, à l'aide d'une aiguille reliée à une poche de prélèvement (Figure 1). Le volume recueilli est en moyenne de 80 à 100 ml.

Ce sang de cordon contient de nombreuses cellules souches, c'est-à-dire des cellules capables de s'auto-renouveler et de se différentier en plusieurs types cellulaires. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH), sont les plus connues à ce jour, essentiellement pour leur utilisation thérapeutique dans les hémopathies malignes sous la forme d'allogreffe. La découverte de ce potentiel thérapeutique et les avancées dans ce domaine seront discutées dans les **§2 et 3**.

Plusieurs autres cellules souches composant, entre autre, le microenvironnement de la niche hématopoïétique ont par la suite été mises en évidence et étudiées pour leur intérêt thérapeutique. Le potentiel du sang de cordon ombilical est ainsi devenu porteur d'espoir en thérapie régénérative.

1.2. Cellules souches issues du sang de cordon ombilical

1.2.1. Les cellules souches embryonnaires du sang de cordon

1.2.1.1.Propriétés

L'existence de cellules souches embryonnaires dans le sang de cordon, appelées cord-blood derived embryonic-like stem cells (CBEs) reste à ce jour discutée. Une équipe les a mises en évidence dans le sang de cordon ombilical frais et congelé en 2005 (McGuckin *et al.*[95]). Ces cellules expriment des antigènes spécifiques aux cellules embryonnaires humaines (SSE-3 et SSE-4) ainsi que les facteurs de pluripotence Oct-4 et Nanog, responsables des capacités d'auto renouvellement et de l'absence de différentiation de ces cellules. Elles ont une forte capacité de croissance en culture et de différentiation en cellules des 3 feuillets embryonnaires (ectoderme, endoderme et mésoderme) : neurones, hépatocytes, cellules pancréatiques, ostéoblastes, adipocytes, cellules musculaires lisses ou

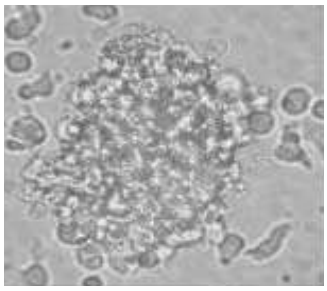


Figure 2. Cord Blood derived embryonic stem cells. (D'après McGuckin *et al.*[94])

cellules endothéliales (McGuckin *et al.*[94]). Cependant une seconde équipe a récemment démenti le caractère "embryonnaire" de ces cellules en montrant qu'elles ne possédaient pas de facteurs de pluripotence (Kogler *et al.*[72]).

1.2.1.2.Etat de la recherche préclinique

Des études de bio-ingénierie tissulaire tridimensionnelle ont montré qu'il était possible de produire un tissu d'hépatocytes à partir de CBEs. L'objectif à venir, sera de produire un tissu hépatique fonctionnel et transplantable chez l'homme (McGuckin *et al.*[94]).

1.2.2. Les cellules souches mésenchymateuses

1.2.2.1.Propriétés

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM), d'origine mésodermique, peuvent être isolées chez l'adulte, à partir de la MO, du tissu adipeux et du placenta. Elles ont également été mises en évidence dans le sang de cordon ombilical il y a une dizaine d'années (Erices *et al.*[35]). Bien qu'en moins grande quantité dans le sang de cordon par rapport à la MO, les CSM du sang de cordon possèdent une capacité de prolifération supérieure (Kern *et al.*[65]). Elles conservent une morphologie fibroblastique (Figure 3), la propriété d'adhérence au plastique et les marqueurs phénotypiques qui les caractérisent (CD34-, CD14-, CD45-, HLA-DR-, CD105+, CD90+, CD73+). Les CSM de sang de cordon, tout comme celles de MO, ont la capacité de migrer vers les zones lésées, possèdent des propriétés immuno-modulatrices par inhibition de la prolifération lymphocytaire T (Wang *et al.*[143]) et sécrètent des cytokines nécessaires à leur rôle de cellules de soutien (Liu *et al.*[84]). Par contre, leur capacité de différentiation en adipocytes est plus difficile, en raison probablement de leur immaturité et de l'absence d'adipocytes chez le fœtus (Bieback *et al.*[18]). A l'inverse, leur capacité de différentiation en

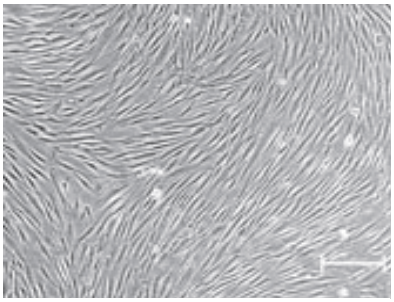


Figure 3. Cellules souches mésenchymateuses issues de sang de cordon ombilical. Échelle = 200 µm (D'aprèsWang *et al.*[143]).

chondrocytes, est plus importante celles de la MO. Cette dernière propriété leur confère un potentiel thérapeutique qui a conduit une équipe coréenne à initier un essai clinique de phase III. Cet essai évalue l'efficacité et la tolérance de l'injection locale de CSM allogéniques issues du sang de cordon ombilical chez des patients atteints d'ostéoarthrite ou de fractures (NCT01041001[162]).

1.2.2.2.État de la recherche préclinique

Au niveau préclinique, les CSM du sang de cordon ombilical ont montré un bénéfice dans des modèles d'ischémie cérébrale chez le chien après injection intra-artérielle (Chung *et al.*[27]) et chez le rat, après injection intracérébrale (Liao *et al.*[81]). Des résultats encourageants ont également été rapportés après administration de ces CSM dans des modèles murins de cirrhose (Yan *et al.*[145]) et de lésions pulmonaires induites (Chang *et al.*[26] ; Moodley *et al.*[98]). Des propriétés de réparation cutanée leur ont également été attribuées, après étude d'une application locale de ces CSM au niveau de blessures superficielles induites chez la souris (Luo *et al.*[87]). Concernant leurs propriétés immunomodulatrices, une étude a montré, qu'à l'inverse des CSM de la MO, les CSM du sang de cordon ne peuvent pas traiter la GVHD occasionnée par l'administration de CSH chez la souris immunodéficiente irradiée. Seul un traitement prophylactique pourrait être envisagé, par co-transplantation de ces CSM et de CSH (Tisato *et al.*[134]).

1.2.2.3.État de l'utilisation clinique

Au contraire des CSM de la MO et du tissu adipeux pour lesquels plus d'une centaine d'essais cliniques ont été effectués dans diverses indications, seules deux études ont rapporté le bénéfice de l'administration de CSM du sang de cordon. Une équipe coréenne a publié, en 2006, le cas d'un jeune patient de 37 ans victime d'une lésion de la moelle épinière. Un mois et demi après une injection locale de CSM allogéniques de sang de cordon ombilical, une amélioration de la sensibilité et de la motricité avait pu être observée (Kang *et al.*[62]).

L'équipe de Kim *et al.* a également montré un remarquable bénéfice de l'injection de CSM allogéniques issues de sang de cordon ombilical chez 4 hommes atteints de la maladie de Buerger, encore appelée thromboangéite oblitérante (inflammation des vaisseaux des extrémités conduisant à leur obstruction) (Kim S.W. *et al.*[68]). Par ailleurs, la tolérance et l'efficacité de l'administration de CSM de sang de cordon (Promostem) dans la prévention de la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) et la diminution de la durée d'aplasie, après allogreffe de CSH est actuellement en cours d'étude chez des enfants atteints de leucémie aigüe (NCT00823316[162]).

1.2.2.4.Perspectives

Malheureusement, contrairement aux CSM issues de sang de cordon frais, les capacités d'expansion *ex vivo* des CSM isolées de sang de cordon congelé restent discutées (Flynn *et al.*[37] ; Lee *et al.*[79]). C'est pourquoi, avant d'envisager une utilisation thérapeutique de ces dernières, il sera nécessaire de trouver une méthode de conservation à long terme qui leur soit adaptée.

Par ailleurs, le tissu du cordon ombilical et le placenta pourraient permettre une production, à grande échelle, de CSM ayant un caractère moins immunogène du fait de leur origine fœtale (Lu *et al.*[86]). En France, cette séduisante perspective thérapeutique ouvre un débat éthique et organisationnel, concernant le statut juridique des tissus placentaires et les conditions de prélèvement de ces tissus[149] . Au niveau international, la situation est différente puisqu'actuellement, le laboratoire américain Pluristem[164], est autorisé, par la Food and Drug Administration (FDA), à commercialiser des CSM placentaires allogéniques (PLacental eXpanded adherent stromal cells) pour les indications suivantes : maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (PLX-IBD), AVC ischémique (PLX-STROKE), sclérose en plaque (PLX-MS) ou encore artériopathie oblitérante des membres inférieurs (PLX-PAD) pour laquelle un essai clinique est actuellement en cours (NCT00951210[162]).

1.2.3. Les progéniteurs endothéliaux circulants

1.2.3.1.Propriétés

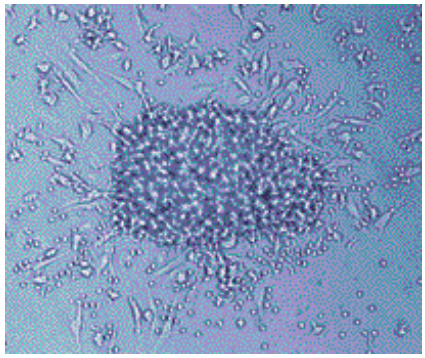


Figure 4. Colonie de progéniteurs endothéliaux (×200). (D'après Hill *et al.*[51]).

Les progéniteurs endothéliaux circulants (PEC) dérivent d'un progéniteur commun aux CSH, appelé hémangioblaste. Le terme de PEC regroupe les cellules d'origine myéloïde et lymphoïde, ayant la capacité de proliférer, de se différencier en cellules endothéliales et de former, *in situ*, de nouveaux vaisseaux (vasculogénèse). Au niveau phénotypique, ces progéniteurs sont caractérisés par les marqueurs CD34+, CD133+ et VEGFR-2. Ils ont un important pouvoir de prolifération, de formation de colonies endothéliales (Ingram *et al.*[54]) et sont capables de générer des vaisseaux plus stables et fonctionnels que les PEC issus du sang périphérique (Au *et al.*[5]). Ces cellules présentent donc un réel intérêt en thérapie régénératrice, particulièrement dans les pathologies ischémiques. D'autant plus qu'il a été rapporté qu'un faible taux de PEC fonctionnels était corrélé à un accroissement du risque cardiovasculaire chez l'homme sain (Hill *et al.*[51]).

1.2.3.2.État de la recherche préclinique

Leur bénéfice a d'ailleurs pu être montré par une amélioration de la revascularisation, après administration intramusculaire dans des modèles animaux d'ischémie des membres inférieurs (Kalka *et al.*[60] ; Yang C. *et al.*[146]) et après administration intraveineuse (IV) dans des modèles d'infarctus du myocarde (Leor *et al.*[80]). Récemment, une étude a également montré leur bénéfice sur la revascularisation et la cicatrisation de blessures induites chez la souris diabétique (Kim J.Y. *et al.*[67]). Contrairement aux CSM, les PEC peuvent être produits à partir de sang de cordon ombilical cryoconservé sans que cela n'affecte leurs propriétés fonctionnelles (Jang *et al.*[57] ; Vanneaux *et al.*[138]). Mais bien que l'idée d'une utilisation

thérapeutique à partir de sang de cordon conservé au sein des banques soit très attractive, aucun essai clinique utilisant des PEC issues du sang de cordon n'a, à ce jour, été initié.

1.3. Autres cellules du sang de cordon ombilical

1.3.1. Les lymphocytes T régulateurs

1.3.1.1. Propriétés

Les lymphocytes T régulateurs (LTreg) du sang de cordon ombilical sont caractérisés par l'expression des marqueurs CD4, CD25, FoxP3, un faible niveau de CD127 et l'absence de sécrétion d'IL-2, d'IL-4 et d'IFNγ après stimulation. L'activité suppressive de ces LTreg est plus puissante et plus constante que celle des LTreg issus de l'adulte. Malheureusement, seuls 3 à $7,5\times10^6$ lymphocytes T-reg peuvent être isolés à partir de sang de cordon congelé, ce qui n'est pas suffisant pour envisager une application chez un patient pour lequel la dose requise est d'environ 1×10^7 à 1×10^8/kg (Godfrey *et al.*[43]).

1.3.1.2.État de la recherche clinique et préclinique

C'est pourquoi, des méthodes d'expansion des Ltreg du sang de cordon sont actuellement à l'étude. La culture de ces lymphocytes à l'aide de molécules de co-stimulation (anti-CD3, anti-CD28 ou la rapamycine) ou leur co-culture avec des cellules génétiquement modifiées pour présenter des molécules de co-stimulation, permettent d'augmenter les taux de production de LTreg capables de maîtriser la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) chez l'animal. (Tolar *et al.*[135]). Par ailleurs, l'administration de lymphocytes Tregs, produits *in vitro* à partir de CSH de sang de cordon (Hutton *et al.*[52]), a été bien tolérée, lors d'un essai clinique de phase I, chez des patients recevant une double allogreffe d'USP dans le cadre d'hémopathies malignes (Stroncek *et al.*[128]). Désormais, des études de dose sont en cours pour optimiser ce type de traitement dans la prise en charge de la GVHD (NCT00376519[162], NCT00602693[162]).

1.3.2. Les cellules mononuclées totales

Du fait de leur vaste capacité de différentiation, les cellules mononuclées du sang de cordon ombilical suscitent de nombreux espoirs en thérapie régénérative. La revue exhaustive de T. Harris discute les différentes indications actuellement à l'étude : neurologiques (accident vasculaire cérébral, traumatisme crânien, infirmité motrice cérébrale), orthopédiques, le diabète juvénile ou encore la surdité (Harris[49]).

2. L'allogreffe de CSH

Actuellement, les allogreffes de CSH sont essentiellement utilisées pour le traitement des hémopathies malignes. Dans cette indication, le rôle du greffon est double. Tout d'abord, les CSH vont permettre la production des différentes lignées sanguines, préalablement éradiquées par le conditionnement de greffe chez le receveur (cf. §3.2). Deuxièmement, les lymphocytes du greffon vont jouer un rôle mixte : un effet bénéfique, médié par la "réaction du greffon contre la leucémie" (GVL), *i.e.* la destruction des cellules cancéreuses résiduelles, contrebalancé par un effet néfaste dû à la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD), *i.e.* la réaction des lymphocytes du donneur contre les cellules saines du receveur (Weiden *et al.*[144]).

Avant la loi de bioéthique de 2004, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) étaient assimilées aux organes, en termes de législation. Désormais, le régime des CSH est codifié dans la partie IV « Tissus, cellules, produits du corps humain et leurs dérivés » du livre II «Don et utilisation des éléments et produits du corps humain» du code de la santé publique.

2.1. Les différentes sources de CSH

La loi ne distingue pas les trois types de CSH (médullaires, du sang périphérique, du sang de cordon ombilical) au regard de la greffe. Aucune distinction n'existe non plus entre elles au regard de leur préparation, leur conservation, leur distribution et leur cession qui doit être

réalisée au sein d'établissements autorisés par l'AFFSAPS. Cette autorisation ne peut être accordée que dans le cadre d'une utilisation thérapeutique allogénique.

Cependant, le statut des CSH issues du sang de cordon n'a évolué que très récemment avec la parution, en 2010, de la circulaire DGS/DHOS/PP4/O4 No 2010-17[152] . Avant, ces cellules ne disposaient pas d'un statut juridique propre et leur prélèvement était régi par les dispositions relatives aux résidus opératoires (Article L1245-2 du CSP). Un consentement explicite des mères donneuses n'était donc pas nécessaire.

2.1.1. CSH médullaires et du sang périphérique

Suite à la démonstration de l'intérêt thérapeutique d'une greffe syngénique de CSH médullaires (greffon provenant d'un jumeau) chez l'animal, au début des années 1950, (Lorenz *et al.*[85]), le même type de greffe a été réalisé pour la première fois chez l'homme en 1959 par l'équipe de Thomas *et al.*, (Thomas *et al.*[133]). Peu de temps après, les greffes allogéniques non apparentées ont vu le jour au début des années 1960, lorsque le système HLA (Histocompatibility Leucocyte Antigen) a été mis en évidence et que son typage a été rendu possible (Dausset *et al.*[29]). Le développement de ce type de greffe a conduit à la création des registres nationaux de donneurs de moelle dans les années 1985. Le registre France Greffe de Moelle (FGM) de l'agence de biomédecine a été le premier registre accrédité par l'association mondiale des registres de donneurs de MO (WMDA) en mai 2004. Chaque année, de nouveaux registres informatisés rejoignent le réseau international appelé International Marrow Donor Information System (IMDS), accroissant ainsi la rapidité d'accès aux informations des volontaires inscrits dans le monde. Les allogreffes de CSH médullaires ont alors connu un développement considérable dans les années 1990, avec un élargissement des indications à une majorité de pathologies malignes et quelques pathologies non malignes telles que les anémies, les déficits immunitaires congénitaux et plus rarement certaines tumeurs solides (Gratwohl *et al.*[47] ; Kernan *et al.*[66]).

Cependant, ce type de greffe présente un inconvénient majeur qui est celui du prélèvement de MO. Ce dernier n'est pas sans risque puisqu'il est relativement invasif et nécessite une anesthésie générale du donneur.

Les cellules souches de la MO passent continuellement en petites quantités dans la circulation sanguine générale, faisant du sang périphérique une source appropriée de CSH (Fliedner *et al.*[36]). Ces cellules sont prélevées par cytaphérèse après une mobilisation dirigée par administration d'un facteur de croissance. Depuis les années 1980, les greffes autologues de cellules souches issues du sang périphérique (CSP) se sont développées et les premières greffes allogéniques ont été réalisées, avec succès, en 1995 (Schmitz *et al.*[124]). Ce type de greffe a montré un bénéfice en terme de survie à long terme chez les patients atteints d'hémopathies malignes (Friedrichs *et al.*[39] ; Powles[106]) et leur nombre a dépassé celui des allogreffes de MO, depuis 2005 en France [151] . Par rapport aux CSH de la MO, les CSP induisent une reconstitution plus rapide de l'hématopoïèse mais un risque accru de GHVD en raison d'un nombre de lymphocytes T plus élevé [161] . Cette complication est d'autant plus fréquente et intense que la compatibilité HLA est partielle entre donneur et receveur (Beatty[16] ; Petersdorf[105]). Or, le polymorphisme extrême du système HLA et la nécessité d'une compatibilité HLA stricte entre donneur et receveur limite considérablement le nombre de patients pouvant bénéficier d'une allogreffe de CSH, en particulier chez les minorités ethniques (Beatty *et al.*[17]). Actuellement, seuls 30% des patients auraient un donneur HLA compatible et la moitié finirait par trouver un donneur acceptable (Johansen *et al.*[59] ; Sanz[123]). Qui plus est, le processus complet d'identification d'un donneur (interrogation des registres de donneurs volontaires, prélèvement et acheminement du greffon) prend environ 4 mois pour la MO et 6 semaines pour les CSP (Barker *et al.*[12] ; Johansen *et al.*[59] ; Sullivan[129]). Ce délai restreint la prise en charge des patients, empêche le recours à une allogreffe de CSH dans les situations d'urgence et conduit au décès de près de 20% des patients avant la greffe. C'est

pourquoi, dans les années 1970, des équipes se sont tournées vers le sang de cordon ombilical comme source potentielle de CSH. Les CSH du sang de cordon ombilical sont en effet une ressource universelle et facilement disponible dans un délai de moins de 2 semaines (Barker *et al.*[11]).

2.1.2. CSH du sang de cordon ombilical

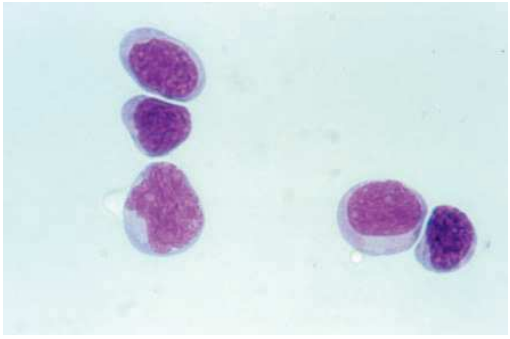


Figure 5. Cellules souches hématopoïétiques isolées de sang de cordon ombilical. (D'après Mayani *et al.*[92] **).**

Les CSH, de part leur multipotence (auto-renouvellement et différentiation dans toutes les lignées cellulaires sanguines), permettent la genèse et le maintien du processus d'hématopoïèse dès la vie fœtale. Ce processus consiste en la production de toutes les lignées cellulaires sanguines et débute *in utero*, à 3-4 semaines de gestation: une hématopoïèse extra-embryonnaire s'initie de façon autonome dans le sac vitellin, en même temps qu'au sein d'une région embryonnaire, d'origine mésodermique, adhérente à l'aorte (aorta-gonad-mesonephros). Ces deux sources autonomes, permettent de constituer un pool de CSH qui va coloniser, au cours du développement embryonnaire, les réservoirs essentiels au développement de l'hématopoïèse adulte : transitoirement le foie et la rate puis progressivement la MO où elle s'y déroulera exclusivement, dès la naissance et durant toute la vie (Durand *et al.*[31]) (Figure 6).

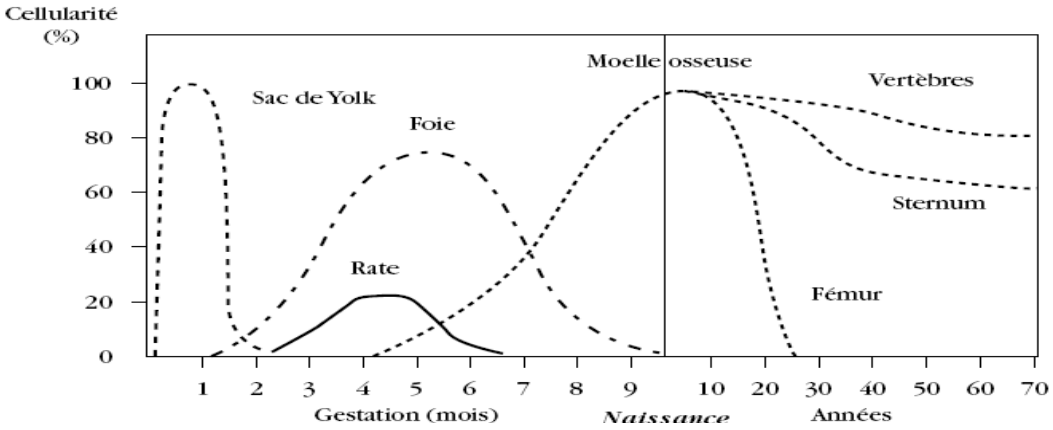


Figure 6. Localisation du processus d'hématopoïèse au cours du développement embryonnaire (D'après Bron *et al.*[19]).

L'hématopoïèse se caractérise par la différentiation des CSH en progéniteurs des différentes lignées sanguines (plaquettes, érythrocytes, monocytes, polynucléaires, lymphocytes et cellules dendritiques). Chaque étape est définie par des modifications phénotypiques (expression de molécules membranaires) et fonctionnelles des cellules (Figure 7).

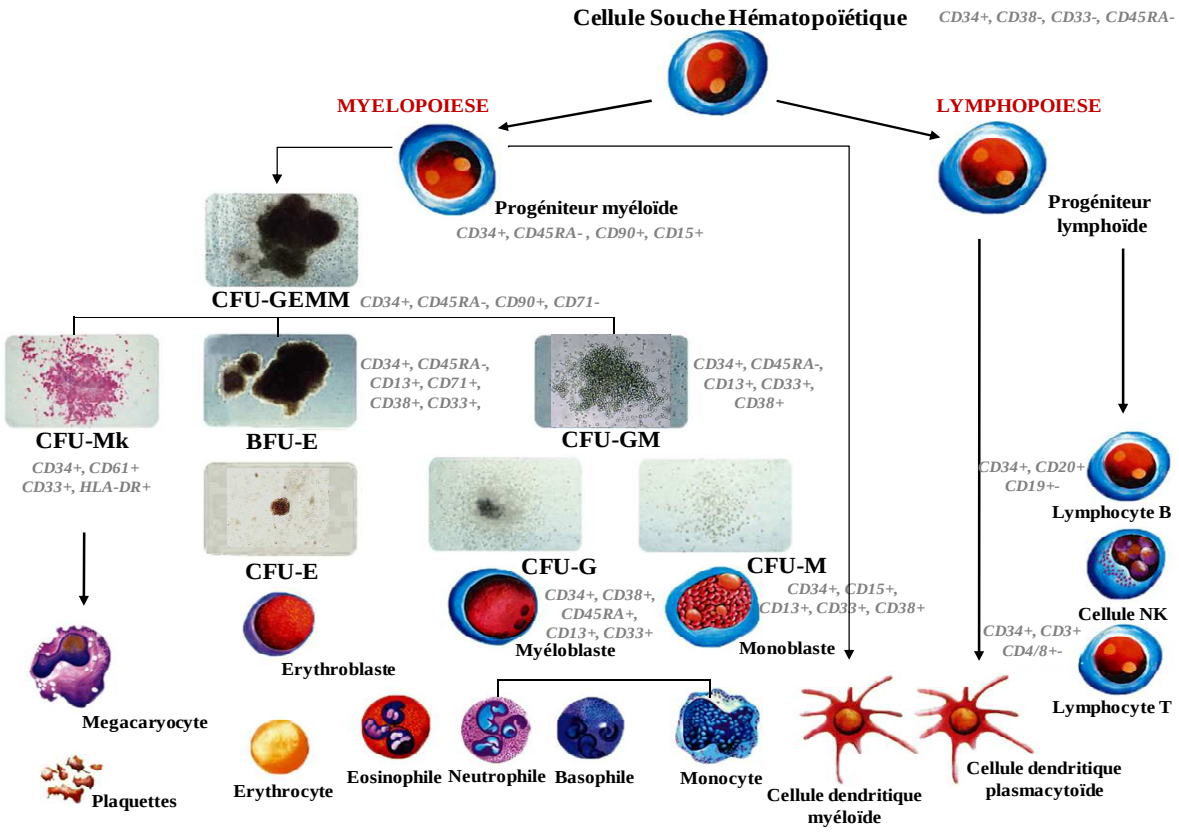


Figure 7. Différentiation cellulaire à partir d'une cellule souche hématopoïétique au cours du processus d'hématopoïèse.

Les CSH du sang de cordon ou USP sont prélevées, avant la délivrance, à partir du sang résiduel dans le cordon ombilical, par ponction de la veine ombilicale. Les conditions dans lesquelles se déroule le travail lors de l'accouchement, la durée de gestation, l'origine ethnique, le poids et le sexe de l'enfant influent sur la quantité de cellules recueillies. Le nombre de cellules recueillies est d'autant plus élevé que la durée de gestation est prolongée, le poids du nouveau-né élevé. Il augmente également lorsque la délivrance est faite par voie basse et que le sang de cordon est prélevé avant la délivrance placentaire (Solves *et al.*[126] ; Yang H. *et al.*[147]). Ce prélèvement ne porte préjudice ni à la mère, ni à l'enfant, dans la mesure où la fonction des CSH circulant dans le cordon ombilical reste à ce jour inconnue. Leur présence pourrait résulter d'une migration depuis la MO et servir à étendre le volume du tissu hématopoïétique en fin de gestation et après la naissance, lorsque le foie cesse toute fonction d'hématopoïèse (Kalpaktsoglou *et al.*[61] ; Knudtzon[70]).

Il y a maintenant 30 ans que les CSH ont été découvertes dans le sang de cordon ombilical. Ce sont des cellules mononuclées, de petite taille et de faible densité. Le marqueur de surface qui les caractérise est l'antigène CD34+, une glycoprotéine de membrane de 90-120 kD, mise en évidence dans les années 1990 (Civin[28] ; Mayani *et al.*[92]). Les CSH représentent 0,15 à 0,8% des CNT du sang de cordon et sont donc en proportion quasi-identique à celle de la MO (1% des CNT de la MO) (Kinniburgh *et al.*[69]). Mais étant donné son faible volume, le sang de cordon ombilical contient moins de CSH (en moyenne $0{,}12\times10^6$ CD34+/kg) que la MO ($2{,}8\times10^6$ CD34+/kg) ou le sang périphérique (7×10^6 CD34+/kg) (Goldstein *et al.*[44]).

Au niveau fonctionnel, les CSH du sang de cordon se multiplient 10 à 20 fois plus que celles de la MO et sont capables de générer, *in vitro*, les progéniteurs des différentes lignées, notamment monocytaires et granuleuses en plus grande quantité (Mayani *et al.*[92]) (Figure 8). L'utilisation d'un support de culture semi-solide (méthylcellulose) et de facteurs de croissance hématopoïétiques ont permis de mettre en évidence ces différents précurseurs (Figure 7):

– les **CFU-GEMM**, capables de générer de très grandes colonies composées de cellules granuleuses et macrophagiques ainsi que de cellules érythroïdes.

– les **BFU-E** (burst forming unit erythroid), capables de générer des foyers de colonies érythroïdes.

– les **CFU-E**, (colony forming unit erythroid), précurseurs plus matures que les BFU-E capables de générer des petites colonies érythroïdes.

– les **CFU-GM** capables de générer des colonies granuleuses et macrophagiques.

– les **CFU-G** et les **CFU-M**, plus matures que les CFU-GM et capables de générer respectivement des colonies de granulocytes et des colonies de macrophages.

	HPC/10^5 nucleated cells		
	Myeloid	**Erythroid**	**Multipotent**
UCB	132 ± 69	153 ± 78	18 ± 6
BM	160 ± 58	155 ± 67	5 ± 3
	Relative proportion of myeloid progenitors (%)		
	CFU-G	**CFU-M**	**CFU-GM**
UCB	33 ± 9	40 ± 12	29 ± 8
BM	62 ± 8	32 ± 11	9 ± 6
	Relative proportion of erythroid progenitors (%)		
		CFU-E	**BFU-E**
UCB		7 ± 8	94 ± 11
BM		35 ± 15	62 ± 16

Figure 8. Comparaison des caractéristiques fonctionnelles des CSH issues du sang de cordon et de la MO (D'après Mayani *et al.*[92]). *UCB : unité de sang placentaire, BM : moelle osseuse, HPC: progéniteur hématopoïétique*

2.2. Avantages des CSH issues du sang de cordon

Le prélèvement de sang placentaire ne présente aucun risque, ni pour la mère ni pour le nouveau-né puisqu'il ne nécessite aucune anesthésie. Ses modalités, selon un don anonyme, gratuit et bénévole, ont permis d'accroitre la diversité HLA sur le registre des donneurs, favorisant l'accès à la greffe des minorités ethniques, sous-représentées dans les registres de donneurs adultes (Beatty *et al.*[17] ; Samuel *et al.*[122]).

A degré de compatibilité égale, le risque d'alloréactivité délétère (GVHD) est inférieur à celui observé après une allogreffe de CSH médullaires (Grewal *et al.*[48]). Ceci est probablement lié

à l'état naïf des lymphocytes et des cellules dendritiques du sang de cordon. Ce risque moindre de GHVD autorise donc une plus grande disparité HLA entre donneur et receveur. D'autant plus que ces disparités (1 à 2 allèles) peuvent être compensées en augmentant la dose de CNT administrées (Rocha *et al.*[112]).

Il existe peu de risque de transmission d'infections virales car le donneur a un système immunologique très immature et le risque de contact avec un agent infectieux est limité durant la gestation.

Enfin, le contexte microbiologique optimisé et l'absence de délai pour réaliser les sérologies et la qualification du donneur autorisent une mise à disposition immédiate du greffon.

2.3. Inconvénients des CSH issues du sang de cordon

Le faible nombre de CSH au sein du greffon limite l'accès à la greffe pour de nombreux adultes. Ce nombre limité de CSH au sein des USP conduit à un retard de reconstitution de l'hématopoïèse (*neutrophiles > 0,5G/L: 24 jours; plaquettes > 20 G/L: 52 jours*) par rapport à la MO (*neutrophiles: 19 jours; plaquettes: 28 jours*) et aux CSP (*neutrophiles: 14 jours; plaquettes: 19 jours*) (Eapen *et al.*[32] ; Rocha *et al.*[112]) (Figure 9).

L'état naïf du donneur sur le plan de l'immunité antimicrobienne est associé à un risque accru de complications infectieuses chez le receveur.

La greffe d'USP ne permet pas d'envisager facilement le prélèvement des lymphocytes chez le donneur en vue d'une transfusion ultérieure chez le receveur en cas de rechute. Enfin, il existe une possibilité (rare) de transmission de maladies tumorales ou génétiques, non détectées lors du prélèvement ou non transmises à la banque avant la cession du greffon.

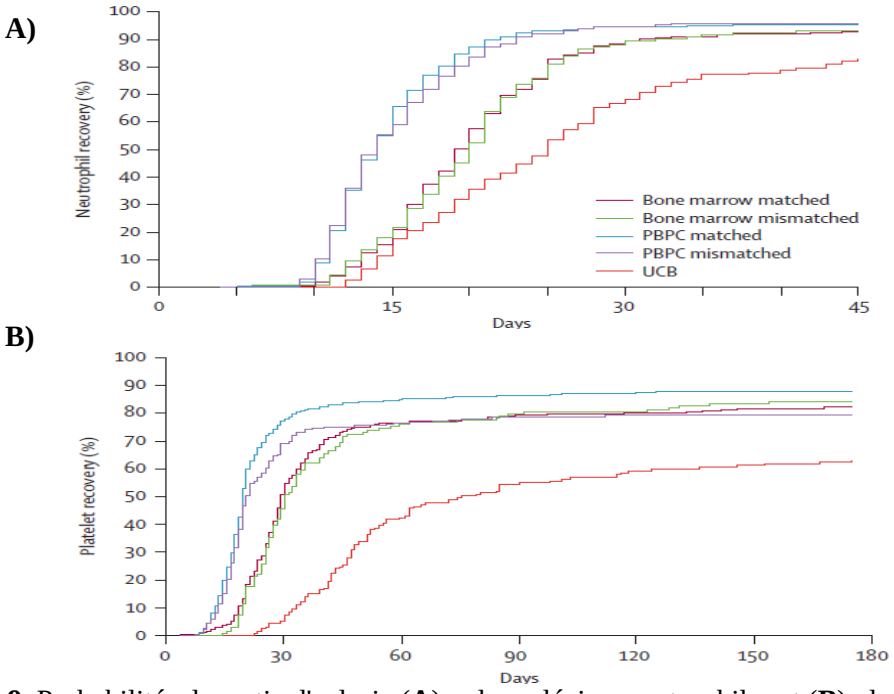


Figure 9. Probabilités de sortie d'aplasie (**A**) polynucléaires neutrophiles et (**B**) plaquettes, selon la source de CSH (D'après Eapen *et al.*[32])

2.4. Historique des allogreffes d'USP

2.4.1. Allogreffes apparentées

Au début des années 70, Knudtzon montra pour la première fois que le sang de cordon ombilical, recueilli à la naissance, était une source importante de CSH, en proportion proche de celles isolées à partir de MO humaine (Knudtzon[70]). Ces premiers résultats ont été le point de départ des essais de greffe syngénique de sang de cordon. La première publiée dans le monde scientifique a été réalisée en 1972 chez un enfant atteint de leucémie. Même si cet essai n'a pas permis une reconstitution hématopoïétique à long terme, un changement transitoire du groupe sanguin du receveur a pu être mis en évidence. Cette observation a été le fondement du potentiel des CSH du sang de cordon à recoloniser transitoirement la MO du receveur (Ende *et al.*[34]). Par la suite, des études ont confirmé, *in vitro*, qu'avec un volume suffisant de sang de cordon collecté, le nombre de CSH obtenues pouvait permettre la reconstitution hématopoïétique d'un patient. L'usage de cette source de CSH a alors pu être envisagée dans les hémopathies malignes (Broxmeyer *et al.*[20] ; Wagner *et al.*[141]). Quelques

années plus tard, le premier succès à long terme d'allogreffe de CSH de sang de cordon apparentée a été rapporté par Gluckman *et al.*, en 1988 chez un enfant atteint d'une anémie de Fanconi (Gluckman *et al.*[40]). Les essais d'allogreffe apparentées de CSH de sang de cordon se sont ensuite poursuivis, essentiellement chez les enfants atteints de pathologies aussi bien malignes que non malignes. Par analyse de ces premières greffes, la quantité de CSH d'un sang de cordon apparenté semblait suffisante et le risque de GVHD moindre par rapport aux allogreffes de MO (Rocha *et al.*[114] ; Wagner *et al.*[142]).

2.4.2.Cryoconservation et allogreffes non apparentées

A la suite de ces premières expériences cliniques, les travaux de Koike, au Japon (Koike[73]) et de Boyse, aux Etats-Unis (Boyse *et al.*[155]) ont fait évolué le devenir des CSH issues du sang de cordon. Ils ont montré que ces cellules pouvaient être cryoconservées sans que leur viabilité ni leurs capacités de prolifération ne soient affectées. Les méthodes de cryoconservation ont évolué et la création de "réserves" de CSH de sang de cordon sous forme congelée, encore appelées unités de sang placentaires (USP), est alors apparue comme une solution pratique de mise à disposition rapide de CSH allogéniques (Broxmeyer *et al.*[20] ; Harris *et al.*[50] ; Rubinstein *et al.*[119]). La première banque allogénique d'USP a vu le jour à New York en 1991 et fourni les premières USP cryoconservées destinées à des allogreffes chez des enfants atteints de leucémie (Rubinstein *et al.*[121]).

2.5. Indication des allogreffes d'USP

Des études ont par la suite confirmé la faisabilité et la tolérance des allogreffes d'USP non apparentées sur un plus grand nombre de patients (Rubinstein *et al.*[117]), enfants (Gluckman *et al.*[41] ; Kurtzberg *et al.*[74] ; Rubinstein *et al.*[118]) et adultes (Laughlin *et al.*[77] ; Ooi *et al.*[102] ; Sanz[123]) atteints essentiellement d'hémopathies malignes.

Seules, quelques études, non randomisées, ont comparé les deux sources de CSH (USP et MO), chez des enfants et des adultes atteints d'hémopathies malignes. Ces essais ont montré un taux identique de prise de greffe et de survie, avec un retard de sortie d'aplasie et un risque moindre de GVHD pour les USP (Atsuta *et al.*[4] ; Barker *et al.*[9] ; Barker *et al.*[10] ; Eapen *et al.*[33] ; Jacobsohn *et al.*[56] ; Rocha *et al.*[110] ; Takahashi *et al.*[131]).

Finalement, au vu des résultats de ces différentes études, l'allogreffe d'USP non apparentée est apparu comme étant 1) la ligne thérapeutique de choix chez les enfants, atteints de leucémie, pour lesquels un donneur de MO est introuvable (Rocha *et al.*[113]) et 2) une alternative possible à une allogreffe de CSH médullaire avec disparités HLA chez l'adulte présentant une hémopathies malignes (Kobayashi *et al.*[71] ; Lane[75] ; Ooi[101]).

Désormais, l'allogreffe d'USP est proposée dans 85 indications qui sont majoritairement celles des allogreffes de CSH médullaires (Figure 10). Les USP peuvent être proposées en tant que cellules de remplacement médullaires dans les maladies d'origine médullaire, de type hémoglobinopathies ou aplasies médullaires. Dans le cas des leucémies aigües ou des lymphomes, c'est l'effet GVL sur les cellules tumorales qui est recherché.

Indications	Répartition des allogreffes de CSH en France en 2008 (%)
Hémopathies malignes	
Leucémie aigüe lymphoblastique *Très haut risque et rechutes*	18,20
Leucémie aigüe myéloblastique *Très haut risque et rechutes*	35,80
Leucémie myéloïde chronique *Rechutes*	3,00
Leucémie lymphoïde chronique	3,10
Maladie de Hodgkin *Stade avancé et rechute*	2,30
Lymphome non hodgkinien	10,10
Myélome multiple	5,60
Myélodysplasie	8,30
Maladies génétiques	
Aplasies médullaires *Anémie aplastique, anémie de Fanconi, anémies auto-immunes (Evans)*	3,80
Hémoglobinopathies *Thalassémies, drépanocytose, formes sévères*	2,30
Déficits immunitaires congénitaux *Syndrome de Wiscott Aldrich*	
Histiocytoses *Langerhansienne , lymphohistiocytose hémophagocytaire*	
Maladies métaboliques *Mucopolysaccharidose (Hurler), maladies lysosomales (Krabbe)*	
Tumeurs solides	0,80

Figure 10. Répartition du nombre d'allogreffe de CSH (%) selon l'indication, en France, en 2008 (CSH médullaires et USP). *Source* : Rapport national 2008 Agence de Biomédecine[150] .

Ainsi, dès qu'une indication d'allogreffe de CSH est posée, le processus de recherche d'un donneur non apparenté pour allogreffe de CSH, tel que décrit ci-dessous, est mis en place (Figure 11).

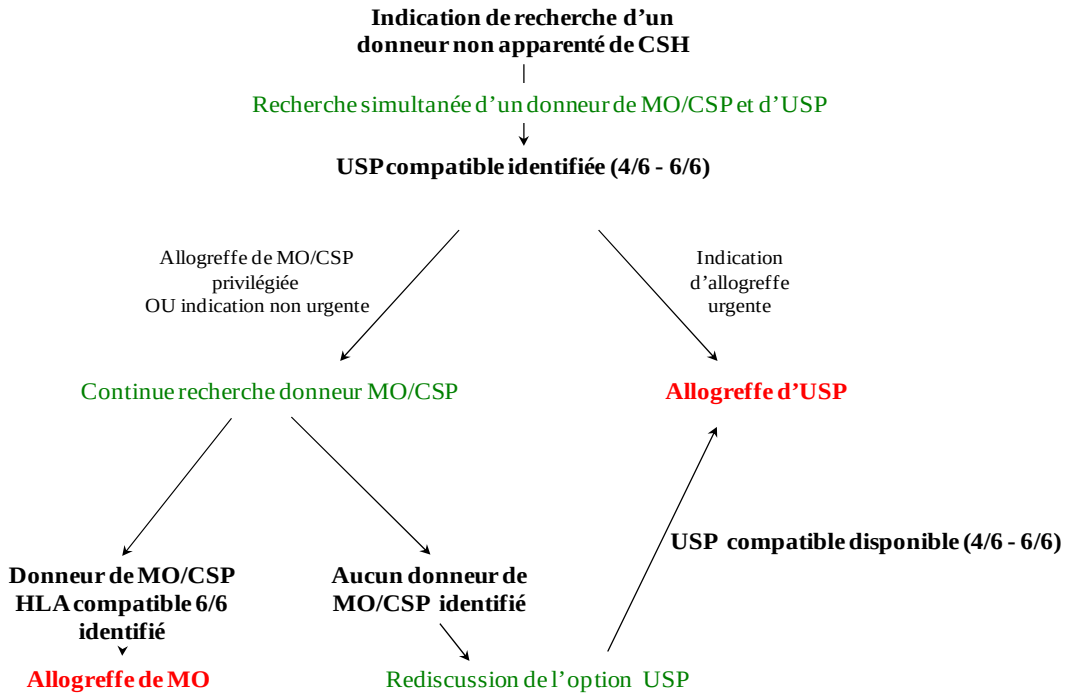


Figure 11. Processus de recherche d'un donneur non apparenté pour allogreffe de CSH. *CSH : cellules souches hématopoïétiques, USP: unités de sang placentaire, MO : moelle osseuse, CSP: CSH du sang périphérique* (*Adapté de* Grewal *et al.*[48]).

Depuis 2006, le succès des allogreffes d'USP non apparentées est manifeste puisqu'elles ont dépassé le nombre d'allogreffes de MO, en France (40% des allogreffes de CSH en 2008[151]), en Europe (13 % des allogreffes de CSH en 2008) (Gratwohl *et al.*[47]) et au niveau international (Broxmeyer[157]) (Figure 12).

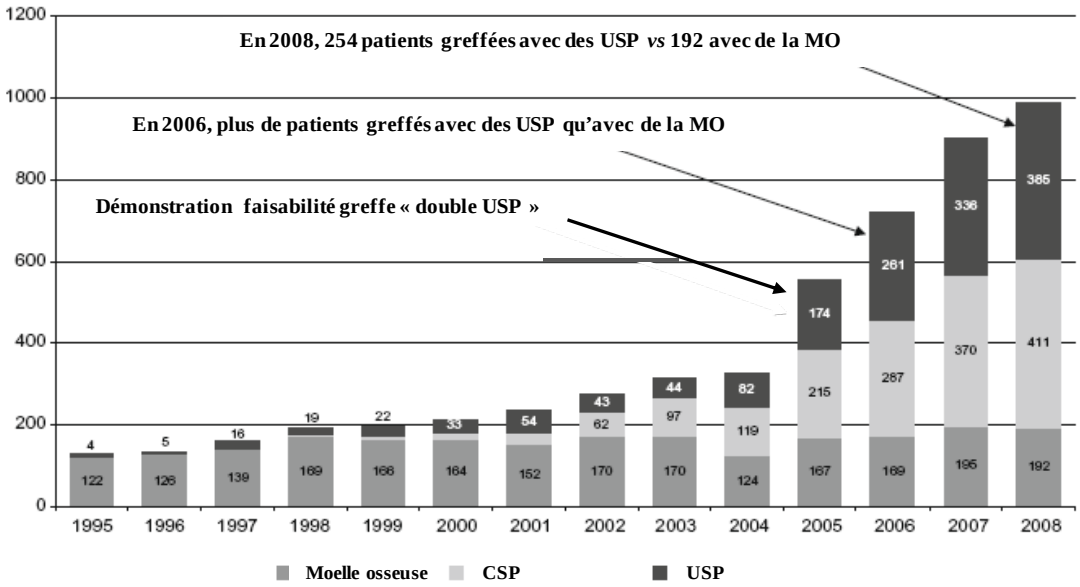


Figure 12. Nombre de greffes de CSH réparti par source cellulaire en France (1995-2008). (*D'après* Katz *et al.*[63])

Dès 1998, plusieurs facteurs ont été reconnus comme influençant fortement le devenir des patients après une allogreffe de CSH de sang de cordon. La dose de cellules nucléées totales (CNT) et le degré compatibilité HLA entre donneur et receveur sont fortement prédictifs du taux de survie. Mais plusieurs études ont montré que le nombre de cellules CD34+ et de progéniteurs CFU-GM était également prédictif du délai de sortie d'aplasie et des taux de mortalité et de survie après allogreffe d'USP (Rocha *et al.*[112] ; Iori *et al.*[55] ; Migliaccio *et al.*[97] ; Prasad *et al.*[107] ; Wagner *et al.*[140] ; Yoo *et al.*[148]).

Les recommandations du groupe Eurocord concernant le choix d'une UPS tiennent compte, en priorité, du nombre de CNT contenues dans le greffon, du type de pathologie et du degré de disparité HLA entre donneur et receveur (Tableau I) (Rocha *et al.*[112]). A ce jour, le nombre de cellules CD34+ n'est pas dans le critère de choix principal d'un greffon. Il n'est pas fourni par toutes les banques de sang de cordon lors de l'inscription sur le registre des donneurs, notamment pour les USP qui ont été congelées il y a plus de 10 ans.

Compatibilité HLA	6/6 ou 5/6		4/6		3/6	
	Hémopathies malignes	Pathologies non malignes	Hémopathies malignes	Pathologies non malignes	Hémopathies malignes	Pathologies non malignes
Cellules congelées						
CNT	≥ 2,5 à 3 .10^7/kg	Idem pathologies malignes, 6/6 à préférer	≥ 3,5 .10^7/kg	≥ 4 à 5 .10^7/kg	A éviter	
CD34	≈ 1,2 à 1,7 .10^5/kg		> 1,7 .10^5/kg	> 2 à 2,5 .10^5/kg	A considérer si cas très sévère et nombre de CNT élevé	
CFU-GM	A prendre en compte chaque fois que disponible					
Cellules décongelées						
CNT	≥ 2 à 2,5 .10^7/kg si < 1 .10^7/kg 2ème greffon si entre 1 et 2 .10^7/kg fonction du nombre de CD34	Idem pathologies malignes, 6/6 à préférer	≥ 3 .10^7/kg	≥ 3,5 .10^7/kg		
CD34	≈ 1,2 à 1,7 .10^5/kg		> 1,7 .10^5/kg	> 2 à 2,5 .10^5/kg		
CFU-GM	A prendre en compte chaque fois que disponible					

Tableau I. Algorithme de choix d'une USP selon le nombre de disparités HLA, la dose cellulaire et le diagnostic (Adapté de Rocha *et al.*[112]).

3. Avancées dans l'allogreffe d'USP

Depuis plusieurs années, de nombreuses équipes travaillent sur des méthodes permettant de diminuer la durée d'aplasie et d'améliorer la survie après allogreffe d'USP.

3.1. Double allogreffe d'USP

En 2005, Barker *et al.* ont démontré que des USP provenant de deux donneurs différents (double USP) pouvaient être greffées chez un même patient (Barker *et al.*[13]). Les doubles allogreffes d'USP, permettent de remédier aux faibles doses de CNT contenues dans les USP. Elles induisent une bonne prise de greffe, un faible taux de mortalité et une survie similaire à ceux observés après une allogreffe de CSH provenant des autres sources (Brunstein *et al.*[24]). De plus, la double allogreffe d'USP semble diminuer le risque de rechute et potentialiser l'effet GVL par rapport à une simple allogreffe (MacMillan *et al.*[89] ; Rodrigues *et al.*[115] ; Verneris *et al.*[139]). Les doubles allogreffes d'USP sont donc une alternative de choix chez les patients atteints d'hémopathies malignes, pour lesquels aucun donneur de MO et aucune USP contenant un nombre suffisant de CNT n'ont pu être trouvés (Brunstein *et al.*[23]). Elles permettent d'augmenter la dose de CSH administrées et donc d'élargir les indications aux adultes de poids supérieur à 50 kg, en association avec un conditionnement myéloablatif ou non (Barker *et al.*[13] ; Barker *et al.*[15]). Ainsi, depuis 2006, le nombre de ces doubles allogreffes d'USP a dépassé celui des simples allogreffes d'USP en France (54% des allogreffes d'USP en 2008). Le mécanisme par lequel se fait la reconstitution hématopoïétique à partir de deux USP de donneurs différents reste encore mal compris, même si la majorité des receveurs présentent un chimérisme résultant de la prédominance d'une USP par rapport à l'autre (Barker *et al.*[13]). Actuellement seuls deux essais cliniques multicentriques randomisés de phase III, dont un initié en France, ont pour objectif d'évaluer le bénéfice d'une double allogreffe d'USP par rapport à une simple allogreffe d'USP, chez des enfants et des jeunes

adultes atteints de leucémies aigües et de myélodysplasies (NCT01067300 et NCT00412360[162]).

3.2. Conditionnements d'allogreffe

Le conditionnement est le traitement administré avant l'allogreffe de CSH. Il a pour buts d'induire une immunosuppression +/- une myélosuppression chez le receveur afin de permettre la prise de l'allogreffe et de détruire la majorité des cellules pathologiques. À l'heure actuelle, il existe différents types de conditionnements d'allogreffe de CSH dont le choix se fait selon plusieurs critères : l'âge du patient, les comorbidités associées, le statut (rémission ou non) et le type d'hémopathie.

3.2.1. Conditionnement myéloablatif

Le conditionnement myéloablatif, précédant l'allogreffe de CSH a pour objectifs: d'éradiquer les cellules sanguines cancéreuses (myélosuppression), d'induire une immunosuppression chez le receveur afin de permettre l'allogreffe et d'augmenter la réponse immunitaire anti-tumorale par lyse des cellules tumorales et activation des lymphocytes T anti-tumoraux.

Ces conditionnements peuvent être à base d'irradiation corporelle totale, associée à une haute dose de chimiothérapie et à un traitement immunosuppresseur, au prix d'une forte toxicité. Des conditionnements non irradiants, à base de hautes doses de drogues cytotoxiques ont par la suite été développés afin de limiter cette toxicité, avec un avantage de la fludarabine sur le taux de survie (Gluckman *et al.*[42]). Mais le risque de complications infectieuses (délai de sortie d'aplasie) et tumorales (effets secondaires de la chimiothérapie) n'encourage pas leur utilisation chez des patients non susceptibles de les supporter. En effet, on sait que le taux de morbidité et de mortalité, après un conditionnement myéloablatif, est particulièrement élevé chez les patients de 50 à 60 ans (Brunstein *et al.*[24]).

3.2.2. Conditionnement non myéloablatif

Les conditionnements d'allogreffe non myléoablatifs ou atténués sont alors apparus, dès la fin des années 1990. À la différence des conditionnements myéloablatifs, ils sont essentiellement immunosuppresseurs et très peu myélosuppresseurs. Ils favorisent l'effet GVL des cellules immunocompétentes du donneur tout en diminuant la toxicité liée au traitement. Après un conditionnement non myéloablatif, les taux de survie et le risque de GVHD aiguë et chronique sont comparables après une allogreffe d'USP et une allogreffe de MO (Majhail *et al.*[90]). Associé à une double greffe d'USP, ce type de conditionnement a montré des résultats encourageants chez l'adulte atteint de leucémie (Barker *et al.*[14]) et de lymphomes de bas grade (Brunstein *et al.*[24]) en raccourcissant la durée d'aplasie d'1 à 2 semaines par rapport à une allogreffe d'USP classique, sans diminuer le taux de prise de greffe (Rocha *et al.*[111]). Ce type de conditionnement, associé à une double allogreffe d'USP est donc particulièrement adapté aux patients âgés ou porteurs de comorbidités, pour lesquels aucun donneur compatible de MO ou d'USP contenant un nombre suffisant de CNT n'a pu être identifié.

En France, depuis 3 ans, le nombre d'allogreffes à conditionnement d'intensité réduite à rejoint celui des allogreffes à conditionnement myéloablatif et représente 50,7% des allogreffes de CSH.

Avant de pouvoir proposer ce type de conditionnement aux personnes jeunes, aptes à bénéficier d'un conditionnement myéloablatif, il est indispensable que des essais cliniques comparatifs d'envergure soient initiés dans ce type de population.

3.3. Expansion ex vivo des CSH

L'expansion *ex vivo* des CSH, à partir de sang de cordon, est apparue comme un moyen intéressant d'augmenter le nombre de CSH disponibles à partir d'une USP et pourrait servir d'alternative à la double greffe d'USP.

L'adjonction de CSH de sang de cordon amplifiées *ex vivo,* à l'administration d'une USP contenant un faible nombre de CNT, semble accélérer la reconstitution hématopoïétique (Pecora *et al.*[104]).

La faisabilité de l'administration de ce type de CSH a été confirmée chez 27 patients atteints d'hémopathies et de maladies héréditaires, au cours desquelles seules 3 greffes ont échoué (Jaroscak *et al.*[58]).

Une des méthodes d'expansion décrite dans la littérature, consiste à utiliser des milieux de cultures supplémentés en une combinaison de plusieurs cytokines, parmi lesquelles le stem cell factor (SFC), l'IL-3, l'IL- 6, le G-CSF, le Flt-3 ou la thrombopoiétine (TPO), facteur de croissance de différentiation plaquettaire. Mais la combinaison optimale de cytokines n'a pas encore été définie (Kelly *et al.*[64]). Plusieurs modifications du milieu de culture ont été étudiées : les milieux de culture sans sérum, l'utilisation d'agents capables de moduler la prolifération et la différentiation des CSH (tetraethylene-pentamine, histone déacétylase) et de maintenir la pluripotence des progéniteurs (inhibiteur de la glycogène synthase).

Plus récemment, une méthode utilisant un ligand de Notch-1 au sein du milieu de culture a été développée et testée cliniquement par l'équipe de Delaney *et al.*. Notch-1 est un récepteur permettant d'augmenter l'auto-renouvellement des CSH. L'administration de CSH de sang de cordon amplifiées par cette méthode de culture, associée à celle de CSH non manipulées, a permis d'accélérer la reconstitution hématopoïétique chez la souris immunodéficiente et chez 10 patients atteints d'hémopathies malignes (Delaney *et al.*[30]). Cette même équipe est actuellement en train de vérifier ces résultats sur un plus grand nombre de patients (NCT00343798[162]).

Un essai clinique de phase II, initié par le CHU de Bordeaux a pour objectif d'évaluer la faisabilité, la tolérance mais aussi le coût de l'administration de telles CSH chez des patients atteints d'hémopathies malignes (NCT01034449[162]).

Un autre type d'expansion consiste à cultiver les CSH de sang de cordon avec des CSM. Cette méthode permet d'augmenter de 20 à 40 fois le nombre de CSH en culture (McNiece *et al.*[96]). En effet, les CSM sont les cellules stromales qui composent, en partie, le microenvironnement des CSH *in vivo*, au sein des niches hématopoïétiques, aussi bien dans la MO que dans le sang de cordon ombilical. En culture, les CSM pourraient donc restaurer les interactions nécessaires à un renouvellement optimal des CSH au sein de leur environnement (Bakhshi *et al.*[6]). Cette dernière méthode d'expansion a permis de diminuer le délai de sortie d'aplasie chez 5 patients atteints d'hémopathies malignes (Lima *et al.*[83]) et est actuellement en cours d'essai chez des patients atteints de syndromes myélodysplasiques et de leucémies (NCT00498316[162]).

Malheureusement, même si chacune de ces méthodes d'expansion a montré des résultats satisfaisants, l'absence d'essais cliniques d'envergure ne permet pas de conclure quant à l'avantage de l'une ou l'autre pour une utilisation en routine clinique.

3.4. Co-transplantation CSM/CSH

Lorsque le nombre de CSH administré est faible, la co-transplantation de CSM de foie fœtal favorise la prise de greffe de CSH de sang de cordon chez la souris immunodéficiente (in 't Anker *et al.*[53]). Des essais ont montré la faisabilité et la tolérance de la co-transplantation de CSM autologues ou allogéniques chez l'homme lors d'une allogreffe de CSH de sang de cordon (Lazarus *et al.*[78] ; McMillan Macmillan *et al.*[88]). Actuellement, un essai de phase I/II évalue la faisabilité et la sécurité de ce type de co-transplantation chez des patients atteints d'hémopathies malignes bénéficiant d'une simple ou double allogreffe d'USP (conditionnement myéloablatif ou non) (NCT01092026[162]).

3.5. Administration intra-osseuse des CSH

Afin de limiter la perte de CSH dans les organes de passage et de raccourcir leur délai de migration au sein de la MO, l'administration intra-osseuse est apparue comme moyen d'optimisation de l'allogreffe de CSH.

Elle a pour objectif de diminuer la durée d'aplasie chez les receveurs d'allogreffe de CSH. Les CSH médullaires, administrées par voie intra-osseuse, migrent rapidement au sein de la niche hématopoïétique, ce qui permet de raccourcir la durée d'aplasie chez l'animal (Castello *et al.*[25]). Par contre, la sécurité de ce type d'administration avec des CSH de sang de cordon cryoconservés a nécessité des études supplémentaires de sécurité. En effet, la présence de DMSO, agent de cryoprotection utilisé par les banques de sang de cordon pour la congélation des USP, peut induire une ostéonécrose au site d'injection. C'est l'équipe de Frassoni *et al*., qui a montré la faisabilité et la tolérance de ce type d'administration chez 32 patients adultes atteints d'hémopathies malignes (Frassoni *et al.*[38]). Actuellement, trois essais cliniques évaluent la faisabilité de l'administration intraosseuse de CSH de sang de cordon et son bénéfice sur la sortie d'aplasie (NCT00838019, NCT00886522, et NCT00696046[162]).

Paradoxalement, Brunstein *et al*, n'ont pas montré d'accélération de sortie d'aplasie avec ce type d'administration par rapport à l'administration IV (Brunstein *et al.*[21]). Des essais randomisés et contrôlés, comprenant un plus grand nombre de patients et comparant les voies d'administration intraosseuse et IV sont donc nécessaires avant de pouvoir conclure à l'utilité de cette technique. Dans cette optique, un essai clinique, non contrôlé, initié par une équipe d'Atlanta, est actuellement en cours. Son objectif est de comparer, chez l'adulte atteint d'hémopathies malignes après double allogreffe d'USP, la rapidité de prise de greffe entre une USP administrée par voie intraosseuse ou IV et la seconde administrée par voie IV (NCT00967525[162]).

4. Banques de sang de cordon

4.1. Historique et loi de bioéthique

La première banque française de sang de cordon ombilical à usage thérapeutique (allogénique) est née à Besançon en 1993 (EFS-Bourgogne-Franche-Comté), sous l'égide de l'Agence Française du Sang (AFS) (devenue l'EFS) et l'Etablissement Français des Greffes (EFG) (devenu l'ABM). Le travail de ces 2 instances, réunies en 1997, consistait à valider les données scientifiques et à mettre en place un réseau de banques de sang de cordon afin de couvrir les besoins nationaux en CSH.

Par décret d'application de la loi de bioéthique du 6 août 2004[158] , l'Agence de la biomédecine (ABM) a été créée en mai 2005. Cette agence sanitaire dépendante de l'État a repris les missions de l'EFG et dirige désormais toutes les activités de prélèvement, de greffe d'organes, de tissus et de cellules, de la procréation, de l'embryologie et de la génétique humaines.

En France, seules les banques publiques allogéniques non commerciales, recueillant les dons anonymes et gratuits de sang de cordon sont autorisées par les autorités compétentes. Au niveau européen, les espagnols et les italiens ont autorisé la création de banques privées (en 2006 et 2007 respectivement) sous réserve qu'en cas de conservation à visée autologue, les USP soient impérativement inscrites sur les registres internationaux de donneurs et mis à la disposition des cliniciens pour un usage allogénique en cas de besoin.

En s'appuyant sur ces modèles européens et les propositions du Sénat[160] , le député Damien Meslot a présenté, en décembre 2009, à l'Assemblée Nationale, une proposition de loi "relative au prélèvement et à la conservation des cellules souches issues du sang de cordon ombilical". Cette proposition de loi autorise la "*collecte, la préparation et la conservation du placenta, ses composants et notamment le sang de cordon ombilical dans des établissements*

et organismes, publics et privés, en vue d'une éventuelle utilisation ultérieure au bénéfice de l'enfant ou d'un tiers, si la mère le souhaite " (Meslot[159]).

D'un point de vue éthique, le débat reste ouvert puisque l'autorisation de telles banques commerciales serait source d'inégalités entre les citoyens, dans la mesure où seuls les plus fortunés auraient la capacité d'accéder à ces prestations (Marville *et al.*[91]).

D'un point de vue qualité, il faut savoir que les modalités de prélèvement, de congélation, de sécurisation ainsi que les spécifications des USP conservées au sein de ces banques privées ne sont pas au niveau de ce qui est requis par les autorités internationales et peut rendre dangereuse leur utilisation (Sun *et al.*[130]). D'ailleurs, pour la plupart, ces USP conservées pour un usage « mixte » autologue ou allogénique ne figurent même pas dans les registres internationaux de donneurs. C'est probablement ce qui a conduit la Belgique à promulguer récemment l'interdiction de ces banques[153] .

Il n'y a actuellement aucune indication privilégiée de la greffe autologue. Un rapport de l'American Society for Blood and Marrow Transplantation a d'ailleurs estimé, au vu des indications actuellement à l'étude dans quelques essais cliniques (diabète de type I, paralysie cérébrale, hypoxie du nouveau-né ou neuroblastome), qu'une personne avait de 0,0005% à 0,04% de risque d'avoir besoin d'une greffe autologue au cours de sa vie (Ballen *et al.*[7]).

Aucune preuve scientifique ne permet de valider l'intérêt d'une utilisation autologue pour traiter les hémopathies, puisque l'on sait que les leucémies de l'enfant, quel que soit leur type, sont présentes dès la naissance. Les cellules malades seraient donc congelées avec le sang de cordon et réinjectées au moment d'une éventuelle greffe. De plus, en condition autologue, on ne peut compter sur aucun effet GVL, effet à l'origine du bénéfice apporté par les greffes allogéniques pour ces pathologies. Enfin, il est évident qu'aucune maladie héréditaire ne peut être traitée par greffe autologue si elle n'est pas associée à un transfert de gène.

D'autre part, le faible nombre de cellules souches dans un prélèvement de sang de cordon ne permettrait pas une éventuelle utilisation autologue en thérapie régénérative, tout du moins avec les méthodes d'isolement actuellement disponibles. La grande immaturité des cellules souches du sang de cordon les rend faiblement immunogènes et suffisamment tolérantes pour une utilisation allogénique.

Comme le dit Mme Prada-Bordenave, directrice générale de l'ABM : « chaque parent veut le mieux pour le bébé à naître mais la naissance, ce n'est pas la livraison d'un produit avec son kit de réparation ».

4.2. Réseaux de banques d'unités de sang placentaire

Le Réseau Français de Sang Placentaire (RFSP) est un réseau qui s'engage à respecter les critères de qualité ou « spécification » des USP mises en banque selon les standards nationaux ou internationaux. Ce réseau a été crée en 1999 et depuis 2005, il est piloté par l'ABM. Il regroupe 28 maternités autorisées et 7 établissements (banques) dont 4 établissements français du sang (EFS) (Besançon, Bordeaux, Créteil, Rhône Alpes), 2 CHU (Paris Saint Louis, Montpellier) et l'institut Paoli Calmette à Marseille (Figure 14). Ces banques ont été choisies pour 1) organiser les prélèvements en collaboration avec les maternités, 2) contrôler et sécuriser les dons qui leur sont confiés en collaboration avec les laboratoires partenaires, et 3) stocker les prélèvements conformes. Ceux-ci sont alors enregistrés sur le registre FGM et sont mis à la disposition des patients qui en ont besoin.

La banque de sang de cordon de Saint Ismier (Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire (UMTCT), EFS Rhône Alpes- CHU de Grenoble) a débuté son activité en janvier 2009. Elle a construit son référentiel de qualité en collaboration avec la banque de Lyon. Les USP transformées et conservées dans ces 2 banques seront à long terme stockées sur le site d'Annemasse ; les 3 sites constituent la banque de sang de cordon EFS Rhône-Alpes.

Les exigences de qualité imposées par la réglementation française (bonnes pratiques, loi de bioéthique, recommandations du RFSP) ont permis à la France d'intégrer la fondation internationale Netcord[163] qui regroupe l'ensemble des banques accréditées à travers le monde (Figure 15). Elle a pour missions d'harmoniser les bonnes pratiques, d'évaluer les résultats cliniques et de coordonner les connaissances sur l'immunologie et l'hématopoïèse du sang de cordon[163] . L'importance de ce type de regroupement international est vraiment indispensable au bon déroulement des allogreffes d'USP à travers le monde. En effet, une récente étude a mis en évidence une grande disparité des pratiques et de la qualité des USP au niveau mondial et a montré que seules 55 % des USP produites n'engendraient aucun risque pour le receveur et pas moins de 10 % de ces USP présentaient un risque avéré (McCullough *et al.*[93]).

Cette fondation, en collaboration avec la Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy (FACT) a établi des standards internationaux de qualité spécifiques au traitement du sang de cordon (International Standards for Cord Blood Collection, Processing, Testing, Banking, Selection and Release[156]) qui sert d'outil pour développer et mettre en place le programme d'accréditation FACT/Netcord. Ces exigences de qualité s'imposent tout au long du procédé conduisant à la mise en banque d'une USP: information, sélection des donneuses, recueil du consentement, prélèvement, réception, transformation (réduction de volume, congélation), contrôles cliniques et biologiques, stockage, cession et transport (Figure 13).

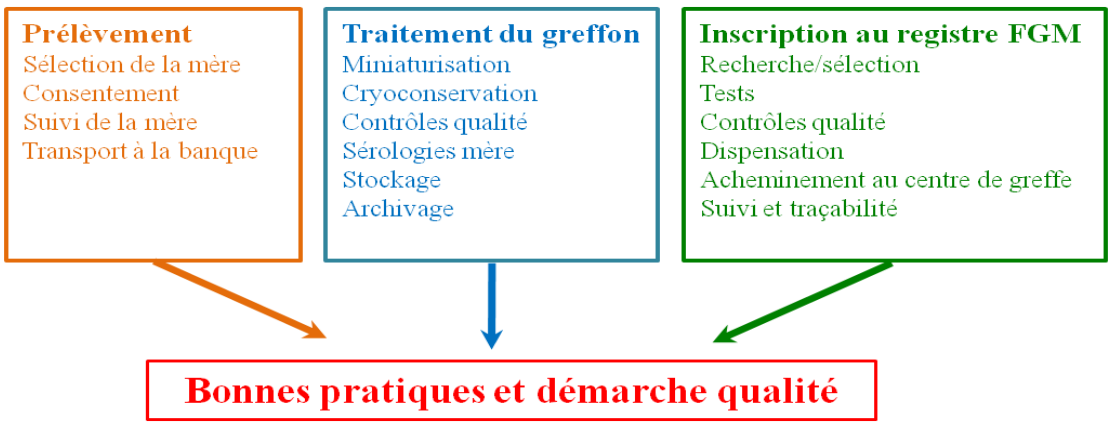


Figure 13. Principales étapes du procédé de mise en banque d'une unité de sang placentaire (D'après Navarrete *et al.*[99]).

D’après le rapport d’activité de l’ABM, au 31 décembre 2009, le RFSP a cryoconservé 8501 USP (418000 USP sont conservées dans l’ensemble des banques internationales) et a fourni 927 USP pour usage thérapeutique à travers le monde[151] . Ces chiffres place la France au 1er rang européen et au 2ème rang mondial des pays fournisseurs d’USP (Figure 15), mais pour les besoins nationaux, les greffons sont majoritairement trouvés sur les registres étrangers (64% des greffons).

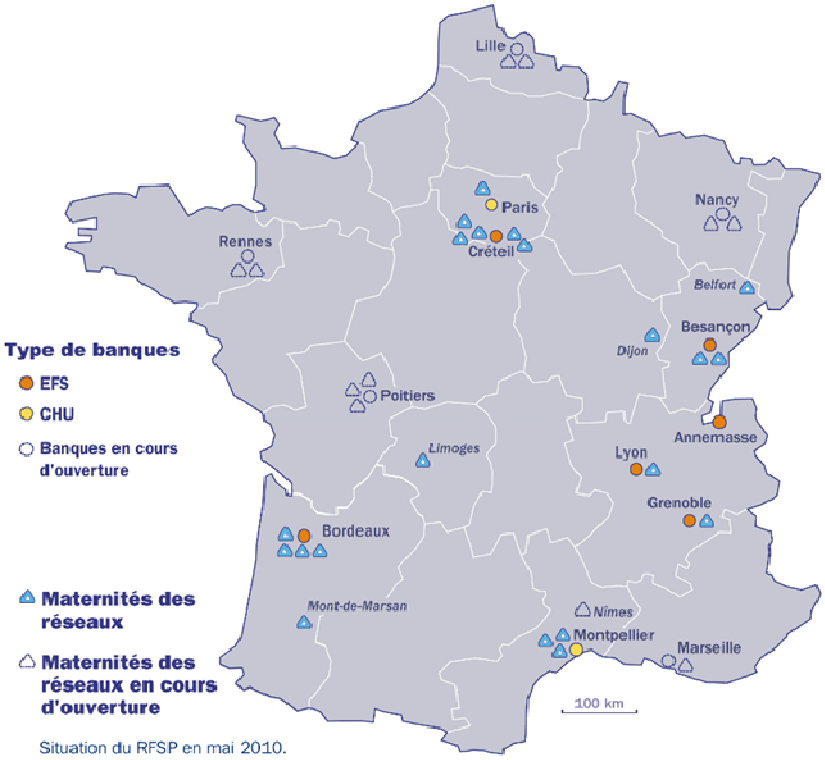


Figure 14. Carte du Réseau Français du Sang Placentaire (RFSP) (2009)

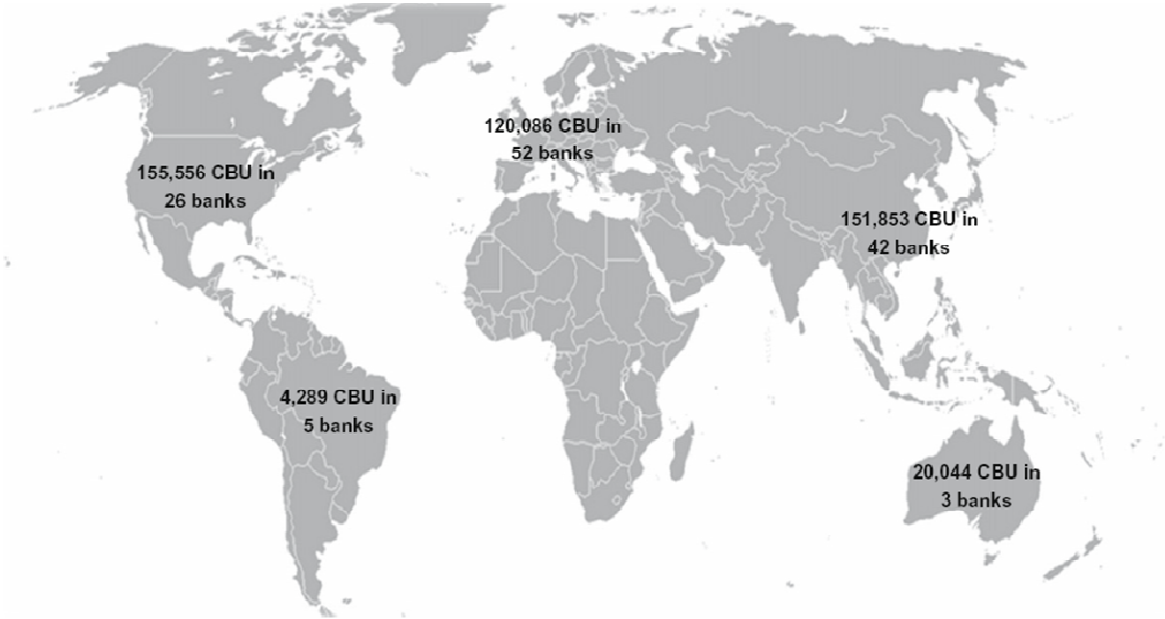


Figure 15. Distribution continentale des banques allogéniques d'USP au 1er janvier 2009 (D'après Katz *et al.)*

4.3. Quelles spécifications pour les USP ?

Des contrôles qualité (cliniques et biologiques) sont réalisés tout au long du processus de mise en banque, du prélèvement jusqu'à la cession (entretien prénatal, prélèvement, transformation, stockage, transport...) (Figure 16).

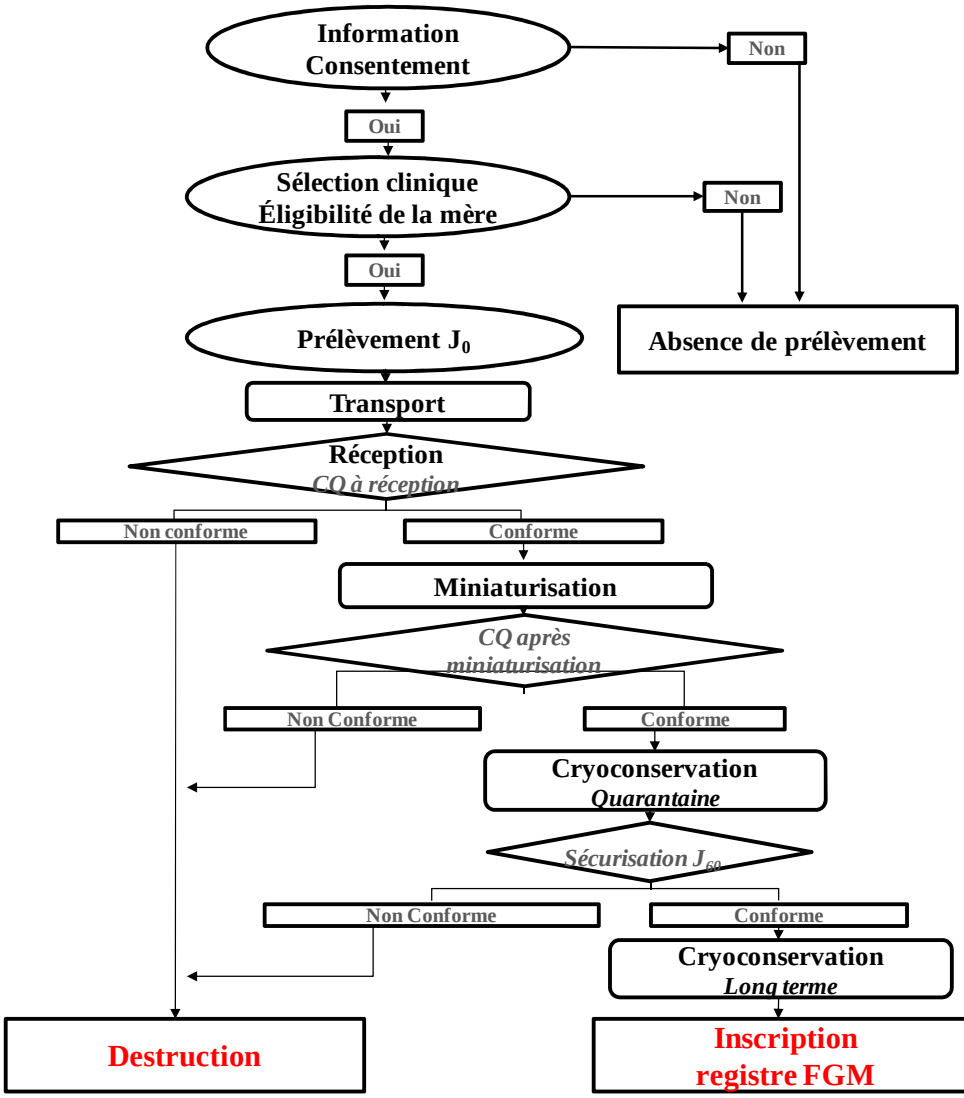


Figure 16. Du prélèvement à l'inscription au registre des donneurs de MO France Greffe de Moelle: les étapes de traitement d'une unité de sang placentaire au sein d'une banque.
CQ : contrôle qualité

Dans les maternités, offrant la possibilité de donner le sang de cordon ombilical, une information est faite à toutes les mères donneuses potentielles, lors d'un entretien prénatal au 7ème mois de grossesse. Suite à cette information, le corps médical recueille le consentement

éclairé et signé de la mère, en s'assurant que cette dernière a compris tous les termes du don (volontaire, gratuit et anonyme).

4.3.1. Spécifications à réception

Pour chaque USP réceptionnée par la banque de sang de cordon, les contrôles suivants sont réalisés :

– Un contrôle de cohérence, c'est-à-dire, la vérification de la cohérence d'identification entre l'USP prélevée, les échantillons sanguins de la mère donneuse et la documentation relative au prélèvement.

– Un contrôle de l'éligibilité de la mère donneuse, c'est-à-dire la vérification de l'absence de contre-indications liées à la mère, au père et à la fratrie du nouveau-né (Annexe I). Ce contrôle est réalisé à partir d'un questionnaire rempli par la mère au moment de l'entretien prénatal.

– Un contrôle de l'éligibilité du nouveau-né, c'est-à-dire la vérification de l'absence de contre-indications liées au nouveau-né (Annexe I). Ce contrôle est réalisé à partir d'une qualification néonatale établie par le pédiatre (Annexe II).

4.3.2. Spécifications pour une entrée en production

Selon les recommandations du RFSP, seules les USP acheminées vers la banque en moins de 24 heures peuvent entrer en production.

L'entrée en production des USP est également fonction du volume prélevé (> 70 ml) ou du nombre de cellules nucléées totales (CNT > 9×10^8) et/ou de CSH-CD34+ mesurées à la réception.

À l'UMTCT, la valeur de CSH-CD34+ attendue pour une entrée en production est supérieure à $2{,}2 \times 10^6$ cellules.

4.3.3. Spécifications en cours de procédé

L'étape de réduction de volume ou « miniaturisation » permet d'obtenir, par concentration et extraction des cellules nucléées, une USP de volume limité et standardisé permettant d'augmenter les capacités de stockage des banques, tout en conservant leur qualité (Armitage *et al.*[1] ; Rubinstein *et al.*[121]).

Au terme de cette étape, seules les USP contenant un nombre de CNT > 5×10^8, un nombre de CSH-CD34+ > $1,8 \times 10^6$ et une viabilité cellulaire > 85%, sont reconnues conformes et aptes à être congelées pour un stockage en quarantaine. Une numération des érythroblastes est systématiquement réalisée.

Afin de s'assurer de l'absence de contamination microbiologique au cours du procédé, des analyses bactériologiques (aérobie et anaérobie) sont réalisées sur l'USP miniaturisée.

Le bon déroulement de la congélation est validé après édition d'une courbe de descente en température.

4.3.4. Spécifications de conservation en quarantaine

Une USP est conservée en quarantaine jusqu'à l'étape de sécurisation à condition que les spécifications suivantes soient conformes aux recommandations.

4.3.4.1. Spécifications infectieuses

Dans le cadre réglementaire de l'allogreffe[154] , le dépistage des maladies transmissibles est réalisé à J0 sur un échantillon du sang de cordon et sur un échantillon de sang maternel.

Seules les USP dont les sérologies suivantes sont négatives seront conservées en quarantaine : Ac anti HIV 1+2 et Ag p24 ou ARN HIV, Ac anti VHC, Ag HBs, Ac anti HTLV I, syphilis (TPHA + VRDL).

Seules les USP dont les sérologies maternelles citées ci-dessous sont négatives seront conservées en quarantaine : Ac anti HIV 1+2 (2 techniques) et Ag p24 ou ARN HIV, Ac anti VHC, Ag HBs, Ac anti HTLV I et syphilis (TPHA + VRDL). Aucune séroconversion toxoplasmose, CMV ou EBV en cours de grossesse ne doit être mise en évidence.

D'autres recherches peuvent être demandées selon les réponses au questionnaire médical (paludisme, Chagas, Virus du Nil).

4.3.4.2.Spécifications hématologiques

Afin de s'assurer de l'absence d'anomalies de l'hémoglobine (Hb) du nouveau-né, une électrophorèse de l'Hb du sang de cordon est réalisée à J0.

Un groupage sanguin (ABO, Rhésus) et les typages HLA-A et B générique (classe I, basse résolution) et HLA-DRBI allélique (classe II, haute résolution) sont également réalisés sur le sang de cordon.

La recherche d'agglutinines irrégulières sur le sang maternel doit être négative (hors anticorps naturels non hémolysants et anti-D).

4.3.5. Critères libératoires

4.3.5.1.Sécurisation

Deux mois après le prélèvement (J60), la mère et l'enfant sont convoqués pour une visite médicale. Au cours de cette visite, une sécurisation à la fois clinique (vérification de l'état de santé de la mère et de l'enfant) et biologique (contrôle des sérologies maternelles) est réalisée. Cette étape de sécurisation permet de s'assurer qu'aucun évènement clinique indésirable ne se soit présenté chez la mère et l'enfant. Le contrôle des sérologies doit confirmer l'absence de séroconversion de la mère (HIV, HBV, HCV, HTLV, syphilis, toxoplasmose, CMV, EBV) au cours de la grossesse.

Un certificat post-natal est établi par le médecin ou le pédiatre qui suit l'enfant et assure que l'état de santé de l'enfant est conforme à la conservation de l'USP pour une utilisation thérapeutique.

4.3.5.2.Typage HLA

Un typage HLA classe I est réalisé sur un échantillon de sang maternel, à J60, afin de vérifier la filiation de l'USP.

En résumé, les étapes validation définies à l'UMTCT se font en 3 temps (Figure 17):

– **A J0** : conformité des critères cliniques (mère, père, fratrie et nouveau-né) et de production.

– **A J15** : conformité des analyses bactériologiques, sérologiques et hématologiques permettant la conservation de l'USP en quarantaine.

– **A J60** : conformité du contrôle sérologique de la mère, de l'état clinique de la mère et de l'enfant, et de la cohérence des typages HLA de la mère et de l'USP.

A la fin de ces 3 étapes, l'USP est transférée informatiquement dans le stock "produits conformes". Elle peut alors être inscrite sur le registre FGM.

4.3.6. Spécifications lors de la cession

Lors de la cession d'une USP à un centre greffeur, la banque réalise un contrôle ultime de l'USP avant sa distribution sur un échantillon de l'USP congelée. Ce contrôle comporte un typage HLA classe I et une viabilité cellulaire. Un contrôle fonctionnel est réalisé sur un échantillon décongelé.

Comme nous venons de le voir, les banques du RFSP doivent respecter les spécifications imposées par la réglementation française lors de la mise en banque des USP. Ces exigences de

qualité s'imposent tout au long du procédé de conservation d'une USP à usage thérapeutique. Chaque banque doit donc valider, en interne, le procédé qu'elle utilise.

L'objectif de ce travail a donc été d'évaluer le procédé de mise en banque des USP à usage thérapeutique utilisé au sein de la banque de Saint Ismier (Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire (UMTCT), EFS Rhône Alpes/CHU de Grenoble) et de cibler les points d'amélioration à apporter en vue d'une demande d'accréditation internationale (FACT).

	Spécifications attendues pour les USP en quarantaine	**Spécifications attendues pour l'inscription sur le registre FGM**
Production	CNT > 5×10^8 CSH-CD34+ > 5×10^8 Viabilité > 85% Conformité courbe de descente en température	
Bactériologie	Bactériologie négative	
Hématologie	*Mère* : absence d'agglutinines irrégulières *USP* : Groupage ABO/rhésus et absence d'anomalies de l'Hb (hétérozygotie si drépanocytose/thalassémie)	
Virologie	*Sérologies maternelles conformes*: Négativité HIV, VHC, CHB, HTLV, syphilis Absence d'IgM isolées EBV, Toxoplasmose, CMV *Sérologies USP conformes*: Négativité HIV, VHC, CHB, HTLV, syphilis	*Contrôle des sérologies maternelles conforme*: Négativité HIV, VHC, CHB, HTLV, syphilis Absence d'IgM isolées EBV, Toxoplasmose, CMV
HLA	*USP* : typage HLA classe I (A, B) et II (DR)	*Mère* : typage HLA classe I cohérent avec celui de l'USP
Clinique	Absence de contre-indications au prélèvement Etat de santé du nouveau-né avant le 8ème jour compatible	Absence d'évènement médical chez la mère et/ou le nouveau-né dans les 2 mois suivants le prélèvement
Documents	Consentement signé Questionnaire médical conforme Qualification néonatale Fiche technique de prélèvement Fiche de transport	Qualification post-natale

Figure 17. Critères de qualification nécessaires à la validation et libératoires pour l'inscription d'une USP sur le registre FGM.

Nous avons évalué le procédé de mise en banque des USP à usage thérapeutique utilisé au sein de la banque de sang de cordon de Saint Ismier (Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire (UMTCT), EFS Rhône Alpes) en réalisant une étude rétrospective de la conformité des USP prélevées par les maternités, miniaturisées et congelées dans cette banque, entre le 1er janvier 2009 et le 1er juillet 2010. L'évaluation a porté sur les critères cliniques et biologiques des mères donneuses et des nouveau-nés dont le sang de cordon a été prélevé ainsi que sur la qualité des prélèvements et le procédé de transformation des USP. Les données ont été recueillies à partir du logiciel de traçabilité de l'UMTCT.

1. Critères cliniques et biologiques

1.1. Critères cliniques

Au cours de l'entretien médical prénatal, les mères donneuses ne remplissant pas les critères de sélection définis par le RFSP selon les recommandations de sociétés savantes (SFGM-TC, pédiatres, gynécologues...) ne sont pas retenues pour un prélèvement de sang de cordon. Ces critères regroupent l'absence de contre-indications liées à la mère, au père et à la fratrie du nouveau-né (Annexe I).

À la naissance, les pédiatres de la maternité vérifient l'absence de contre-indications liées au nouveau-né et réalisent une qualification néonatale (Annexe II). La qualification postnatale est réalisée par les pédiatres ou médecins qui suivent l'enfant, lors d'une seconde visite médicale à J60.

1.2. Critères biologiques

Les contrôles biologiques sont réalisés sur des échantillons de sang maternel au moment du prélèvement de sang de cordon et 60 jours après l'accouchement (sécurisation). Ils

comprennent la recherche d'agglutinines irrégulières et l'analyse des maladies transmissibles (HIV de types 1 et 2, VHB, VHC, HTLV de types 1 et 2, syphilis, toxoplasmose, EBV et CMV).

Un typage HLA est réalisé sur le prélèvement de sang maternel à J60 afin de vérifier la filiation de l'USP.

Les contrôles biologiques suivants sont également réalisés sur le sang de cordon à J0: sérologie et recherche d'anomalies de l'hémoglobine.

Les raisons suivantes conduisent systématiquement à une exclusion des USP :

- sérologies des mères donneuses ou du sang de cordon positives à J0 et/ou J60 selon les critères libératoires précédemment définis (Figure 17).
- mise en évidence d'agglutinines irrégulières.
- mise en évidence d'anomalies de l'hémoglobine selon les critères libératoires précédemment décrits (Figure 17).

2. Qualité du prélèvement

2.1. Spécifications attendues

Les prélèvements de sang de cordon ombilical ont été réalisés entre le 1er janvier 2009 et le 1er juillet 2010, uniquement dans les maternités conventionnées avec l'UMTCT. Au moment de notre étude, 4 maternités étaient agrées avec cette banque: l'hôpital Couple Enfant (HCE) du CHU de Grenoble, la clinique Belledonne (Saint Matin d'Hères), l'hôpital d'Annemasse (Haute Savoie) et l'Hôpital privé Savoie Nord.

Le volume prélevé est défini comme le volume total à réception, à l'exclusion du volume d'anticoagulant CPD (Citrate Phosphate Dextrose). Il est déterminé, au moment de la réception, par pesée et déduction du poids d'une poche vide (tare de 54g, poches de prélèvement MSC1202PU, Macopharma).

Selon les recommandations du RFSP, à réception, seules les USP dont le volume était supérieur à 70 ml et/ou le nombre de CNT (> 9×10^8 CNT) et de cellules CD34+ suffisant (> $2{,}2 \times 10^6$ cellules CD34+) ont été retenues pour la suite du procédé.

En cas de volume à réception compris entre 40 et 70 ml, une numération des CNT a été réalisée et les USP contenant moins de 9×10^8 CNT et/ou moins de $2{,}2 \times 10^6$ cellules CD34+ ont été exclues, les autres ont été retenues pour la suite du procédé.

2.2. Contrôles qualité du produit entrant et du produit fini

Les contrôles qualité de numération et de viabilité sont réalisés dans le laboratoire de contrôle qualité de l'UMTCT.

La numération des CNT est réalisée sur un automate d'hématologie (ABX Pentra 60, Horiba Medical). Le nombre de cellules CD45+ est mesuré, par méthode simple plateforme, à l'aide des marqueurs anti-CD45-FITC/anti-IgG1-PE (Beckman Coulter, A07782 et A07796).

La viabilité est obtenue par mesure de l'incorporation de l'actinomycine D (7-AAD, Becton Dickinson, A555816).

Le nombre de cellules CD34+ viables est mesuré, après exclusion des cellules mortes, par cytométrie en flux (FACS/logiciel CELLQuest Pro), en simple plateforme, selon les recommandations de l'International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) (Gratama *et al.*[46]). Cette quantification est réalisée avec étalon interne (billes calibrées Truecount, 340334, Beckton Dickinson), à l'aide des marqueurs anti-CD34-PE (Beckman Coulter, A07776) et anti-CD45-FITC (Beckman Coulter, A07782).

Un contrôle bactériologique est réalisé sur un échantillon de sang de cordon après l'étape de réduction de volume (flacons à hémoculture Bactec Plus Aerobic/F® et Bactec Lytic/10 Anaerobic/F®, Becton Dickinson, Cockeysville, MD).

3. Méthodes de transformation

3.1. Étape de réduction de volume

Le procédé de réduction de volume ou "miniaturisation" des USP mis en place à la banque de Saint Ismier est celui précédemment décrit par Rubinstein *et al.* (Rubinstein *et al.*[121]). Il consiste en une concentration par extraction des cellules nucléées, en présence d'HES (hydroxyéthyl amidon) à une concentration finale de 0,2% (AMM n°662650, GRIFOLS, Barcelone, Espagne). L'HES est utilisé pour accélérer la sédimentation des globules rouges (GR) en augmentant leur poids et ainsi faciliter la séparation. La miniaturisation est réalisée à l'aide de l'automate SEPAX S-100 (Biosafe SA, Eysins, Suisse ; Kits SEPAX CS530.3) et selon un programme de traitement défini (UCB-HES V192). L'automate SEPAX permet de séparer les érythrocytes (poche dédiée GR) et le plasma (poche dédiée PLASMA) des cellules nucléées du sang de cordon, appelées « buffy coat » (Figure 18).

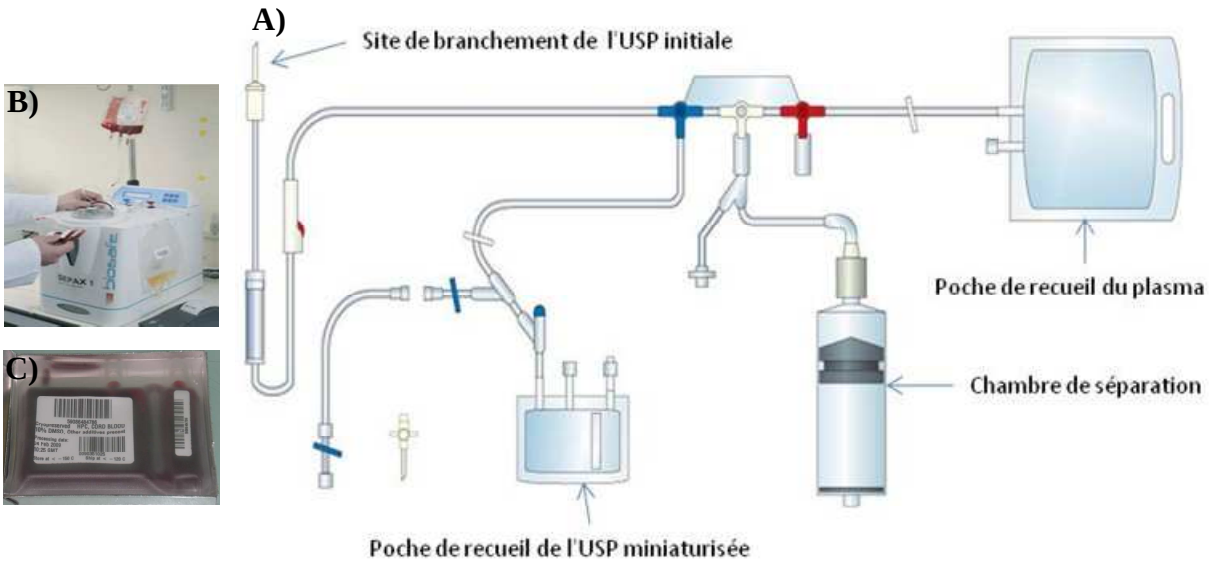


Figure 18. **A)** Kit Sepax pour réduction de volume par séparation cellulaire en système clos (volume final standard de 20 ml); **B)** Automate de miniaturisation (Sepax) ; **C)** USP miniaturisée.

Le procédé de miniaturisation a été automatisé par l'entreprise Biosafe (Eysins, Suisse). Le transfert de technologie à la banque de Saint Ismier a été réalisé en 2 étapes successives :

– la première étape de test a été réalisée sur 4 USP, pour lesquelles, le rendement en CNT (avant/après miniaturisation) et la viabilité ont été calculées.

– la deuxième étape consiste en un contrôle continu de la production. Dans ce travail, nous avons réalisé une étude rétrospective des 204 USP contrôlées entre le 1er janvier 2009 et le 1er juillet 2010. Les rendements en CNT et en cellules CD34+ ainsi que la balance des volumes et des CNT, ont été calculés pour chacune de ces USP.

La balance des volumes (%) permet de s'assurer qu'aucune perte de volume ne se soit produite au cours du procédé. Pour cela, on s'assure que les volumes des poches de GR, de plasma et de buffy coat recueillies correspondent au volume initial avant miniaturisation. Le même principe est appliqué pour s'assurer d'une perte minimale de CNT au cours du procédé (balance des CNT).

$$\textit{Balance des volumes (\%)} = [(V_{GR} + V_{PLASMA} + V_{BUFFY}) / (V_{INITIAL})] \times 100$$

$$\textit{Balance des CNT (\%)} = [(CNT_{GR} + CNT_{BUFFY}) / (CNT_{INITIAL})] \times 100$$

Les rendements doivent être optimisés car au terme du procédé de miniaturisation, seules les USP contenant un nombre de CNT > 5×10^8 et un nombre de cellules CD34+ > $1{,}8 \times 10^6$ sont congelées et conservées.

3.2. Étape de congélation

Le buffy coat (20ml), recueilli dans des poches spécifiques adaptées à la congélation, est additionné de 5 ml d'un agent cryoprotecteur (55% DMSO (dimehtylsulfoxide) / 5% Dextran 40, Pall Corporation, Washington, USA), de telle sorte que la concentration en DMSO finale soit de 10%. Cette étape est réalisée à l'aide de l'automate de réfrigération Coolimx AS-210 (Biosafe SA, Eysins, Suisse), permettant un mélange homogène, à une température contrôlée de 4°C. L'USP est ensuite emballée dans une sur-poche d'emballage spécifique, résistante à la

congélation (Biosafe SA, Eysins, Suisse), puis placée dans une cassette de protection en aluminium (Figure 19.A).

Une poche témoin permet de suivre la descente en température lors de l'étape de congélation. Elle est préparée à l'aide d'une poche identique à celle servant pour le recueil du buffy coat, par ajout d'un mélange de 16 ml d'albumine 4%, 4 ml d'HES et 5 ml de DMSO/Dextran 40 (volume final de 25 ml). Une sonde de température y est insérée.

La congélation est réalisée, selon un programme défini (système DigitCool), consistant en une descente en température progressive de 1 à 2 °C par minute sans variations brusques, jusqu'à une température de -120°C. A la fin de la congélation, la courbe de descente en température est éditée et stockée dans le dossier de lot. L'USP est ensuite transférée dans une cuve d'azote en phase vapeur (air liquide santé, France) pour y être conservée à une température de -150°C (Figure 19.B). Pour la conservation à long terme sur le site d'Annemasse, le stockage sera fait en azote liquide à une température de -196°C.

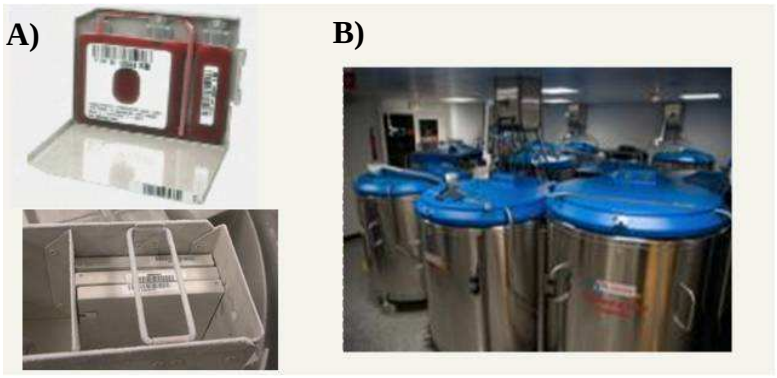


Figure 19. Congélation d'USP. **A**) USP conditionnée en poche de congélation, dans une cassette métallique de protection; **B)** Cuves d'azote en phase gazeuse de conservation des USP congelées.

La courbe de descente en température permet de vérifier que le point critique de cette étape, le point de surfusion, a bien été maîtrisé et que la congélation de l'USP est conforme. Le phénomène de surfusion correspond à la réaction exothermique produite par la cristallisation de l'eau en glace. Cette réaction, qui se produit à une température de -10°C, provoque une augmentation brutale de la température de l'USP. Afin de maîtriser ce réchauffement, un

refroidissement de la cuve est anticipé et programmé par le système informatique qui pilote la descente de température et la congélation.

Ce refroidissement de la cuve a été déterminé en réalisant plusieurs essais de congélation de poches contrôles puis d'USP, dans les mêmes conditions de volume et de quantité d'agent cryoprotecteur, jusqu'à l'obtention d'une courbe de température conforme et reproductible.

3.3. Validation du procédé de congélation

Lors de la cession d'une USP à un centre greffeur, la banque responsable de cette étape réalise un ultime contrôle de son typage HLA (échantillon congelé), de la viabilité cellulaire, du nombre de CNT, du nombre et de la fonctionnalité des cellules CD34+ après décongélation. L'USP est acheminée, congelée dans un container à d'azote en phase gazeuse, vers le centre greffeur, dont la banque associée sera chargée de la décongélation. Cette procédure ne permet donc pas d'échantillonner l'USP avant son départ de la banque fournisseuse. Au sein de la banque de Saint Ismier, trois échantillons sont utilisés pour la réalisation de l'ultime contrôle qualité. Ils correspondent à un raccord de tubulure, contenant environ 150-200µL de sang placentaire (1 cm de longueur), désolidarisé de la poche, étiqueté et emballé avec la poche d'USP (= mini-échantillon) (Figure 20). Ce mini-échantillon subit la même procédure de congélation que l'USP.

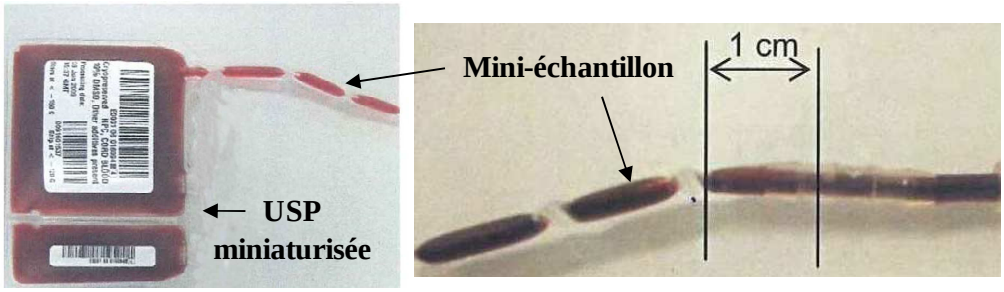


Figure 20. USP miniaturisée accompagnée de ses 3 mini-échantillons nécessaires à la réalisation de l'ultime contrôle qualité.

Afin de valider le procédé de congélation, une décongélation d'USP non conformes est réalisée à des intervalles réguliers.

Nous avons analysé 12 USP non conformes cryoconservées selon le procédé précédent. Ces USP, chacune accompagnée de ses 3 échantillons ont été décongelées selon la procédure suivante : à la sortie du container d'azote gazeux, l'USP a été laissée à T° ambiante pendant 5 minutes, décongelée dans un bain marie à 37°C puis diluée au tiers dans de l'albumine 4% (Vialebex® 40mg/mL solution injectable 100 ml, LFB, France). Cette dernière dilution permet de maintenir une viabilité satisfaisante des cellules pendant 4 heures.

Pour valider le procédé de congélation réalisé à la banque de Saint Ismier, nous avons calculé les rendements en CNT et en cellules CD34+ ainsi que la viabilité des cellules totales et mononuclées (CMN) obtenus dans la suspension cellulaire après décongélation de la poche.

D'autre part, afin de valider l'utilisation des mini-échantillons conservés en tubulure comme matériel pour l'ultime contrôle qualité avant cession d'une USP pour un centre greffeur, nous avons réalisé une numération des CNT, des cellules CD34+, la viabilité des cellules totales et mononuclées dans la suspension cellulaire obtenue après décongélation du mini-échantillon. Nous avons comparé ces résultats à ceux mesurés dans la suspension cellulaire obtenue après décongélation de la poche.

4. Analyse statistique

Les résultats de l'analyse descriptive des critères de spécification à la banque de Saint Ismier, sont exprimés en moyenne ± écart-type, médiane, valeurs minimales et maximales.

Après avoir vérifié l'homogénéité des variances par un test de Levene, la comparaison des moyennes a été réalisée à l'aide d'un test de Student pour échantillons appariés (logiciel SPSS. version 18.0.0, 2009). Une valeur de $p < 0,05$ a été retenue comme significative.

Les rendements (%) en CNT et en cellules CD34+ ont été définis comme le rapport des valeurs après miniaturisation (ou décongélation) sur les valeurs avant miniaturisation (ou congélation).

Les comparaisons du nombre de CNT, du nombre de cellules CD34+ et de la viabilité cellulaire entre la suspension cellulaire après décongélation de la poche et du mini-échantillon, a été analysée par régression linéaire et calcul du coefficient de corrélation de Pearson (r) avec un risque alpha de 5% (logiciel SPSS. version 18.0.0, 2009). Une valeur de $p < 0,05$ a été retenue comme significative.

RÉSULTATS

1. Impact des critères cliniques et biologiques dans les étapes de prélèvement/conservation

1.1. Causes de « non-prélèvement » de sang placentaire

Au cours de l'entretien prénatal, les critères de non éligibilité au don placentaire ont été recueillis pour chaque mère donneuse potentielle. Les causes de non prélèvement et les contre indications au moment de l'accouchement, ont été rapportées par les sages-femmes.

Exclusion avant prélèvement		
	Nombre d'USP	*Pourcentage*
Contre indication maternelle	13	12,3
Contre indication nouveau-né	7	6,6
Césarienne en urgence	14	13,2
Hémorragie délivrance	9	8,5
Prélèvement infructueux	7	6,6
Décollement placenta trop rapide	29	27,3
Autres	27	25,5
TOTAL	**106**	**100**

Tableau II. Causes de non éligibilité/exclusion au don de sang placentaire

Au cours de la période étudiée, 106 donneuses potentielles ont été récusées avant le prélèvement. Dans 18,9% des cas, la détection d'une contre-indication clinique détectée lors de l'entretien prénatal ou après avis du pédiatre était à l'origine de l'exclusion.

Dans plus de la moitié des cas (55,6%), le prélèvement n'a pu être réalisé en raison soit du déroulement de l'accouchement (césarienne en urgence, délivrance trop rapide, prise en charge du nouveau-né en urgence) soit d'un problème technique de prélèvement (prélèvement infructueux, cordon ombilical trop court) (Tableau II).

1.2. Causes d'élimination des USP au cours du procédé

Les résultats des contrôles biologiques réalisés, à J0, sur le sang maternel et le sang placentaire sont obtenus dans un délai de 15 jours suivant la mise en banque des USP. Selon les résultats obtenus, des USP qui ont été transformées et congelées peuvent être éliminées.

Exclusion sur critères cliniques et biologiques		
No USP collectées : 554 *No USP miniaturisées : 232*	*Nombre d'USP*	*Pourcentage*
Contre indication clinique mère	12 *9 à réception, 3 après transformation*	2,2
Sérologie positive	12 *11 à J0, 1 à J60*	2,2
TOTAL	**24**	**4,4**

Tableau III. Exclusion des USP sur critères cliniques et biologiques au cours du procédé

Aucune USP n'a été exclue à réception pour des raisons de dossiers incomplets (manque du consentement signé ou du compte-rendu de l'entretien prénatal), de mise en évidence d'une anomalie de l'hémoglobine du sang de cordon ou d'agglutinines irrégulières chez la mère donneuse.

Onze USP ont été éliminées suite à une positivité des sérologies maternelles prélevées à J0.

Neuf USP ont été détruites en raison d'une non conformité clinique de la mère qui a été détectée à réception et non lors de l'entretien prénatal. Seules 3 USP ont été détruites après l'étape de transformation pour des raisons cliniques (Tableau III).

1.3. Sécurisation (J60) et conservation des USP

Lors de la visite de sécurisation, à J60, de nouveaux contrôles biologiques sont réalisés sur le sang maternel. Selon les résultats obtenus, des USP qui sont conformes (transformées et congelées) mais en quarantaine peuvent être éliminées.

USP conformes en quarantaine		
No USP collectées : 554 *No USP miniaturisées : 232*	*No d'USP*	*(%) USP totales*
Conformes *attente sécurisation*	27	4,9
Conformes *attente qualification néonatale*	4	0,7
Conformes *mères relancées pour J60*	48	8,7

Tableau IV. Causes de mise en quarantaine des USP conformes

Une seule USP a été détruite suite à une positivité des sérologies maternelles prélevées à J60. Parmi les USP conformes, miniaturisées et congelées, 43% étaient toujours en quarantaine (n = 79). Plus d'un tiers étaient en attente des résultats de sécurisation (n = 27). Cela concernait principalement les USP prélevées aux mois de mai et juin 2010, USP pour lesquelles les résultats de sécurisation n'étaient pas encore disponibles lors du recueil des données.

Pour les deux tiers restants, les mères donneuses (n = 48) ne s'étaient pas présentées à la visite de sécurisation prévue à J60 et ont été relancées par courrier (Tableau IV).

Quatre USP étaient encore en quarantaine 4 mois après le prélèvement car la qualification néonatale n'avait pas été réalisée et/ou envoyée par le pédiatre au moment de l'accouchement.

2. Évaluation de la qualité du produit entrant

2.1. Qualité cellulaire

Entre le 1er janvier 2009 et le 1er juillet 2010, 554 USP ont été prélevées et réceptionnées par la banque de Saint Ismier (272 USP en 2009 et 282 USP du 1er janvier au 1er juillet 2010).

Depuis le 1er janvier 2009, début de l'activité de l'UMTCT, et jusqu'à la fin du mois d'avril 2010, seule la maternité de l'HCE du CHU de Grenoble effectuait des prélèvements. Elle était donc la maternité la plus représentée au niveau de notre étude et a été à l'origine de 88% des

prélèvements avec une moyenne de 27 prélèvements par mois. A partir du mois de mai 2010, la maternité de Belledonne a débuté les prélèvements. Les maternités d'Annemasse et de l'Hôpital Savoie Nord ont débuté les prélèvements à partir du mois de juin 2010 (Figure 21).

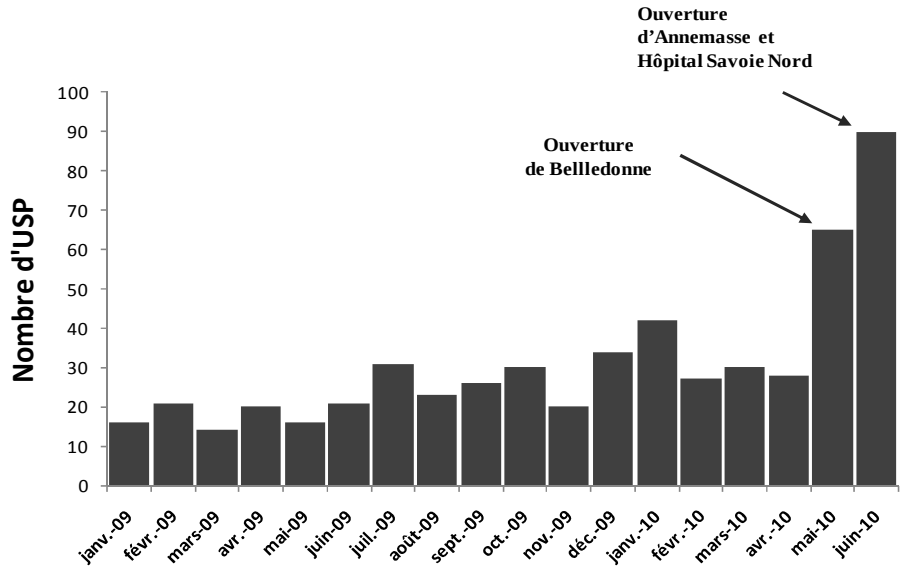


Figure 21. Évolution du nombre d'USP prélevées entre le 1er janvier 2009 et le 1er juillet 2010

Parmi les 554 USP prélevées par ces 4 maternités, 313 USP (56,5 %) ont été éliminées à réception car elles ne correspondaient pas aux spécifications attendues. En raison de la bonne corrélation entre le nombre de CNT contenues dans une USP et son volume ($r = 0,759$, $p < 0,001$, résultat non montré), nous avons regroupé ces 2 causes d'exclusion (Tableau V).

Elimination du produit entrant

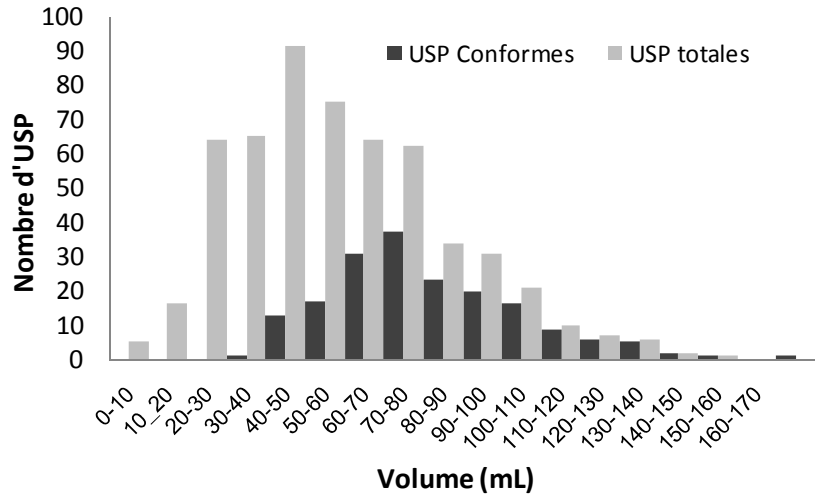
No USP collectées : 554	*No d'USP non conformes*	*(%) USP totales*
Volume insuffisant/ No CNT insuffisant	278	50,2
No cellules CD34+ insuffisant	31	5,6
Délai > 24h	4	0,7
TOTAL	**313**	**56,5**

Tableau V. Causes de destruction des USP à réception.

La majorité des USP prélevées (50,2%) ont été détruites à réception en raison d'un volume prélevé insuffisant et/ou d'un nombre de CNT insuffisant (Tableau V). Le volume moyen à réception était de 60,1 ml ± 27,4 ml (n = 554 ; médiane = 55,2 ml). Le volume moyen des

USP non conformes détruites (n = 322) était en effet de 49,3 ± 21,4 ml, tandis que celui des USP conformes était de 82,2 ± 24,9 ml (Figure 22.A).

A)



B)

	Prélèvements		Volume prélevé (mL)	
Total USP prélevées : 554	*No*	*% des USP prélevées*	*Moyenne sD*	*Médiane*
HCE Grenoble	487	87,9	59,0 26,3	54,8
Belledonne	36	6,5	61,2 23,0	59,5
Annemasse	21	3,8	80,6 47,2	70,9
Hôpital Savoie Nord	10	1,8	67,3 26,1	67,1

Figure 22. A) Répartition des USP réceptionnées par volume; **B)** Nombre d'USP prélevées et volume moyen de prélèvement par maternité préleveuse.

En analysant ces volumes, nous avons observé une grande disparité selon la maternité préleveuse (moyennes de 59,0 à 80,6 ml) : l'HCE du CHU de Grenoble a fourni les USP de plus petit volume (59 ml en moyenne) comparativement aux autres maternités (Figure 22).

L'analyse approfondie des prélèvements réalisés par l'HCE de Grenoble a révélé que malgré une augmentation du nombre d'USP prélevées, qui a plus que doublé entre les mois de janvier 2009 (16 prélèvements) et juin 2010 (37 prélèvements), il n'y a pas eu d'augmentation du volume prélevé au cours du temps. La pratique et l'apprentissage semblent donc influer sur le nombre de prélèvements réalisés mais pas sur la qualité de ces prélèvements (Figure 23).

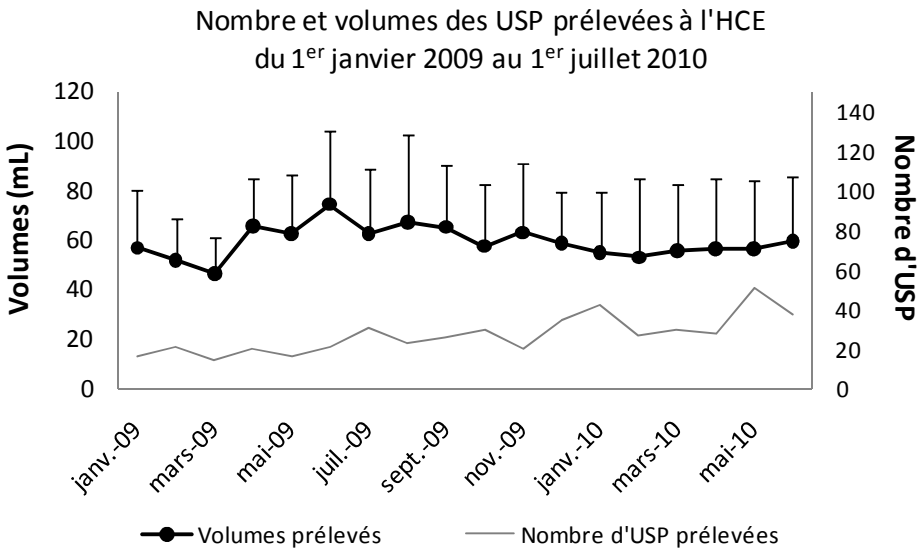


Figure 23. Nombre et volumes (ml) des USP prélevées à l'HCE entre le 1er janvier 2009 et le 1er juillet 2010.

2.2. Délai d'acheminement

Seules 4 USP réceptionnées ont été exclues en raison d'un délai d'acheminement vers la banque supérieur à 24 heures. Nous n'avons montré aucune différence en terme de délai d'acheminement entre les USP détruites, conformes et inscrites sur le registre FGM (Tableau VI).

	Délai d'acheminement (h)		
Total USP Miniaturisées : 232	*No*	*Moyenne ± sD*	*Médiane*
Détruites avant miniaturisation	322	17,6 ± 16,7	12,3
Détruites après miniaturisation	50	18,4 ± 16,7	15,0
Conformes	79	16,5 ± 13,6	13,0
Inscrites FGM / Cédées	103	17,6 ± 16,3	13,7

Tableau VI. Délais d'acheminement des USP répartis selon leur devenir.

Cependant, parmi les USP réceptionnées par la banque de Saint Ismier, 47 ont été acheminées dans un délai compris entre 24 et 48 heures. Parmi elles, 20 n'ont pas été détruites et ont été reconnues conformes (10 inscrites sur le registre de FGM, 6 en attente de J60 et 4 au stade du phoning).

3. Évaluation de la qualité cellulaire du produit fini

3.1. Validation de l'étape de réduction de volume

Lors des premiers essais, nous avons obtenu, au cours de l'étape de miniaturisation sur l'automate SEPAX, un volume standardisé et reproductible de 20 ml, une bonne récupération des cellules avec un rendement en CNT de 80% et une bonne viabilité cellulaire de 96,2%.

	Volume initial (ml)	**Volume final (ml)**	**Rendement CNT (%)**	**Viabilité (%)**
Poche n°1	62,8	20	83,1	97,6
Poche n°2	96,6	20	80,0	99,1
Poche n°3	70,5	20	74,9	95,2
Poche n°4	139,3	20	81,8	92,9
Moyenne ± sD	**92,3 ± 34,5**	**20 ± 0,0**	**80,0 ± 3,6**	**96,2 ± 2,7**

Tableau VII. Résultats des tests de transfert de technologie du procédé de miniaturisation SEPAX (n = 4)

Ce résultat est concordant avec ceux de la littérature (Lapierre *et al.*[76]) mais montre néanmoins une perte cellulaire importante. La viabilité cellulaire n'est pas affectée par ce procédé. L'étude rétrospective des 204 USP contrôlées en routine entre le 1er janvier 2009 et le 1er juillet 2010 a montré un bon maintien des rendements en CNT (89,3 ± 8,6%) et en CD34+ (90,5 ± 11,2%) ainsi qu'une bonne viabilité cellulaire (96,5 ± 3,9%) (Tableau VIII).

	Rendement CNT (%) *N=204*	**Rendement CD34+ (%)** *N=50*	**Balance volumes (%)** *N=143*	**Balance CNT (%)** *N=143*	**Viabilité (%)** *N=204*
Moyenne ± sD	89,3 ± 8,6	90,5 ± 11,2	97,7 ± 5,3	94,5 ± 8,4	96,5 ± 3,9
Médiane	90,5	92,3	97,8	94,8	98,1
Minimum	49,4	68,8	72,7	10,4	77,8
Maximum	106,3	111,8	151,8	270,7	99,7

Tableau VIII. Résultats du contrôle de routine du procédé de miniaturisation des USP congelées entre le 1er janvier 2009 et le 1er juillet 2010.

Les moyennes des balances de volume et de CNT respectivement de 98% et de 95% confirment la bonne maîtrise du procédé au sein de notre banque. Parmi ces 204 USP, seules 6 USP avaient un rendement en CNT < 70%, et une un rendement en cellules CD34+ < 70%. Hormis ces 7 USP, les autres avaient des rendements en CNT et cellules CD34+ convenables. Une anomalie de la balance des volumes a été observée pour une USP (151,8%) qui a été détruite. Concernant la balance des CNT, une USP avait une balance > 110 % et 3 une balance < 70%.

Ainsi, compte tenu de ces rendements en CNT et en cellules CD34+ et afin d'obtenir des USP contenant au moins 5×10^8 CNT et $1,8 \times 10^6$ cellules CD34+, il a été établi au sein de la banque de Saint Ismier, que seules les USP ayant un nombre de CNT > 9×10^8 et de cellules CD34+ > $2,2 \times 10^6$ seraient admises pour le procédé de miniaturisation. L'établissement de ces valeurs seuils permet ainsi de limiter les coûts dus aux procédures de miniaturisation inutiles.

Au terme de l'étape de miniaturisation, sur les 232 USP conformes à réception, 28 USP (12,1%) ont été détruites en raison d'un nombre de cellules CD34+ insuffisant, c'est-à-dire inférieur à $1,8 \times 10^6$ cellules. Sept USP ont été détruites à cause de résultats bactériologiques positifs (Tableau IX).

Causes de destruction du produit fini

No USP miniaturisées : 232	*No d'USP non conformes*	*(%) USP miniaturisées*	*(%) USP totales*
No cellules CD34+	28	12,1	5,0
Bactériologie positive	7	3,0	1,3
TOTAL	**35**	15,1	6,3

Tableau IX. Causes de destruction des USP après l'étape de miniaturisation

Finalement, parmi les 232 USP qui ont été miniaturisées, seules 182 ont été congelées et conservées dans l'azote en phase gazeuse selon notre procédé.

3.2. Validation de l'étape de congélation

La courbe de descente en température, qui est archivée dans le dossier de lot de chaque USP congelée, a été validée au sein de l'UMTCT. Cette courbe montre une bonne maîtrise du réchauffement occasionné par la réaction de surfusion puisque la moyenne de descente en température (pente) qui était de 2 à 3°C/min avant le point de surfusion est conservée à environ 1°C/min après le point de fusion (Figure 24).

Figure 24. Courbe de descente en température validée au sein de l'UMTCT

3.3. Evaluation du procédé de congélation

Cette évaluation a été réalisée en décongelant 12 poches non conformes selon les procédés de préparation d'un greffon thérapeutique.

	Poche congelée	**Poche décongelée**
n = 12	*Moyenne ± sD*	*Moyenne ± sD*
CNT (×10⁸)	8,4 ± 2,8	7,9 ± 3,0
CD 34 + (×10⁶)	1,7 ± 0,5	1,2 ± 0,4
Viabilité totale (%)	96,0 ± 3,3	73,6 ± 9,5*
Viabilité CMN (%)		87,1 ± 6,8
Rendement CNT (%) *avant/après décongélation*		93,9 ± 8,9
Rendement CD34 (%) *avant/après décongélation*		71,0 ± 23,2

Tableau X. Contrôles qualité réalisés sur la suspension cellulaire contenue dans la poche avant congélation et après décongélation.

Le rendement en CNT après décongélation était de 93,9% et celui en cellules CD34+ de 71,0%. La viabilité en CMN était de 87,1%. La viabilité totale était significativement plus basse dans la poche décongelée, avec une valeur de 73,6%, par rapport à une viabilité de 96,0% avant congélation (Tableau X).

Nous n'avons montré aucune corrélation entre le nombre de CNT et le nombre de cellules CD34+ avant congélation (r = 0,012) sur nos 12 échantillons. La corrélation entre le nombre de CNT avant congélation (critère de sélection des USP par le centre greffeur) et le nombre de cellules CD34+ après décongélation (facteur influençant positivement l'issue de la greffe) était faible et non significative (r = 0,540). L'analyse des 232 USP congelées à la banque de Saint Ismier n'a montré qu'une corrélation moyenne entre le nombre de CNT et de cellules CD34+ viables avant congélation (r = 0,701; p < 0,001) (Figure 25).

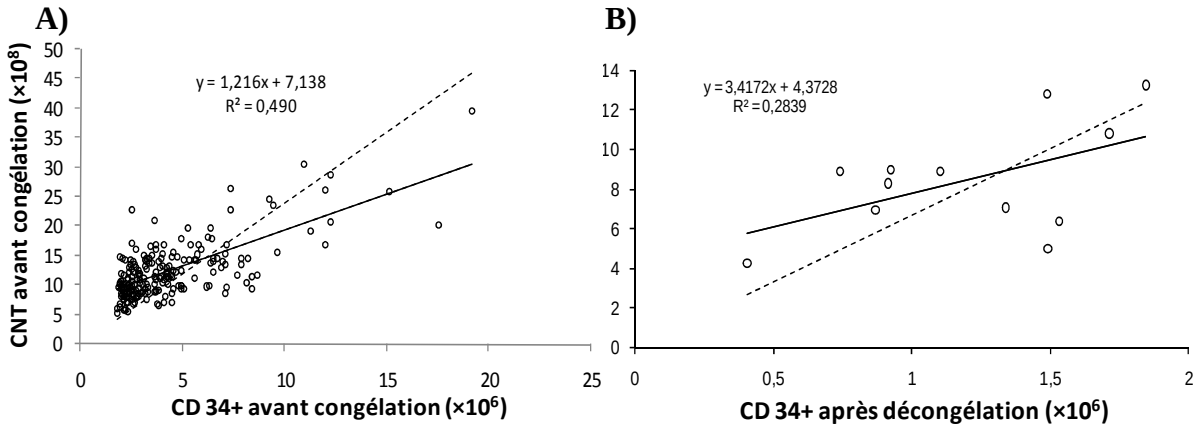


Figure 25. Droites de corrélation entre **A)** le nombre de CNT et de cellules CD34+ avant congélation contenues dans les USP réceptionnées et congelées à la banque de Saint Ismier (r = 0,701 ; p<0,001) et **B)** le nombre de CNT avant congélation et le nombre de cellules CD34+ dans la poche après décongélation (r = 0,54 ; n=12). La ligne en pointillés représente la corrélation parfaite.

3.4. Évaluation du mini-échantillon comme matériel pilote pour l'ultime contrôle

Dans les bonnes pratiques et dans les recommandations du FACT, il est précisé qu'un contrôle doit être réalisé sur un échantillon de la suspension cellulaire conservé dans les mêmes conditions que la poche réservée pour la greffe. Nous avons décongelé un mini-

échantillon selon le procédé de préparation d'un greffon thérapeutique et avons réalisé les mêmes tests que ceux faits sur la poche.

	Poche décongelée	**Echantillon décongelé**
n = 12	*Moyenne ± sD*	*Moyenne ± sD*
CNT (×10^8)	7,9 ± 3,0	8,1 ± 3,2
CD 34 + (×10^6)	1,2 ± 0,4	1,2 ± 0,4
Viabilité totale (%)	73,6 ± 9,5*	56,7 ± 7,9*
Viabilité CMN (%)	87,1 ± 6,8	86,4 ± 6,4

Tableau XI. Contrôles qualité réalisés sur la suspension cellulaire contenue dans la poche et dans le mini-échantillon après décongélation. **p<0,001: test de Student pour échantillons appariés.*

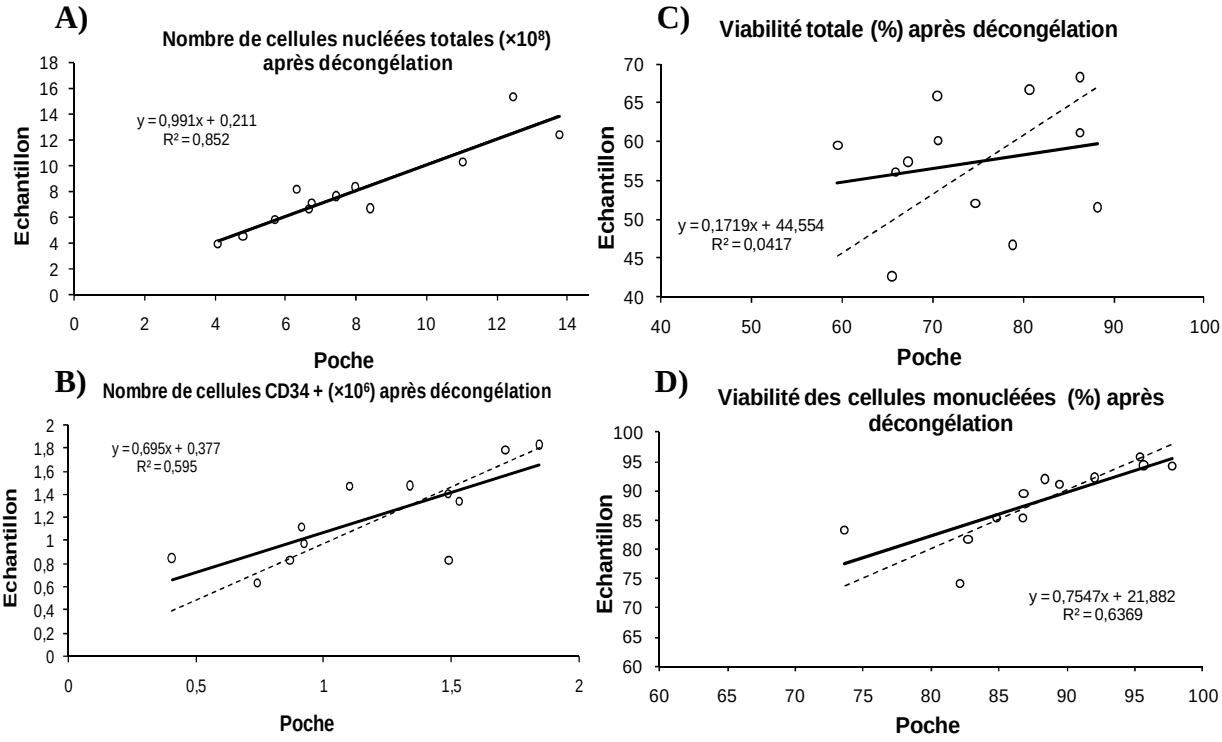


Figure 26. Droites de corrélation entre **A)** le nombre de CNT dans la poche et dans le mini-échantillon après décongélation (r = 0,923, p < 0,001); **B)** le nombre de cellules CD34+ dans la poche et dans le mini-échantillon après décongélation (r = 0,77, p < 0,05); **C)** la viabilité totale (r = 0,204) ; et **D)** la viabilité des cellules mononuclées (r = 0,798, p < 0,05) dans la poche et dans le mini-échantillon après décongélation, (n=12). La ligne en pointillés représente la corrélation parfaite entre les mesures poche / mini-échantillon

Le nombre de CNT, de cellules CD34+ viables et la viabilité en cellules mononuclées étaient significativement corrélés entre la poche et l'échantillon après décongélation (Figure 26).

La corrélation était très bonne pour le nombre de CNT après décongélation ($r = 0,923$; $p < 0,001$) avec une légère surestimation de l'échantillon par rapport à la poche (Figure 26).

La même analyse pour le nombre de cellules CD34+ viables a également montré une bonne corrélation entre la poche et l'échantillon ($r = 0,77$; $p < 0,05$), avec une légère surestimation de l'échantillon par rapport à la poche (Figure 26).

La viabilité totale après décongélation, était en moyenne 1,5 fois plus basse au sein de l'échantillon ($m_{poche}= 25,5 \pm 9,5$; $m_{éch}= 42,6 \pm 7,9$; $p < 0,001$). La viabilité en cellules mononuclées (CMN), quant à elle, était significativement corrélée entre la poche et l'échantillon ($r = 0,798$ $p < 0,05$) (Figure 26).

Ce taux de mortalité est sans doute lié au milieu confiné que représente le segment de tubulure et au fait que la congélation y est beaucoup plus rapide qu'au sein de la poche. Les polynucléaires, qui supportent déjà très mal la congélation, sont alors les premiers à être lysés. Ces résultats soulèvent le manque de pertinence du marqueur viabilité totale. Ce dernier devrait être remplacé par une évaluation de la viabilité des cellules mononuclées.

Ces résultats montrent que le nombre de CNT et le nombre de cellules CD34+ mesurés au sein du mini-échantillon sont bien représentatifs de ceux réellement contenus au sein de la poche décongelée, même si une légère surestimation a pu être notée.

Par contre, seule la viabilité en cellules mononuclées au sein de l'échantillon, et non la viabilité totale, est représentative de celle du contenu de la poche.

3.5. Caractéristiques des USP cryoconservées

Le taux de conformité des USP prélevées entre le 1er janvier 2009 et le 1er juillet 2010 était de 33% et plus de la moitié des USP congelées avaient déjà été inscrites sur le registre FGM (n = 103) (Tableau XII).

Durant la période de notre étude, une USP a été cédée à des fins thérapeutiques pour un patient national (Tableau XII). Depuis le 1er juillet 2010, 2 autres USP ont été cédées à des fins thérapeutiques pour 2 patients européens.

Devenir des USP prélevées

No USP collectées : 554 *No USP miniaturisées : 232*	*No d'USP*	*(%) USP totales*
Détruites *(à réception, après transformation et J60)*	372	67,1
Conformes *attente sécurisation*	27	4,9
Conformes *attente qualification néonatale*	4	0,7
Conformes *mères relancées pour J60*	48	8,7
Inscrites registre FGM	102	18,4
Cession	1	0,2
TOTAL	**554**	**100**

Tableau XII. Résumé du devenir des 554 USP prélevées entre le 1er janvier 2009 et le 1er juillet 2010.

Les USP congelées et conformes contiennent en moyenne 12,5 ± 4,9×10^8 CNT et 4,4 ± 2,7×10^6 cellules CD34+ (Figure 27). La viabilité moyenne des ces USP est de 96,6 ± 3,8 %.

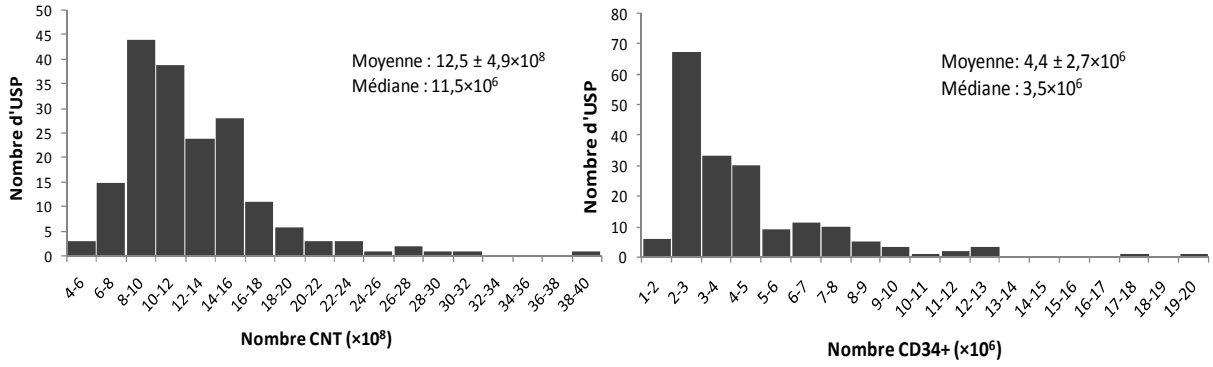


Figure 27. Répartition des USP congelées et conformes au 1er juillet 2010 selon le nombre de CNT et le nombre de cellules CD34+.

DISCUSSION

A partir de notre étude rétrospective, nous avons pu, d'une part valider le procédé de conservation des USP pour un usage de reconstitution hématologique utilisé à l'UMTCT, et d'autre part apprécier la qualité des USP prélevées et conservées. Ce travail ouvre des pistes quant aux améliorations à apporter en vue d'une accréditation FACT. En terme de thérapie régénérative, d'autres paramètres de qualité seraient à prendre en considération, mais aucune indication clinique n'est encore validée dans ce domaine.

Nous avons observé que 67% des USP prélevées durant les premiers 18 mois d'activité de la banque de Saint Ismier étaient éliminées (avant ou après l'étape de miniaturisation), car elles ne répondaient pas aux critères de qualité exigés par le RFSP. Ce résultat concorde avec les données nationales de l'ABM montrant que deux tiers des USP prélevées sur le territoire ne sont pas conformes.

Concernant les prélèvements de sang de cordon, l'ABM avait fixé des objectifs nationaux pour l'année 2010 qui étaient d'obtenir un prélèvement de sang de cordon pour 20% des naissances pour les maternités de niveau 3; 25% pour les maternités de niveau 2 et 30% pour les maternités de niveau 1.

D'après notre étude et malgré la bonne volonté des équipes de sages-femmes, le taux de prélèvement pour la maternité de l'HCE était de 11 % en 2009, ce qui est inférieur au taux de prélèvement national moyen de 19%. Ce résultat s'explique en partie par le manque de personnel, notamment pour la sélection des mères donneuses qui demande du temps aux sages-femmes. En effet, la maternité de l'HCE, qui est une maternité de niveau 3, est confrontée à un nombre de grossesses pathologiques, avec un risque prévisible pour le nouveau-né, supérieur à celui des maternités de niveau 2 (Belledonne et Annemasse) ou de niveau 1 (Hôpital Savoie Nord). Comme nous l'avons montré dans notre étude, de nombreux prélèvements n'ont pu être réalisés à cause d'un mauvais déroulement de l'accouchement

(césarienne en urgence, délivrance trop rapide, prise en charge du nouveau-né en urgence). Les sages-femmes de la maternité de l'HCE ne peuvent donc probablement pas dédier le même temps que les autres maternités au prélèvement de sang de cordon. Il serait donc intéressant d'effectuer une évaluation du "temps sages-femmes" nécessaire, en amont du prélèvement, à l'information, au recueil du consentement et à l'entretien médical prénatal. Ceci ayant pour objectif d'inclure cette activité dans les actes réalisés par les sages-femmes, afin d'obtenir les moyens nécessaires pour augmenter le nombre de prélèvements (objectif 20% des naissances).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que 1) le volume moyen des prélèvements réceptionnés (60 ml) était faible par rapport à la moyenne nationale qui est de l'ordre de 75 ml et que 2) la moitié des prélèvements avaient un volume inférieur à 55,2 ml, ce qui est inférieur au volume médian à réception (64 ml) d'une banque espagnole accréditée FACT (Querol *et al.*[108]). Si le nombre de prélèvements est en augmentation constante, nous n'avons pas observé d'augmentation des volumes prélevés par l'HCE du CHU de Grenoble au cours du temps. L'apprentissage et la maîtrise du prélèvement semblent influer sur le nombre de prélèvements réalisés mais pas encore sur leur qualité. Nous avons également mis en évidence une grande disparité dans les volumes prélevées selon les maternités, avec des volumes moyens allant de 59 à 80,6 ml. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce phénomène. Tout d'abord, l'ouverture des maternités de Belledonne, d'Annemasse et de l'Hôpital Savoie Nord est faite de manière plus structurée que celle de l'HCE qui été la première maternité conventionnée avec l'UMTCT. Les moyens donnés par les établissements de santé, lors de l'ouverture de ces 3 maternités, étaient plus importants. La formation des sages-femmes par le personnel de l'UMTCT a été difficile à faire sur l'HCE étant donné leur nombre important et l'organisation de leur travail au sein de la maternité (les sages-femmes tournent dans les services par cycle).

Comme nous l'avons précédemment discuté, les différences de niveau entre les maternités (1, 2 ou 3) peuvent également expliquer cette disparité dans les volumes prélevés.

Etant donné qu'il existe une corrélation entre le volume et le contenu en CNT, il serait intéressant d'évaluer les pratiques de prélèvements afin de comprendre ces disparités de volumes et d'améliorer la qualité des prélèvements réceptionnés par l'UMTCT.

Pour l'année 2010, l'objectif est de 1000 prélèvements réceptionnés à la banque de Saint Ismier. Or, notre étude a montré qu'au cours des 6 premiers mois de l'année 2010, il y a eu autant de prélèvements que durant l'année 2009. Ceci est dû en partie à l'augmentation du nombre de prélèvement au cours du temps par maternité, comme nous l'a révélé notre étude, mais aussi à l'augmentation du nombre de maternités conventionnées par l'ABM (ouverture de 3 maternités conventionnées avec l'UMTCT au cours de notre étude). Au cours du mois de septembre, deux maternités supplémentaires, le Centre Hospitalier de Valence et la Clinique Drôme Ardèche, ont établi une convention avec l'UMTCT. Ainsi, à la mi-octobre 2010, les 6 maternités conventionnées avaient prélevé 758 USP, nombre en adéquation avec l'objectif de 1000 prélèvements fixé pour l'année 2010. L'ouverture de 2 nouvelles maternités d'ici 2011 (Chambéry, Annecy) permettra probablement d'atteindre les nouveaux objectifs fixés dans les années à venir.

Malgré les faibles volumes recueillis au cours des 18 mois de l'étude, le contenu en CNT et en cellules CD34+ des USP conservées à la banque de Saint Ismier est comparable aux données de la banque de Barcelone (accréditée FACT) au cours de leur 3 premières années d'activité. La qualité de ces USP permettra de réaliser des allogreffes de CSH chez des enfants essentiellement ou chez des adultes en tant que double greffe d'USP, selon les recommandations de doses actuelles (Rocha *et al.* 2009). De plus, la qualité croissante des USP conservées au sein de cette banque espagnole, durant 10 ans d'activité, laisse présager d'une amélioration de la qualité de nos USP durant les années à venir (Querol *et al.*[108]).

Le taux de conformité des USP réceptionnées et traitées par la banque de Saint Ismier entre le 1er janvier 2009 et le 1er juillet 2010 (182 USP conformes pour 554 prélèvements), se situe dans la moyenne nationale du RFSP qui est de 33% (27 à 36%).

Cependant, nous avons observé que certaines USP conformes et inscrites au registre FGM avaient été congelées dans un délai supérieur à 24 heures après le prélèvement, ce qui est en dehors des recommandations des bonnes pratiques. Etant donné que les recommandations concernant le délai de congélation des USP diffèrent d'un pays à l'autre (le RFSP préconise 24 heures, tandis que le FACT (D4.2[156]) préconise 48 heures en cas d'allogreffe et 72 heures en cas d'allogreffe apparentée), on peut s'interroger sur le bien-fondé de ces recommandations.

L'influence du délai de congélation sur le nombre de cellules CD34+ viables et sur le taux de progéniteurs CFU-GM après décongélation n'a, à notre connaissance, jamais été rapporté dans la littérature. Une récente étude a montré qu'un délai de congélation de 72 heures n'influait pas sur la viabilité des cellules CD34+ avant congélation, si l'USP était conservée à 4°C. Malheureusement, cette équipe n'a pas étudié l'effet d'un tel délai sur le rendement des cellules CD34+ et sur le nombre de CFU-GM après décongélation, qui sont pourtant deux facteurs fortement prédictifs de la survie après allogreffe d'USP (Solomon *et al.*[125]). C'est pourquoi, nous avons débuté, au sein de notre banque, une étude du délai d'entrée en production des USP. Nous n'avons, pour le moment, pas montré de différences du nombre de cellules CD34+ viables et du taux de CFU-GM sur la poche décongelée, entre un délai < 24 heures (CFU-GM = 16,1%) et un délai compris entre 24 et 48 heures (CFU-GM = 13,9%). Par contre, lorsque le délai de congélation dépassait 48 heures, la poche contenait 2 fois moins de cellules CD34+ viables et aucun progéniteur CFU-GM. Ces premiers résultats, qui sont à confirmer sur un plus grand nombre d'échantillons, devraient nous renseigner sur le délai maximal d'entrée en production qui pourrait être toléré et ainsi nous guider dans l'amélioration du procédé de traitement des USP.

Notre étude souligne qu'il est nécessaire de diminuer les délais d'acheminement entre les maternités et l'UMTCT pour améliorer la qualité de nos prélèvements. Une permanence sur site (1 technicien + 1 cadre médical) a été mise en place le samedi pour assurer la réception et le traitement des USP prélevées en début de week end. Par contre, il sera nécessaire d'améliorer les navettes du lundi matin qui apportent les USP de la fin de week end.

Notre étude a également révélé que près de 43% des USP conformes étaient en quarantaine. Pour plus d'un tiers de ces USP, c'est l'absence de comparution des mères donneuses à la visite de sécurisation prévue à J60 qui en était la cause. Malgré l'envoi de courriers de rappel, il s'avère en effet très difficile, pour le personnel des banques de sang de cordon, d'assurer un suivi des mères donneuses au cours de ces 2 mois.

Ce pourcentage important d'USP en quarantaine n'est pas un problème spécifique à l'UMTCT mais un problème national, puisque pour l'année 2009, le taux cible d'inscription des USP sur le registre FGM avait atteint 60% du taux cible de 275 greffons/mois. Le maintien de l'étape de sécurisation dans le procédé de mise en banques des USP est en pleine discussion. En effet, la directive européenne 2006/17[154], relative aux examens biologiques requis pour les donneurs impose un renouvellement des examens après une période de 180 jours, et non de 60 jours comme cela est actuellement recommandé pour la sécurisation des USP. De plus, cette directive européenne n'impose plus l'étape de sécurisation si des méthodes de détection génomique virale sont mises en place à J0. Le très faible taux d'USP éliminées à l'étape de sécurisation dans notre étude (1 sur 182 congelées) nous conforte dans l'idée que cette étape n'est probablement pas indispensable. Ainsi, moyennant une augmentation du coût, l'inscription des greffons sur le registre FGM pourrait être considérablement accélérée puisqu'au cours de notre étude, 1/3 des greffons conformes conservés à l'UMTCT (soit près de 3 greffons/mois) auraient pu être inscrits dans un délai plus court.

Le deuxième objectif de ce travail a été de valider le procédé de cryoconservation des USP à des fins thérapeutiques au sein de la banque de Saint Ismier. Nous avons montré que notre procédé de miniaturisation par la méthode Sepax permettait d'obtenir des rendements en CNT (80 à 90%) et en cellules CD34+ (90%) similaires à ceux rapportés dans la littérature (Lapierre *et al.*[76]). Ainsi, en établissant une valeur seuil de $2{,}2x10^6$ cellules CD34+ à réception, le nombre de miniaturisation inutiles et le risque d'exclusion des USP après miniaturisation pouvaient être diminués.

Le rendement en CNT obtenu après décongélation à la banque de Saint Ismier (94%) était équivalent au rendement moyen rapporté dans une étude comparant les résultats de contrôles qualité de 14 centres de thérapie cellulaire français (Panterne *et al.*[103]). Par contre, la viabilité cellulaire (74%) et le rendement en cellules CD34+ (méthode simple plateforme, 71%) obtenus dans notre centre étaient supérieurs à ceux rapportée par Panterne *et al.* (respectivement 62,2% et 62%) mais similaires à ceux rapportés par d'autres équipes (Rodriguez *et al.*[116] ; Van haute *et al.*[137]). Nos résultats montrent donc que notre procédé de congélation conduit à une bonne récupération des CNT et des cellules CD34+ et à une bonne viabilité cellulaire à la décongélation. De plus, la méthode simple plateforme que nous utilisons pour la numération des cellules CD34+ est celle recommandée par l'ISHAGE en raison de sa fiabilité, supérieure aux autres méthodes permettant une quantification absolue des cellules CD34+ viables (Gratama *et al.*[46]).

L'étude de Panterne *et al.*, précédemment citée, a montré qu'il existait une bonne corrélation entre le nombre de cellules CD34+ et le nombre de CFU-GM après décongélation mais que la dispersion des valeurs entre les 14 centres participants était relativement importante. Or, l'influence du taux de CFU-GM sur l'issue d'une allogreffe d'USP a été rapportée par plusieurs équipes. Migliaccio *et al*. ont d'abord montré que le nombre de CFU-GM avant congélation avait un impact sur la survie (Migliaccio *et al.*[97]). Par la suite, trois autres équipes ont montré

que le nombre de CFU-GM contenues dans l'USP administrée, c'est-à-dire après décongélation, était le facteur le plus prédictif de la survie, notamment lors de doubles allogreffes (Iori *et al.*[55] ; Prasad *et al.*[107] ; Yoo *et al.*[148]). Même si la corrélation entre les cellules CD34+ et le nombre de CFU-GM après décongélation est désormais connue (Armitage *et al.*[2] ; Aroviita *et al.*[3] ; Lim *et al.*[82]), la validation de notre procédé de congélation nécessitera l'analyse du nombre de CFU-GM obtenus après décongélation et sa corrélation au nombre de cellules CD34+.

Par ailleurs, la pertinence du nombre de CNT avant congélation comme critère majeur de sélection des USP (avec le typage HLA) par les centres greffeurs commence à être remise en cause. En effet, des études ont montré que le nombre de cellules CD34+ administrées au patient influait fortement sur le délai de sortie d'aplasie et sur la survie (Laughlin *et al.*[77] ; Wagner *et al.*[140]). Or, une étude multicentrique, menée par l'Afssaps, a révélé que le nombre de CNT avant congélation était faiblement corrélé au nombre de cellules CD34+ après décongélation, ce que nous avons également retrouvé dans notre étude (sur 12 échantillons uniquement). Par contre, nous avons observé une meilleure corrélation que celle rapportée par l'Afssaps, concernant le nombre de CNT et le nombre de cellules CD34+ avant congélation. Cette différence est probablement liée au nombre d'échantillons testés qui était plus important dans notre étude.

Il sera donc indispensable d'étudier la corrélation entre le nombre de CNT avant congélation et celui des cellules CD34+ après décongélation sur un plus grand nombre d'échantillons, avant de pouvoir conclure définitivement à la faible pertinence du nombre de CNT avant congélation comme principal critère de sélection d'une USP.

D'autre part, devant la diversité, à la fois des méthodes de traitement des greffons (miniaturisation ou non, lavage après décongélation) et des méthodes de contrôle qualité utilisées au niveau international et au sein du RFSP (appareils de mesure des CNT,

numération des cellules CD34+ par méthode simple ou double plateforme, densité d'ensemencement pour le test de clonogénicité des progéniteurs hématopoïétiques), il apparait nécessaire de standardiser les méthodes de contrôles qualité (McCullough *et al.*[93] ; Panterne *et al.*[103] ; Stanworth *et al.*[127]) mais également d'actualiser les critères de sélection des USP. Ainsi, même si le choix du greffon n'en dépend pas, le nombre de progéniteurs CFU-GM et de cellules CD34+ viables après décongélation sont des critères que la FACT recommande de fournir au centre greffeur (E3.2[156]). Pour cela, elle recommande de réaliser les contrôles qualité sur des échantillons qui soient représentatifs du contenu de la poche (D5.1.1.1[156]). En vue d'une demande d'accréditation FACT, nous avons validé l'utilisation de mini-échantillons en tubulure, comme matériel pour l'ultime contrôle qualité lors de la cession d'un greffon. Une équipe a montré qu'un tel matériel était utilisable pour le typage HLA et représentatif du contenu de la poche administrée en CNT, cellules CD34+ et CFU-GM (Goodwin *et al.*[45] ; Rodriguez *et al.*[116]). Notre étude a rapporté des résultats similaires avec une bonne corrélation entre la poche d'USP et le segment de tubulure, en termes de CNT, de cellules CD34+ et de viabilité en cellules mononuclées. Mais afin de répondre aux recommandations FACT (E3.2[156]) et de prédire au mieux la probabilité de reconstitution hématopoïétique du receveur, il sera nécessaire de vérifier, en plus, la corrélation entre le nombre de CFU-GM obtenues au sein de l'échantillon et de la poche, après décongélation. Ce travail est actuellement en cours de réalisation.

Concernant les perspectives d'amélioration des contrôles qualité, l'analyse de la viabilité des cellules CD34+ par l'Annexine V (marqueur de l'apoptose) est actuellement à l'étude. Les premiers résultats sont convaincants puisque en utilisant ce marqueur, Quérol *et al.* rapportent un taux de mortalité supérieur de 25% à celui observé avec l'utilisation du 7-AAD et une meilleure corrélation avec le taux de CFU-GM après décongélation (Querol *et al.*[108]).

D’autres facteurs que ceux précédemment décrits semblent avoir une influence sur l’issue d’une allogreffe d’USP et pourraient aider dans le choix d’une USP.

Plusieurs études ont montré que le nombre de cellules CD34+ et de progéniteurs CFU-GM étaient fortement prédictifs de l’issue d’une allogreffe d’USP (délai de sortie d'aplasie, taux de mortalité et de survie) et que le nombre de cellules CD34+ pourrait être le critère de choix principal d’une USP, particulièrement lors d’allogreffe d’USP à 2 mismatchs ou moins (Rocha *et al.*[112] ; Wagner *et al.*[140]).

Concernant le statut sérologique CMV du receveur, les résultats restent discordants. L’équipe de Ramirez *et al.* a montré, au travers d’une analyse rétrospective chez 850 patients, qu’un statut CMV positif chez le receveur était associé à un retard de prise de greffe alors que l’équipe de Niehues *et al.* a montré une reconstitution lymphocytaire plus rapide chez 31 enfants CMV positifs (Niehues *et al.*[100] ; Ramirez *et al.*[109]). De même, un risque accru de mortalité a été rapporté par Brunstein *et al.,* chez des adultes CMV négatifs atteints d’hémopathies malignes, alors que l’équipe de Rocha *et al.* observait un taux de mortalité moindre chez le même type de patients CMV négatifs. (Brunstein *et al.*[22] ; Rocha *et al.*[112]).

Par contre, les études de l’influence de la compatibilité ABO entre donneur et receveur sur l’issue d’une allogreffe d’USP rapportent des résultats similaires, à savoir qu’une incompatibilité majeure entre donneur et receveur d’USP est à l’origine d’un délai de sortie d’aplasie (Ramirez *et al.*[109] ; Tomonari *et al.*[136]) et d’un risque élevé de mortalité (Rocha *et al.*[112]).

Une équipe a récemment rapporté que la présence d’anticorps anti-HLA chez le receveur dirigés ou non contre les antigènes HLA de l’USP administrée pouvait augmenter le délai de sortie d’aplasie (neutrophiles et plaquettes) et donc influencer l’issue de l'allogreffe (Takanashi *et al.*[132]).

Ces 4 facteurs (nombre de CSH/USP, statut sérologique du receveur pour le CMV, compatibilité ABO donneur/receveur et présence d'anticorps anti-HLA chez le receveur) pourraient donc, à l'avenir, intervenir dans le choix d'une USP à condition que les méthodes de contrôle qualité soient standardisées au niveau international.

Enfin, ce travail rend compte des nombreux paramètres qu'il est nécessaire de prendre en compte pour améliorer le procédé de mise en banque de l'UMTCT et le nombre d'USP réceptionnées: procédé de prélèvement, temps sages-femmes, délais d'acheminement, délais de traitement des USP. A partir de nos observations, nous proposons des indicateurs qualité mensuels de mise en banque afin de suivre chaque étape du procédé et de mesurer l'impact des améliorations apportées: nombre de prélèvements, délai d'entrée en production, nombre de prélèvements conformes, pourcentage de prélèvements sécurisés 4 mois après le prélèvement, pourcentage de prélèvements contaminés et moyenne des contenus en CNT et en cellules CD34+ des USP congelées.

CONCLUSION

La conservation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) du sang de cordon ombilical ou unités de sang placentaire (USP) à des fins thérapeutiques allogéniques a ouvert l'accès à l'allogreffe à de nombreux patients pour lesquels aucun donneur de moelle osseuse n'a pu être identifié. Pour répondre au besoin croissant d'USP à travers le monde, des banques de sang placentaire se sont développées depuis 1991. En France, ces banques sont regroupées sous le nom de « réseau français de sang placentaire » (RFSP) qui définit les critères de qualité des USP conservées. En effet, la prise de greffe (déterminée par le délai de sortie d'aplasie) et le taux de survie sont fonctions d'un certain nombre de facteurs : comptabilité HLA entre donneur et receveur, quantité de cellules nucléées totales (CNT) et de CSH, viabilité et fonctionnalité des CSH. Lors de la mise en banque des USP, les banques du RFSP doivent respecter des critères de qualité ou spécifications imposées par la réglementation française et déposer un dossier auprès de l'AFSSAPS. Les USP répondant à ces spécifications peuvent alors être inscrites sur le registre France Greffe de Moelle (FGM) de l'agence de biomédecine et ainsi être disponibles pour tous patients nationaux ou internationaux. Ces exigences de qualité, qu'elles soient nationales (bonnes pratiques, loi de bioéthique, recommandations du RFSP) ou internationales (WMDA, FACT) s'imposent tout au long du procédé conduisant à la mise en banque d'une USP: information, sélection des donneuses, recueil du consentement, prélèvement, réception, transformation (réduction de volume, congélation), contrôles cliniques et biologiques, stockage, cession et transport. C'est pourquoi chaque banque doit valider, en interne, le procédé de conservation qu'elle utilise. Notre étude a permis d'y travailler et a montré que le procédé utilisé à la banque de Saint Ismier (Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire (UMTCT), EFS Rhône Alpes) permettait d'obtenir une bonne viabilité cellulaire ainsi qu'une bonne récupération des CNT et des CSH à la décongélation. Ces 3 paramètres définissant la qualité du greffon, font partie des critères retenus par les centres greffeurs. D'autre part, nous avons montré que l'échantillon utilisé, au sein de notre banque, pour réaliser l'ultime contrôle qualité lors de la cession d'une USP, était

fortement prédictif du contenu de l'USP administrée en termes de CNT, de CSH et de viabilité. Mais en vue d'une accréditation FACT et afin de prédire au mieux la probabilité de reconstitution hématopoïétique du receveur, nous vérifierons cette corrélation en terme de fonctionnalité des CSH.

Au travers de notre étude rétrospective, nous avons montré que le taux de conformité des USP congelées à l'UMTCT se situait dans la moyenne nationale. Malgré une grande disparité des volumes prélevés par les 4 maternités conventionnées avec l'UMTCT, le contenu en CNT et CSH des USP cryoconservées était comparable à celui obtenu par des banques internationales accréditées. Cependant, une évaluation du temps consacré par les sages-femmes en amont du prélèvement et des pratiques de prélèvement dans les différentes maternités, pourraient permettre d'augmenter le nombre d'USP prélevées et d'améliorer leur qualité.

Par ailleurs, la remise en cause de l'étape de sécurisation des USP, 2 mois après le prélèvement, pourrait permettre d'accélérer l'inscription sur le registre FGM de près d'un tiers des USP conservées à l'UMTCT et donc d'augmenter les chances de bénéficier d'une allogreffe pour de nombreux patients.

Enfin, notre étude soutient la faible pertinence du nombre de CNT avant congélation comme critère majeur de sélection des USP (avec le typage HLA) par les centres greffeurs.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 8 Nov 2010.

LE DOYEN

Pr. Renée Grillot

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER U.F.R DE PHARMACIE GRENOBLE 1

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE

Dr. Benoît Allenet

C.H.U. de GRENOBLE
PÔLE PHARMACIE
Benoît ALLENET
Pharmacien PH
N° ordre section : 90767-H

BIBLIOGRAPHIE

1 Armitage S., Fehily D., Dickinson A. *et al.* Cord blood banking: volume reduction of cord blood units using a semi-automated closed system. *Bone Marrow Transplant*, 1999, **23**: 505-509.

2 Armitage S., Warwick R., Fehily D., Navarrete C.and Contreras M. Cord blood banking in London: the first 1000 collections. *Bone Marrow Transplant*, 1999, **24**: 139-145.

3 Aroviita P., Teramo K., Westman P., Hiilesmaa V.and Kekomaki R. Associations among nucleated cell, CD34+ cell and colony-forming cell contents in cord blood units obtained through a standardized banking process. *Vox Sang*, 2003, **84**: 219-227.

4 Atsuta Y., Suzuki R., Nagamura-Inoue T. *et al.* Disease-specific analyses of unrelated cord blood transplantation compared with unrelated bone marrow transplantation in adult patients with acute leukemia. *Blood*, 2009, **113**: 1631-1638.

5 Au P., Daheron L.M., Duda D.G. *et al.* Differential in vivo potential of endothelial progenitor cells from human umbilical cord blood and adult peripheral blood to form functional long-lasting vessels. *Blood*, 2008, **111**: 1302-1305.

6 Bakhshi T., Zabriskie R.C., Bodie S. *et al.* Mesenchymal stem cells from the Wharton's jelly of umbilical cord segments provide stromal support for the maintenance of cord blood hematopoietic stem cells during long-term ex vivo culture. *Transfusion*, 2008, **48**: 2638-2644.

7 Ballen K.K., Barker J.N., Stewart S.K., Greene M.F.and Lane T.A. Collection and preservation of cord blood for personal use. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2008, **14**: 356-363.

8 Ballen K.K., Spitzer T.R., Yeap B.Y. *et al.* Double unrelated reduced-intensity umbilical cord blood transplantation in adults. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2007, **13**: 82-89.

9 Barker J.N., Davies S.M., DeFor T. *et al.* Survival after transplantation of unrelated donor umbilical cord blood is comparable to that of human leukocyte antigen-matched unrelated donor bone marrow: results of a matched-pair analysis. *Blood*, 2001, **97**: 2957-2961.

10 Barker J.N., Hough R.E., van Burik J.A. *et al.* Serious infections after unrelated donor transplantation in 136 children: impact of stem cell source. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, **11**: 362-370.

11 Barker J.N., Krepski T.P., DeFor T.E. *et al.* Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2002, **8**: 257-260.

12 Barker J.N. and Wagner J.E. Umbilical-cord blood transplantation for the treatment of cancer. *Nat Rev Cancer*, 2003, **3**: 526-532.

13 Barker J.N., Weisdorf D.J., DeFor T.E. *et al.* Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood*, 2005, **105**: 1343-1347.

14 Barker J.N., Weisdorf D.J., DeFor T.E. *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.

15 Barker J.N., Weisdorf D.J.and Wagner J.E. Creation of a double chimera after the transplantation of umbilical-cord blood from two partially matched unrelated donors. *N Engl J Med*, 2001, **344**: 1870-1871.

16 Beatty P.G. The immunogenetics of bone marrow transplantation. *Transfus Med Rev*, 1994, **8**: 45-58.

17 Beatty P.G., Mori M.and Milford E. Impact of racial genetic polymorphism on the probability of finding an HLA-matched donor. *Transplantation*, 1995, **60**: 778-783.

18 Bieback K., Kern S., Kluter H.and Eichler H. Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Stem Cells*, 2004, **22**: 625-634.

19 Bron D., De Bruyn C., Balasse H. *et al.* Cord blood: from bench to bedside. *Bull Cancer*, 2008, **95**: 314-319.

20 Broxmeyer H.E., Douglas G.W., Hangoc G. *et al.* Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable hematopoietic stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1989, **86**: 3828-3832.

21 Brunstein C.G., Barker J.N., Weisdorf D.J. *et al.* Intra-BM injection to enhance engraftment after myeloablative umbilical cord blood transplantation with two partially HLA-matched units. *Bone Marrow Transplant*, 2009, **43**: 935-940.

22 Brunstein C.G., Barker J.N., Weisdorf D.J. *et al.* Umbilical cord blood transplantation after nonmyeloablative conditioning: impact on transplantation outcomes in 110 adults with hematologic disease. *Blood*, 2007, **110**: 3064-3070.

23 Brunstein C.G., Gutman J.A., Weisdorf D.J. *et al.* Allogeneic hematopoietic cell transplantation for hematological malignancy: relative risks and benefits of double umbilical cord blood. *Blood*, 2010.

24 Brunstein C.G. and Weisdorf D.J. Future of cord blood for oncology uses. *Bone Marrow Transplant*, 2009, **44**: 699-707.

25 Castello S., Podesta M., Menditto V.G. *et al.* Intra-bone marrow injection of bone marrow and cord blood cells: an alternative way of transplantation associated with a higher seeding efficiency. *Exp Hematol*, 2004, **32**: 782-787.

26 Chang Y.S., Oh W., Choi S.J. *et al.* Human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells attenuate hyperoxia-induced lung injury in neonatal rats. *Cell Transplant*, 2009, **18**: 869-886.

27 Chung D.J., Choi C.B., Lee S.H. *et al.* Intraarterially delivered human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in canine cerebral ischemia. *J Neurosci Res*, 2009, **87**: 3554-3567.

28 Civin C.I. Identification and positive selection of human progenitor/stem cells for bone marrow transplantation. *Prog Clin Biol Res*, 1992, **377**: 461-472; discussion 473.

29 Dausset J., Rapaport F.T., Colombani J.and Feingold N. A leucocyte group and its relationship to tissue histocompatibility in man. *Transplantation*, 1965, **3**: 701-705.

30 Delaney C., Heimfeld S., Brashem-Stein C. *et al.* Notch-mediated expansion of human cord blood progenitor cells capable of rapid myeloid reconstitution. *Nat Med*, 2010, **16**: 232-236.

31 Durand C. and Dzierzak E. Embryonic beginnings of adult hematopoietic stem cells. *Haematologica*, 2005, **90**: 100-108.

32 Eapen M., Rocha V., Sanz G. *et al.* Effect of graft source on unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. *Lancet Oncol*, 2010, **11**: 653-660.

33 Eapen M., Rubinstein P., Zhang M.J. *et al.* Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet*, 2007, **369**: 1947-1954.

34 Ende M. and Ende N. Hematopoietic transplantation by means of fetal (cord) blood. A new method. *Va Med Mon (1918)*, 1972, **99**: 276-280.

35 Erices A., Conget P.and Minguell J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol*, 2000, **109**: 235-242.

36 Fliedner T.M., Calvo W., Korbling M. *et al.* Collection, storage and transfusion of blood stem cells for the treatment of hemopoietic failure. *Blood Cells*, 1979, **5**: 313-328.

37 Flynn A., Barry F.and O'Brien T. UC blood-derived mesenchymal stromal cells: an overview. *Cytotherapy*, 2007, **9**: 717-726.

38 Frassoni F., Gualandi F., Podesta M. *et al.* Direct intrabone transplant of unrelated cord-blood cells in acute leukaemia: a phase I/II study. *Lancet Oncol*, 2008, **9**: 831-839.

39 Friedrichs B., Tichelli A., Bacigalupo A. *et al.* Long-term outcome and late effects in patients transplanted with mobilised blood or bone marrow: a randomised trial. *Lancet Oncol*, 2010, **11**: 331-338.

40 Gluckman E., Broxmeyer H.A., Auerbach A.D. *et al.* Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med*, 1989, **321**: 1174-1178.

41 Gluckman E., Rocha V., Boyer-Chammard A. *et al.* 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, **337**: 373-381.

42 Gluckman E., Rocha V., Ionescu I. *et al.* Results of unrelated cord blood transplant in fanconi anemia patients: risk factor analysis for engraftment and survival. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2007, **13**: 1073-1082.

43 Godfrey W.R., Spoden D.J., Ge Y.G. *et al.* Cord blood CD4(+)CD25(+)-derived T regulatory cell lines express FoxP3 protein and manifest potent suppressor function. *Blood*, 2005, **105**: 750-758.

44 Goldstein G., Toren A.and Nagler A. Human umbilical cord blood biology, transplantation and plasticity. *Curr Med Chem*, 2006, **13**: 1249-1259.

45 Goodwin H.S., Grunzinger L.M., Regan D.M. *et al.* Long term cryostorage of UC blood units: ability of the integral segment to confirm both identity and hematopoietic potential. *Cytotherapy*, 2003, **5**: 80-86.

46 Gratama J.W., Kraan J., Keeney M. *et al.* Validation of the single-platform ISHAGE method for CD34(+) hematopoietic stem and progenitor cell enumeration in an international multicenter study. *Cytotherapy*, 2003, **5**: 55-65.

47 Gratwohl A. and Baldomero H. European survey on clinical use of cord blood for hematopoietic and non-hematopoietic indications. *Transfus Apher Sci*, 2010, **42**: 265-275.

48 Grewal S.S., Barker J.N., Davies S.M.and Wagner J.E. Unrelated donor hematopoietic cell transplantation: marrow or umbilical cord blood? *Blood*, 2003, **101**: 4233-4244.

49 Harris D.T. Non-haematological uses of cord blood stem cells. *Br J Haematol*, 2009, **147**: 177-184.

50 Harris D.T., Schumacher M.J., Rychlik S. *et al.* Collection, separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 1994, **13**: 135-143.

51 Hill J.M., Zalos G., Halcox J.P. *et al.* Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*, 2003, **348**: 593-600.

52 Hutton J.F., Gargett T., Sadlon T.J. *et al.* Development of CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells from cord blood hematopoietic progenitor cells. *J Leukoc Biol*, 2009, **85**: 445-451.

53 in 't Anker P.S., Noort W.A., Kruisselbrink A.B. *et al.* Nonexpanded primary lung and bone marrow-derived mesenchymal cells promote the engraftment of umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol*, 2003, **31**: 881-889.

54 Ingram D.A., Mead L.E., Tanaka H. *et al.* Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*, 2004, **104**: 2752-2760.

55 Iori A.P., Cerretti R., De Felice L. *et al.* Pre-transplant prognostic factors for patients with high-risk leukemia undergoing an unrelated cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 2004, **33**: 1097-1105.

56 Jacobsohn D.A., Hewlett B., Ranalli M. *et al.* Outcomes of unrelated cord blood transplants and allogeneic-related hematopoietic stem cell transplants in children with high-risk acute lymphocytic leukemia. *Bone Marrow Transplant*, 2004, **34**: 901-907.

57 Jang J.H., Kim S.K., Choi J.E. *et al.* Endothelial progenitor cell differentiation using cryopreserved, umbilical cord blood-derived mononuclear cells. *Acta Pharmacol Sin*, 2007, **28**: 367-374.

58 Jaroscak J., Goltry K., Smith A. *et al.* Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastromReplicell System. *Blood*, 2003, **101**: 5061-5067.

59 Johansen K.A., Schneider J.F., McCaffree M.A.and Woods G.L. Efforts of the United States' National Marrow Donor Program and Registry to improve utilization and representation of minority donors. *Transfus Med*, 2008, **18**: 250-259.

60 Kalka C., Masuda H., Takahashi T. *et al.* Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97**: 3422-3427.

61 Kalpaktsoglou P.K. and Emery J.L. Human bone marrow during the last three months of intrauterine life. A histological study. *Acta Haematol*, 1965, **34**: 228-238.

62 Kang K.S., Kim S.W., Oh Y.H. *et al.* A 37-year-old spinal cord-injured female patient, transplanted of multipotent stem cells from human UC blood, with improved sensory perception and mobility, both functionally and morphologically: a case study. *Cytotherapy*, 2005, **7**: 368-373.

63 Katz G. and Mills A. Cord blood banking in France: reorganising the national network. *Transfus Apher Sci*, 2010, **42**: 307-316.

64 Kelly S.S., Sola C.B., de Lima M.and Shpall E. Ex vivo expansion of cord blood. *Bone Marrow Transplant*, 2009, **44**: 673-681.

65 Kern S., Eichler H., Stoeve J., Kluter H.and Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 2006, **24**: 1294-1301.

66 Kernan N.A., Schroeder M.L., Ciavarella D. *et al.* Umbilical cord blood infusion in a patient for correction of Wiskott-Aldrich syndrome. *Blood Cells*, 1994, **20**: 245-248.

67 Kim J.Y., Song S.H., Kim K.L. *et al.* Human Cord Blood-derived Endothelial Progenitor Cells and their Conditioned Media Exhibit Therapeutic Equivalence for Diabetic Wound Healing. *Cell Transplant*, 2010.

68 Kim S.W., Han H., Chae G.T. *et al.* Successful stem cell therapy using umbilical cord blood-derived multipotent stem cells for Buerger's disease and ischemic limb disease animal model. *Stem Cells*, 2006, **24**: 1620-1626.

69 Kinniburgh D. and Russell N.H. Comparative study of CD34-positive cells and subpopulations in human umbilical cord blood and bone marrow. *Bone Marrow Transplant*, 1993, **12**: 489-494.

70 Knudtzon S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood*, 1974, **43**: 357-361.

71 Kobayashi K., Maeda Y., Hara Y. *et al.* Clinical outcomes of unrelated donor umbilical cord blood transplantation for 30 adults with hematological malignancies. *Anticancer Res*, 2009, **29**: 1763-1770.

72 Kogler G., Critser P., Trapp T.and Yoder M. Future of cord blood for non-oncology uses. *Bone Marrow Transplant*, 2009, **44**: 683-697.

73 Koike K. Cryopreservation of pluripotent and committed hemopoietic progenitor cells from human bone marrow and cord blood. *Pediatrics International*, 1983, **25**: 275-283.

74 Kurtzberg J., Laughlin M., Graham M.L. *et al.* Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N Engl J Med*, 1996, **335**: 157-166.

75 Lane T.A. Umbilical cord blood grafts for hematopoietic transplantation in adults: a cup half empty or half full? *Transfusion*, 2005, **45**: 1027-1034.

76 Lapierre V., Pellegrini N., Bardey I. *et al.* Cord blood volume reduction using an automated system (Sepax) vs. a semi-automated system (Optipress II) and a manual method (hydroxyethyl starch sedimentation) for routine cord blood banking: a comparative study. *Cytotherapy*, 2007, **9**: 165-169.

77 Laughlin M.J., Barker J., Bambach B. *et al.* Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med*, 2001, **344**: 1815-1822.

78 Lazarus H.M., Koc O.N., Devine S.M. *et al.* Cotransplantation of HLA-identical sibling culture-expanded mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells in hematologic malignancy patients. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, **11**: 389-398.

79 Lee M.W., Choi J., Yang M.S. *et al.* Mesenchymal stem cells from cryopreserved human umbilical cord blood. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, **320**: 273-278.

80 Leor J., Guetta E., Feinberg M.S. *et al.* Human umbilical cord blood-derived CD133+ cells enhance function and repair of the infarcted myocardium. *Stem Cells*, 2006, **24**: 772-780.

81 Liao W., Xie J., Zhong J. *et al.* Therapeutic effect of human umbilical cord multipotent mesenchymal stromal cells in a rat model of stroke. *Transplantation*, 2009, **87**: 350-359.

82 Lim F., Beckhoven J., Brand A. *et al.* The number of nucleated cells reflects the hematopoietic content of umbilical cord blood for transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 1999, **24**: 965-970.

83 Lima M.d., McNiece I., McMannis J. *et al.* Double cord blood transplantations (CBT) with ex-vivo expansion (EXP) of one unit utilizing a mesenchymal stromstromal cell (MSC) platform. *Biol Blood Marrow Transplant* 2009, **15**: Abstract 122.

84 Liu C.H. and Hwang S.M. Cytokine interactions in mesenchymal stem cells from cord blood. *Cytokine*, 2005, **32**: 270-279.

85 Lorenz E., Uphoff D., Reid T.R.and Shelton E. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. *J Natl Cancer Inst*, 1951, **12**: 197-201.

86 Lu L.L., Liu Y.J., Yang S.G. *et al.* Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. *Haematologica*, 2006, **91**: 1017-1026.

87 Luo G., Cheng W., He W. *et al.* Promotion of cutaneous wound healing by local application of mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood. *Wound Repair Regen*, 2010, **18**: 506-513.

88 Macmillan M.L., Blazar B.R., DeFor T.E.and Wagner J.E. Transplantation of ex-vivo culture-expanded parental haploidentical mesenchymal stem cells to promote engraftment in pediatric recipients of unrelated donor umbilical cord blood: results of a phase I-II clinical trial. *Bone Marrow Transplant*, 2009, **43**: 447-454.

89 MacMillan M.L., Weisdorf D.J., Brunstein C.G. *et al.* Acute graft-versus-host disease after unrelated donor umbilical cord blood transplantation: analysis of risk factors. *Blood*, 2009, **113**: 2410-2415.

90 Majhail N.S., Weisdorf D.J., Wagner J.E. *et al.* Comparable results of umbilical cord blood and HLA-matched sibling donor hematopoietic stem cell transplantation after reduced-intensity preparative regimen for advanced Hodgkin lymphoma. *Blood*, 2006, **107**: 3804-3807.

91 Marville L., Haye I., Torre R.M.and Katz G. Which legal status for the cord blood banks ? *Médecine et Droit*, 2010: 81-85.

92 Mayani H. and Lansdorp P.M. Biology of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells. *Stem Cells*, 1998, **16**: 153-165.

93 McCullough J., McKenna D., Kadidlo D., Schierman T.and Wagner J. Issues in the quality of umbilical cord blood stem cells for transplantation. *Transfusion*, 2005, **45**: 832-841.

94 McGuckin C.P. and Forraz N. Potential for access to embryonic-like cells from human umbilical cord blood. *Cell Prolif*, 2008, **41 Suppl 1**: 31-40.

95 McGuckin C.P., Forraz N., Baradez M.O. *et al.* Production of stem cells with embryonic characteristics from human umbilical cord blood. *Cell Prolif*, 2005, **38**: 245-255.

96 McNiece I., Harrington J., Turney J., Kellner J.and Shpall E.J. Ex vivo expansion of cord blood mononuclear cells on mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 2004, **6**: 311-317.

97 Migliaccio A.R., Adamson J.W., Stevens C.E. *et al.* Cell dose and speed of engraftment in placental/umbilical cord blood transplantation: graft progenitor cell content is a better predictor than nucleated cell quantity. *Blood*, 2000, **96**: 2717-2722.

98 Moodley Y., Atienza D., Manuelpillai U. *et al.* Human umbilical cord mesenchymal stem cells reduce fibrosis of bleomycin-induced lung injury. *Am J Pathol*, 2009, **175**: 303-313.

99 Navarrete C. and Contreras M. Cord blood banking: a historical perspective. *Br J Haematol*, 2009, **147**: 236-245.

100 Niehues T., Rocha V., Filipovich A.H. *et al.* Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children -- a Eurocord analysis. *Br J Haematol*, 2001, **114**: 42-48.

101 Ooi J. Cord blood transplantation in adults. *Bone Marrow Transplant*, 2009, **44**: 661-666.

102 Ooi J., Iseki T., Takahashi S. *et al.* Unrelated cord blood transplantation for adult patients with de novo acute myeloid leukemia. *Blood*, 2004, **103**: 489-491.

103 Panterne B., Richard M.J., Sabatini C. *et al.* Quality control of defrosted cord blood units: results from an inter-laboratory study. *Transfus Clin Biol*, 2010, **17**: 41-46.

104 Pecora A.L., Stiff P., Jennis A. *et al.* Prompt and durable engraftment in two older adult patients with high risk chronic myelogenous leukemia (CML) using ex vivo expanded and unmanipulated unrelated umbilical cord blood. *Bone Marrow Transplant*, 2000, **25**: 797-799.

105 Petersdorf E.W. Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation: histocompatibility. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2007, **20**: 155-170.

106 Powles R. 50 years of allogeneic bone-marrow transplantation. *Lancet Oncol*, 2010, **11**: 305-306.

107 Prasad V.K., Mendizabal A., Parikh S.H. *et al.* Unrelated donor umbilical cord blood transplantation for inherited metabolic disorders in 159 pediatric patients from a single center: influence of cellular composition of the graft on transplantation outcomes. *Blood*, 2008, **112**: 2979-2989.

108 Querol S., Gomez S.G., Pagliuca A., Torrabadella M.and Madrigal J.A. Quality rather than quantity: the cord blood bank dilemma. *Bone Marrow Transplant*, 2010, **45**: 970-978.

109 Ramirez P., Brunstein C.G., Miller B., Defor T.and Weisdorf D. Delayed platelet recovery after allogeneic transplantation: a predictor of increased treatment-related mortality and poorer survival. *Bone Marrow Transplant*, 2010.

110 Rocha V., Cornish J., Sievers E.L. *et al.* Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood*, 2001, **97**: 2962-2971.

111 Rocha V., Crotta A., Ruggeri A. *et al.* Double cord blood transplantation: extending the use of unrelated umbilical cord blood cells for patients with hematological diseases. *Best Pract Res Clin Haematol*, 2010, **23**: 223-229.

112 Rocha V. and Gluckman E. Improving outcomes of cord blood transplantation: HLA matching, cell dose and other graft- and transplantation-related factors. *Br J Haematol*, 2009, **147**: 262-274.

113 Rocha V. and Locatelli F. Searching for alternative hematopoietic stem cell donors for pediatric patients. *Bone Marrow Transplant*, 2008, **41**: 207-214.

114 Rocha V., Wagner J.E., Jr., Sobocinski K.A. *et al.* Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N Engl J Med*, 2000, **342**: 1846-1854.

115 Rodrigues C.A., Sanz G., Brunstein C.G. *et al.* Analysis of risk factors for outcomes after unrelated cord blood transplantation in adults with lymphoid malignancies: a study by the Eurocord-Netcord and lymphoma working party of the European group for blood and marrow transplantation. *J Clin Oncol*, 2009, **27**: 256-263.

116 Rodriguez L., Garcia J.and Querol S. Predictive utility of the attached segment in the quality control of a cord blood graft. *Biol Blood Marrow Transplant*, 2005, **11**: 247-251.

117 Rubinstein P., Adamson J.W.and Stevens C. The Placental/Umbilical Cord Blood Program of the New York Blood Center. A progress report. *Ann N Y Acad Sci*, 1999, **872**: 328-334; discussion 334-325.

118 Rubinstein P., Carrier C., Scaradavou A. *et al.* Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med*, 1998, **339**: 1565-1577.

119 Rubinstein P., Dobrila L., Rosenfield R.E. *et al.* Processing and cryopreservation of placental/umbilical cord blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995, **92**: 10119-10122.

120 Rubinstein P., Rosenfield R.E., Adamson J.W.and Stevens C.E. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood*, 1993, **81**: 1679-1690.

121 Rubinstein P., Taylor P.E., Scaradavou A. *et al.* Unrelated placental blood for bone marrow reconstitution: organization of the placental blood program. *Blood Cells*, 1994, **20**: 587-596; discussion 596-600.

122 Samuel G.N., Kerridge I.H., Vowels M. *et al.* Ethnicity, equity and public benefit: a critical evaluation of public umbilical cord blood banking in Australia. *Bone Marrow Transplant*, 2007, **40**: 729-734.

123 Sanz M.A. Cord-blood transplantation in patients with leukemia--a real alternative for adults. *N Engl J Med*, 2004, **351**: 2328-2330.

124 Schmitz N., Dreger P., Suttorp M. *et al.* Primary transplantation of allogeneic peripheral blood progenitor cells mobilized by filgrastim (granulocyte colony-stimulating factor). *Blood*, 1995, **85**: 1666-1672.

125 Solomon M., Wofford J., Johnson C., Regan D.and Creer M.H. Factors influencing cord blood viability assessment before cryopreservation. *Transfusion*, 2010, **50**: 820-830.

126 Solves P., Perales A., Mirabet V. *et al.* Optimizing donor selection in a cord blood bank. *Eur J Haematol*, 2004, **72**: 107-112.

127 Stanworth S., Warwick R., Fehily D. *et al.* An international survey of unrelated umbilical cord blood banking. *Vox Sang*, 2001, **80**: 236-243.

128 Stroncek D., Berlyne D., Fox B. *et al.* Developments in clinical cell therapy. *Cytotherapy*, 2010, **12**: 425-428.

129 Sullivan M.J. Banking on cord blood stem cells. *Nat Rev Cancer*, 2008, **8**: 555-563.

130 Sun J., Allison J., McLaughlin C. *et al.* Differences in quality between privately and publicly banked umbilical cord blood units: a pilot study of autologous cord blood infusion in children with acquired neurologic disorders. *Transfusion*, 2010.

131 Takahashi S., Ooi J., Tomonari A. *et al.* Comparative single-institute analysis of cord blood transplantation from unrelated donors with bone marrow or peripheral blood stem-cell transplants from related donors in adult patients with hematologic malignancies after myeloablative conditioning regimen. *Blood*, 2007, **109**: 1322-1330.

132 Takanashi M., Atsuta Y., Fujiwara K. *et al.* The impact of anti-HLA antibodies on unrelated cord blood transplantations. *Blood*, 2010, **116**: 2839-2846.

133 Thomas E.D., Lochte H.L., Jr., Cannon J.H., Sahler O.D.and Ferrebee J.W. Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man. *J Clin Invest*, 1959, **38**: 1709-1716.

134 Tisato V., Naresh K., Girdlestone J., Navarrete C.and Dazzi F. Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia*, 2007, **21**: 1992-1999.

135 Tolar J., Hippen K.L.and Blazar B.R. Immune regulatory cells in umbilical cord blood: T regulatory cells and mesenchymal stromal cells. *Br J Haematol*, 2009, **147**: 200-206.

136 Tomonari A., Takahashi S., Ooi J. *et al.* Impact of ABO incompatibility on engraftment and transfusion requirement after unrelated cord blood transplantation: a single institute experience in Japan. *Bone Marrow Transplant*, 2007, **40**: 523-528.

137 Van haute I., Lootens N., De Smet S. *et al.* Viable CD34+ stem cell content of a cord blood graft: which measurement performed before transplantation is most representative? *Transfusion*, 2004, **44**: 547-554.

138 Vanneaux V., El-Ayoubi F., Delmau C. *et al.* In vitro and in vivo analysis of endothelial progenitor cells from cryopreserved umbilical cord blood: are we ready for clinical application? *Cell Transplant*, 2010.

139 Verneris M.R., Brunstein C.G., Barker J. *et al.* Relapse risk after umbilical cord blood transplantation: enhanced graft-versus-leukemia effect in recipients of 2 units. *Blood*, 2009, **114**: 4293-4299.

140 Wagner J.E., Barker J.N., DeFor T.E. *et al.* Transplantation of unrelated donor umbilical cord blood in 102 patients with malignant and nonmalignant diseases: influence of CD34 cell dose and HLA disparity on treatment-related mortality and survival. *Blood*, 2002, **100**: 1611-1618.

141 Wagner J.E., Broxmeyer H.E., Byrd R.L. *et al.* Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy: analysis of engraftment. *Blood*, 1992, **79**: 1874-1881.

142 Wagner J.E., Kernan N.A., Steinbuch M., Broxmeyer H.E.and Gluckman E. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet*, 1995, **346**: 214-219.

143 Wang M., Yang Y., Yang D. *et al.* The immunomodulatory activity of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells in vitro. *Immunology*, 2009, **126**: 220-232.

144 Weiden P.L., Flournoy N., Thomas E.D. *et al.* Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts. *N Engl J Med*, 1979, **300**: 1068-1073.

145 Yan Y., Xu W., Qian H. *et al.* Mesenchymal stem cells from human umbilical cords ameliorate mouse hepatic injury in vivo. *Liver Int*, 2009, **29**: 356-365.

146 Yang C., Zhang Z.H., Li Z.J. *et al.* Enhancement of neovascularization with cord blood CD133+ cell-derived endothelial progenitor cell transplantation. *Thromb Haemost*, 2004, **91**: 1202-1212.

147 Yang H., Loutfy M.R., Mayerhofer S.and Shuen P. Factors affecting banking quality of umbilical cord blood for transplantation. *Transfusion*, 2010.

148 Yoo K.H., Lee S.H., Kim H.J. *et al.* The impact of post-thaw colony-forming units-granulocyte/macrophage on engraftment following unrelated cord blood transplantation in pediatric recipients. *Bone Marrow Transplant*, 2007, **39**: 515-521.

149 Cellules souches et thérapies cardiovasculaires *In*: *Séance du mardi 3 mars*. 2009. Académie Nationale de Médecine.

150 Agence de Biomédecine. Rapport annuel 2008 - Bilan des activités. 2008.

151 Agence de la Biomédecine. Synthèse du rapport annuel de l'activité du registre France Greffe de Moelle. 2008.

152 Circulaire DGS/DHOS/PP4/O4 n° 2010-17 du 18 janvier 2010 " relative aux modalités d'application de l'arrêté fixant le contenu du dossier accompagnant la demande d'autorisation d'effectuer des prélèvements de cellules à des fins thérapeutiques " (BO n°2010/2 du 15 mars 2010).

153 Communiqué de Presse. Appel à la vigilance sur les sociétés privées incitant à la conservation de sang de cordon à visée autologue. Société Française de Greffe de Moelle et de thérapie cellulaire, Paris le 8 décembre 2009

154 Directive 2006/17/CE de la commission du 8 février 2006 portant application de la directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil concernant certaines exigences techniques relatives au don, à l'obtention et au contrôle de tissus et de cellules d'origine humaine.

155 Boyse E.A., Broxemeyer H.E.and Douglas G.W. Isolation and preservation of foetal and neonatal hematopoietic stem and progenitor cells of the blood. Patent US 6461645 B1; 1991.

156 Foundation for the Accreditation of Cellular Therapy and International Netcord Foundation. NetCord-FACT International Standards for Cord Blood Collection, Banking, and Release for Administration. 4th ed., Janvier 2010: 159p.

157 Broxmeyer H.E. Cord Blood Transplantation: A Mini Review Celebrating the 20th Anniversary of the First Cord Blood Transplant. *In: International conference on biology and clinical applications of cord blood cells*, 2008: Mandelieu, France.

158 Loi n° 2004-800 du 6 août 2004 relative à la bioéthique (JO 7 août 2004).

159 Proposition de loi n°2058 relative au prélèvement et à la conservation des cellules souches issues du sang de cordon ombilical, présentée par Mr le député Damien Meslot. *In: Conférence de presse à l'Assemblée Nationale* du 9 décembre 2009.

160 Sénat. Rapport d'information sur le potentiel thérapeutique des cellules souches extraites du sang de cordon ombilical du 4 novembre 2008.

161 Stem Cell Trialists' Collaborative Group. Allogeneic peripheral blood stem-cell compared with bone marrow transplantation in the management of hematologic malignancies: an individual patient data meta-analysis of nine randomized trials. 2005/07/30, *J Clin Oncol*, 2005, **23**: 5074-5087.

162 http://clinicaltrials.gov/ - septembre 2010.

163 http://netcord.org/ - août 2010.

164 http://pluristem.com/ - octobre 2010.

ANNEXES

Annexe I : Contre-indications au prélèvement de sang placentaire en vue d'une conservation dans une banque du Réseau Français de Sang Placentaire (en cours de révision)

Annexe II : Qualification néonatale lors du don de sang placentaire

Annexe I

agence de la biomédecine

RFSP

Contre-indications au prélèvement de sang placentaire en vue d'une conservation dans une banque du Réseau Français de Sang Placentaire (utilisation thérapeutique allogénique)

INTRODUCTION

Ces recommandations émanent d'un groupe de travail issu du Réseau Français de Sang Placentaire. Elles ont été validées par le comité du Registre de France Greffe de moelle et le conseil scientifique de la Société Française de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire et destinées au personnel des maternités participant à la collecte d'unités de sang placentaire au sein du RFSP.

Elles ont été élaborées dans le respect des dispositions législatives françaises et européennes ; à noter qu'elles ne reprennent pas l'ensemble des items du questionnaire américain de la FDA et qu'il appartient à l'équipe de chaque maternité de répondre à ce dernier après interrogation de la parturiente mais sans le lui soumettre directement.

REFERENCES

Code santé publique : Articles L1211-1à1211-9
Décret du 9 octobre 1997 (sécurité sanitaire)
Arrêté du 14 janvier 2004 (marqueurs virologiques)
Arrêté du 21 décembre 2005 (dérogations)
Décret du 12 décembre 2003 (bio vigilance)

Tissue Donor selection guidelines – Cord Blood Donation (UKBTS and NIBSC) January 2006

International maternal risk questionnaire (FDA -WMDA)

COMPOSITION DU GROUPE DE TRAVAIL

Jean Hugues Dalle	Service d'hématologie pédiatrique Paris Robert Debré
Christèle Ferry	Service d'hématologie -Greffe de moelle Paris St Louis
Guilaine Maron	Maternité du groupe hospitalier Pellerin Pessac
Evelyne Marry	Registre France greffe de moelle Agence de la biomédecine
Hélène Espérou	Direction médicale et scientifique Agence de la biomédecine

CONTRE - INDICATIONS LIEES à la MERE

1. Pathologie gynéco-obstétricale

- tout événement anormal survenant au cours du travail laissé à l'appréciation de l'obstétricien ou de la sage femme
- grossesse multiple
- hydramnios
- placenta praevia recouvrant
- condylomes
- D.E.S. syndrome
- antécédent de mort in-utéro hors cause funiculaire et hémorragie fœto-maternelle

2. **Toutes les pathologies infectieuses actives a fortiori en cours de traitement** à l'exclusion de traitement antibiotique préventif comme l'antibioprophylaxie par amoxicilline pour portage sain d'un streptocoque génital ou pour valvulopathie ancienne.

- sérologie HIV positive
- sérologie syphilitique positive
- séroconversion Toxoplasmose, CMV ou EBV en cours de grossesse
- aucun cas de transmission materno-fœtale du paludisme n'ayant été décrit (hors hémorragie) le séjour en zone impaludée ne constitue pas une contre-indication
- hépatites : HAV pas de contre-indication
  Ac anti HBs isolé correspondant à une vaccination, pas de contre-indication.
  Ac anti HBs + et Ac antiBc+ témoin d'une infection guérie, pas de contre-indication
  Ag HBs+ contre-indication
  HCV + contre-indication y compris sérologie positive avec PCR négative
- suivi de toutes les recommandations en cas d'épidémie (Chikungunya, maladie de Chagas, West Nile Virus)

3. Tous les ATCD d'affections malignes a fortiori non guéries dont

- leucémies
- lymphomes
- cancers digestifs
- cancers pulmonaires
- tumeurs cérébrales malignes
- cancers du rein
- cancers de la thyroïde
- cancers du sein
- cancer du col utérin y compris les carcinomes in situ I et II
- épithélioma spinocellulaire
- maladie de Sézary
- mycosis fungoïde
- syndrome de Kaposi
- mélanomes
- néoplasie dans l'enfance et l'adolescence

4. Toutes les maladies génétiques ou anomalies génétiques constitutionnelles dont (cas des hémoglobinopathies cf. infra)

- syndrome de Recklinghausen
- hémochromatose
- maladie des globules rouges (Minkowski-Chauffard)
- déficits enzymatiques des plaquettes, des leucocytes
- porphyrie aiguë
- myopathie
- rétinite pigmentaire
- mucoviscidose
- maladie de surcharge

5. Toutes les maladies auto-immunes dont

- dermatomyosite
- érythème noueux
- psoriasis étendu
- vitiligo
- thyroïdite de Hashimoto
- maladie de Crohn
- recto-colite hémorragique
- cryoglobulinémies
- purpura thrombopénique idiopathique
- amylose
- maladie de Behçet
- maladie de Horton
- myasthénie
- sarcoïdose
- lupus érythémateux disséminé
- syndrome de Fiessinger-Leroy-Reiter
- polyarthrite rhumatoïde
- spondylarthrite ankylosante
- syndrome de Gougerot-Sjögren

6. Pathologie cardiaque

- hypertension artérielle chronique
- troubles du rythme cardiaque traités

7. Pathologie endocrinienne

- adénome hypophysaire non guéri
- diabète insipide
- diabète insulinodépendant de type 1
- diabète non-insulino-dépendant nécessitant une insulinothérapie pendant la grossesse *hors le diabète gestationnel*
- hyper aldostéronisme
- hypercholestérolémie traitée
- hyperlipidémie essentielle traitée
- hypophysectomie compensée
- insuffisance anté-hypophysaire
- insuffisance surrénalienne
- maladie de Basedow
- phéochromocytome
- syndrome de Cushing
- insuffisance thyroïdienne non contrôlée
- hyperthyroïdie

8. Pathologie hématologique

- toute anomalie de l'hémostase dont les coagulopathies avec risque hémorragique dont la maladie de Willebrand (les antécédents thrombo-emboliques ne constituent pas une CI sauf s'ils nécessitent un traitement anti-coagulant en cours)
- anomalies de l'hémogramme ne rentrant pas dans le cadre des modifications physiologiques liées à la grossesse
- recherche d'agglutinines irrégulières positive (hors anticorps naturels non hémolysants et anti-D passifs)

9. Pathologie neurologique

- maladies neuro-dégénératives dont maladie de Parkinson
- syndrome de Guillain-Barré datant de moins de deux ans
- sclérose en plaque
- sclérose latérale amyotrophique
- syndrome dépressif sévère traité
- épilepsie traitée
- antécédent de traitement par hormone de croissance d'origine humaine

10.Conditions socio-culturelles

- accouchement anonyme
- parturiente mineure ou sous tutelle ou curatelle
- grossesse non déclarée ou non suivie
- toutes les conduites addictives toxicomanie, alcoolisme
- détresse sociale
- femme vivant ou ayant vécu plus de deux ans en Angleterre
- tatouage ou piercing réalisés dans les 6 mois précédents le don

Les ATCD de transfusion sanguine ne constituent pas une contre-indication .

CONTRE - INDICATIONS LIEES au PERE

1. Père inconnu sauf conception par PMA

2. Toutes les maladies génétiques ou anomalies génétiques constitutionnelles

(cas des hémoglobinopathies cf. infra)
- syndrome de Recklinghausen
- hémochromatose
- maladie des globules rouges (Minkowski-Chauffard)
- déficits enzymatiques des plaquettes, des leucocytes
- porphyrie aiguë
- myopathie
- rétinite pigmentaire
- mucoviscidose
- maladie de surcharge

CONTRE - INDICATIONS LIEES AU NOUVEAU-NE

1. Développement intra-utérin

- retard de croissance intra-utérin
- prématurité et hypotrophie sévère (P.N. inférieur au 3ème percentile)
- malformations détectées pendant la grossesse par l'échographie
- malformations non détectées pendant la grossesse reconnues à la naissance
- liquide amniotique infecté
- souffrance fœtale

2. Toutes les maladies génétiques (cas des hémoglobinopathies (cf. infra))

- quelles aient été diagnostiquées au cours de la grossesse ou suspectées lors de la naissance

CONTRE - INDICATIONS LIEES A LA FRATRIE DE L'ENFANT A NAITRE

1. **Les leucémies aiguës et les lymphomes ainsi que les maladies génétiques ou anomalies génétiques constitutionnelles**
2. **La mort subite du nourrisson dans la fratrie n'est pas une contre-indication si aucune cause n' a été retrouvée lors d'explorations précédentes.**

CAS des HEMOGLOBINOPATHIES

Si l'on peut s'assurer du caractère hétérozygote du nouveau-né (un des parents connu sain), on peut envisager la conservation sous réserve d'une notification lors de la cryo-préservation et surtout lors d'un éventuel choix par un centre greffeur.

Si l'on ne peut s'assurer du caractère sain ou hétérozygote du nouveau-né on ne doit pas conserver le sang placentaire

S'il existe une politique de dépistage néo-natal, on peut conserver le sang placentaire et ne lever la quarantaine qu'à réception du résultat s'il s'avère sain ou hétérozygote sous la même réserve, dans ce dernier cas, que précédemment.

Annexe II

EN/08 6533 /

EFS RHÔNE-ALPES	QUALIFICATION CLINIQUE NEONATALE DON DE SANG PLACENTAIRE	UMTCT GCS-CTC

Identification de l'enfant

Nom :

Prénom :

Date de naissance :

Sexe : M F

Heure de naissance :

Poids de naissance :

Taille :

PC : Terme : 37 38 39 40 41

Identification de la mère

Nom :

Prénom :

Nom de jeune fille :

Date de naissance :

Examen du nouveau-né

Fait le : ……..**par** : ……..**Age** : ……..**h**

Coloration	☐ Normale	☐ Pâleur	☐ Ictère	☐ Cyanose
Examen pulmonaire	☐ Normal	☐ Anormal	Si Anormal détailler :	
Examen cardio-vasculaire	☐ Normal	☐ Anormal		
Examen neurologique et réflexes	☐ Normal	☐ Anormal		
Abdomen	☐ Normal	☐ Anormal		
Hépato-splénomégalie	☐ Non	☐ Oui		

Infection (hémoc ⊕)	☐ Non	☐ Oui	☐ Suspicion	Si OUI détailler :
Ictère	☐ Non	☐ Oui	☐ Suspicion	
Malformation	☐ Non	☐ Oui	☐ Suspicion	
Maladie hématologique	☐ Non	☐ Oui	☐ Suspicion	
Atteinte neurologique	☐ Non	☐ Oui	☐ Suspicion	
Déficit immunitaire primaire	☐ Non	☐ Oui	☐ Suspicion	
Maladie métabolique	☐ Non	☐ Oui	☐ Suspicion	
Dysmorphie	☐ Non	☐ Oui	☐ Suspicion	
Autre pathologie	☐ Non	☐ Oui	☐ Suspicion	

Conclusion

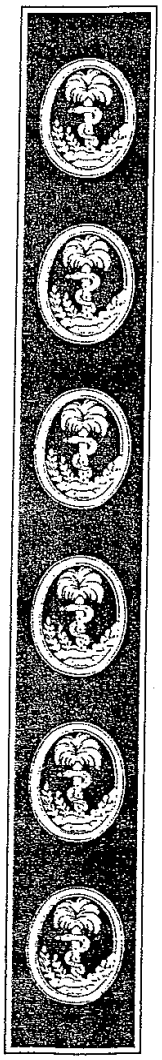
☐ Normal	☐ Anormal invalidant cause :	☐ Anormal à discuter cause :

Contrôles effectués chez la mère

Mère CMV :	☐ **Non réalisé**		**Résultat**
Contrôle effectué à l'accouchement	☐ Non	☐ Oui	
Contrôle effectué en suite de couches	☐ Non	☐ Oui	☐ Négatif ☐ Positif
Mère Toxo :	☐ **Non réalisé**		**Résultat**
Contrôle effectué à l'accouchement	☐ Non	☐ Oui	
Contrôle effectué en suite de couches	☐ Non	☐ Oui	☐ Négatif ☐ Positif
Antécédent d'Herpès récurrent :	☐ **Non réalisé**		**Résultat**
Contrôle effectué à l'accouchement	☐ Non	☐ Oui	
Contrôle effectué en suite de couches	☐ Non	☐ Oui	☐ Négatif ☐ Positif

Nom, date et signature du médecin ayant effectué l'examen :

Serment des Apothicaires



Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les moeurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

MOISAN Anaïck

Évaluation du procédé de mise en banque d'unités de sang placentaire à usage thérapeutique au sein de la banque EFS-Rhône Alpes – site de Saint Ismier.

Th. D. Pharm., UJF Grenoble, 2010, 110 p.

RÉSUMÉ

La conservation des cellules souches hématopoïétiques (CSH) du sang de cordon ombilical ou unités de sang placentaire (USP) à des fins thérapeutiques allogéniques a ouvert l'accès à l'allogreffe à de nombreux patients pour lesquels aucun donneur de moelle osseuse n'a pu être identifié. Pour répondre au besoin croissant d'USP à travers le monde, des banques de sang placentaire se sont développées. En France, elles sont regroupées sous le nom de « réseau français de sang placentaire » (RFSP). Lors de la mise en banque des USP, les banques du RFSP doivent respecter les spécifications imposées par la réglementation française, qu'elles concernent le prélèvement, la transformation ou le stockage. En vue d'une demande d'accréditation internationale, nous avons évalué le procédé de mise en banque des USP à usage thérapeutique utilisé au sein de la banque de sang de cordon de Saint Ismier (Unité Mixte de Thérapie Cellulaire et Tissulaire (UMTCT), EFS Rhône Alpes) en réalisant une étude rétrospective de la conformité des USP prélevées par les maternités, miniaturisées et congelées dans cette banque, entre le 1er janvier 2009 et le 1er juillet 2010. L'évaluation a porté sur les critères cliniques et biologiques des mères donneuses et des nouveau-nés dont le sang de cordon a été prélevé ainsi que sur la qualité des prélèvements et le procédé de transformation des USP. Notre étude a montré que le procédé utilisé à l'UMTCT permettait d'obtenir, à la décongélation, une bonne viabilité des cellules mononucléées (87,1 ± 6,8%) ainsi qu'une bonne récupération des cellules nucléées totales (CNT) (93,9 ± 8,9%) et des CSH-CD34+ (71,0 ± 23,2%). Ces trois paramètres, définissant la qualité du greffon, font partie des critères retenus par les centres greffeurs. D'autre part, nous avons montré que l'échantillon utilisé au sein de notre banque, pour réaliser l'ultime contrôle qualité lors de la cession d'une USP, était fortement prédictif du contenu cellulaire (CNT : $r = 0,923$, $p < 0,001$; CSH : $r = 0,77$, $p < 0,05$) et de la viabilité en cellules mononuclées ($r = 0,798$, $p < 0,05$) de l'USP administrée. Nous avons montré que le taux de conformité des USP congelées à l'UMTCT (33%) se situait dans la moyenne nationale. Malgré une grande disparité des volumes prélevés par les 4 maternités conventionnées avec l'UMTCT (moyennes allant de 50,9 à 80,6 ml), le contenu cellulaire des USP conservées ($12,5 \pm 4,9\times10^8$ CNT ; $4,4 \pm 2,7\times10^6$ CSH) était comparable à ceux obtenus par des banques internationales accréditées. Notre étude soutient la faible pertinence du nombre de cellules nucléées totales avant congélation comme critère majeur de sélection des USP (avec le typage HLA) par les centres greffeurs. Enfin, ce travail rend compte des nombreux paramètres qu'il est nécessaire de prendre en compte pour améliorer le procédé de mise en banque, le nombre et la qualité des USP réceptionnées et propose des pistes d'amélioration.

MOTS CLÉS Cellules souches hématopoïétiques, banque de sang de cordon, unités de sang placentaire à usage thérapeutique, évaluation, procédé de conservation

JURY
M. ALLENET Benoît, Maître de Conférence , MCU-PH
Mme COUDURIER Nicole, Docteur en Médecine
M. GARBAN Frédéric, Maître de Conférence , MCU-PH
M. RACHIDI Walid, Maître de Conférence, MCU
Mme RICHARD Marie-Jeanne, Docteur en Pharmacie, PH

DATE DE SOUTENANCE
Mardi 30 novembre 2010

ADRESSE DE L'AUTEUR
9 rue Anne Frank – Saint Martin d'Hères