

Minimiser la proportion des polynucléaires neutrophiles dans la cytophérèse pour améliorer la cryopréservation et la greffe des cellules souches hématopoïétiques

Pr John DE VOS

Département d'Ingénierie Cellulaire et Tissulaire

INSERM 1183 – Institut de Recherche en Médecine régénérative et Biothérapies (IRMB)

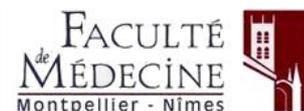
CPP Sud Méditerranée IV

Hôpital St Eloi - CHU de Montpellier

john.devos@inserm.fr

 @_jdevos_

SFH – MONTPELLIER – 2018



UNE BREVE HISTOIRE DE L'AUTOGREFFE

41 ans
en 2018

Trente ans d'autogreffe de moelle osseuse

Par CATHERINE PETITNICOLAS | Mis à jour le 15/10/2007 à 03:21 / Publié le 22/03/2007 à 06:00

IL Y A trente ans, le 10 février 1977 à l'hôpital Saint-Antoine, une autogreffe de moelle osseuse allait révolutionner le traitement des leucémies aiguës. Cette première mondiale était menée par Norbert-Claude Gorin et l'équipe du Pr Gérard Duhamel chez un patient atteint d'une leucémie aiguë, en rechute et sans espoir aucun de rémission. Cette greffe de sa propre moelle, prélevée et congelée avant de lui être réinjectée quelques mois plus tard, allait lui apporter les précieuses cellules souches, précurseurs des éléments du sang, indispensables au traitement de sa maladie. Cette première mondiale, publiée dans *The Lancet*, a changé le devenir de dizaines de milliers de malades atteints de leucémies aiguës myéloblastiques mais aussi de certains types de lymphomes et de myélomes. Un

très vite soit d'une infection gravissime, soit du fait d'une réaction du greffon contre l'hôte », explique le Pr Gorin. « Mais l'autre moitié des patients greffés a été sauvée. C'était donc un bond prodigieux dans le traitement des leucémies qui jusque-là ne guérissaient qu'à hauteur de 10 % des cas. » Mais, à l'époque, seuls 25 % des malades pouvaient espérer avoir un donneur compatible parmi leurs proches. Les trois quarts se retrouvaient sans solution thérapeutique. D'où l'idée de tenter une greffe chez des patients en rémission complète, à partir de leur propre moelle débarrassée de ses cellules malignes.

Un greffon «propre»

Le principe paraît simple mais se heurte à plusieurs obstacles. La moelle osseuse prélevée et congelée est très fragile car la congélation risque de provoquer une altération de sa structure par cristallisation. Norbert Gorin, alors jeune chef de clinique en stage au National Cancer Institute de Bethesda aux États-Unis, va mettre au point, après cinq ans d'un travail acharné, d'abord chez le chien, puis chez l'homme, une technique de congélation basée sur un processus de refroidissement progressif de la moelle (on refroidit d'un degré par minute jusqu'à moins 140°) couplée à l'utilisation d'un solvant qui inhibe cette cristallisation intracellulaire. Et pour éviter de réinjecter une moelle colonisée par des cellules tumorales, le greffon prélevé est traité en laboratoire avec un dérivé de l'endoxan qui va détruire ces cellules malignes tout en laissant subsister les cellules saines. On obtient ainsi un greffon « propre ». Juste avant la greffe, le patient est soumis à une puissante chimiothérapie qui détruit toutes les cellules de sa moelle. Étant en aplasie médullaire totale, il doit être placé en chambre stérile pour éviter tout risque infectieux. C'est à ce moment-là qu'intervient la greffe. Après trois semaines d'une étroite surveillance, celle-ci sera couronnée de succès. « *Un immense*

*Moelle +
mafosfamide*

**A PROSPECTIVE, RANDOMIZED TRIAL OF AUTOLOGOUS BONE MARROW
TRANSPLANTATION AND CHEMOTHERAPY IN MULTIPLE MYELOMA**

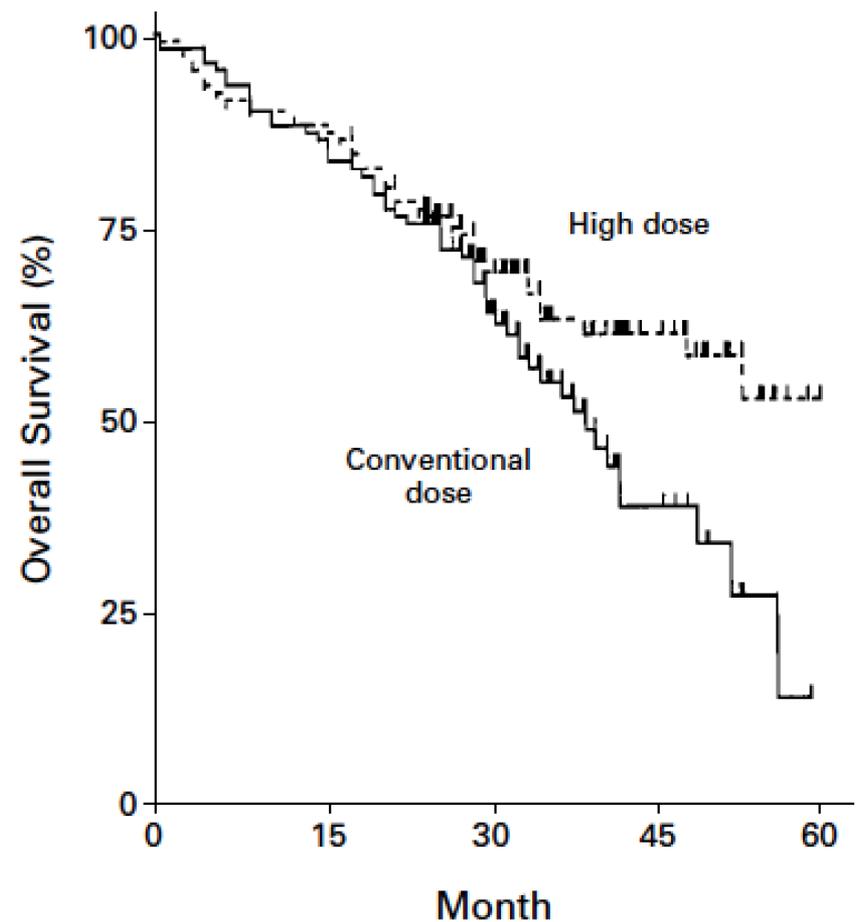
**MICHEL ATTAL, M.D., JEAN-LUC HAROUSSEAU, M.D., ANNE-MARIE STOPPA, M.D., JEAN-JACQUES SOTTO, M.D.,
JEAN-GABRIEL FUZIBET, M.D., JEAN-FRANÇOIS ROSSI, M.D., PHILIPPE CASASSUS, M.D., HERVÉ MAISONNEUVE, M.D.,
THIERRY FACON, M.D., NORBERT IFRAH, M.D., CATHERINE PAYEN, M.D., AND RÉGIS BATAILLE, M.D.,
FOR THE INTERGROUPE FRANÇAIS DU MYÉLOME***



The NEW ENGLAND
JOURNAL *of* MEDICINE

July 11, 1996

N Engl J Med 1996; 335:91-97



Conventional dose	63 (53-73)	35 (22-50)	12 (1-40)
High dose	69 (58-78)	61 (50-71)	52 (36-67)

Methods Two hundred previously untreated patients under the age of 65 years who had myeloma were randomly assigned at the time of diagnosis to receive either conventional chemotherapy or high-dose therapy and autologous bone marrow transplantation.

The NEW ENGLAND JOURNAL *of* MEDICINE

ESTABLISHED IN 1812

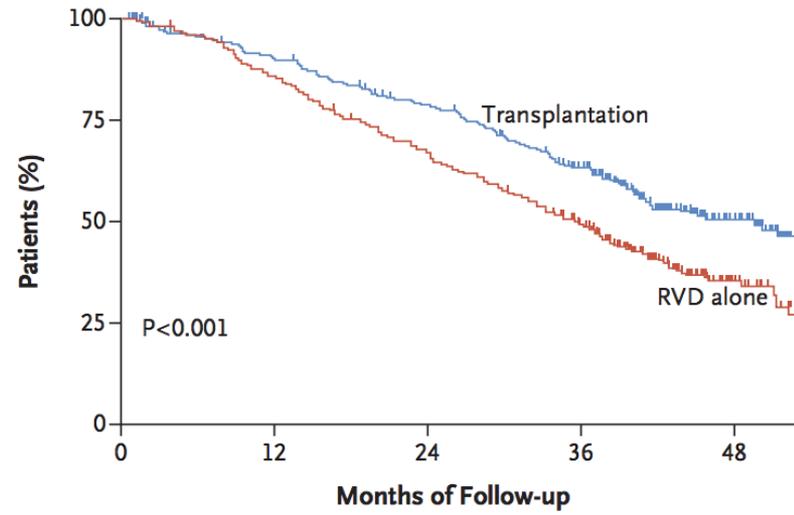
APRIL 6, 2017

VOL. 376 NO. 14

Lenalidomide, Bortezomib, and Dexamethasone with Transplantation for Myeloma

Michel Attal, M.D., Valerie Lauwers-Cances, M.D., Cyrille Hulin, M.D., Xavier Leleu, M.D., Denis Caillot, M.D., Martine Escoffre, M.D., Bertrand Arnulf, M.D., Margaret Macro, M.D., Karim Belhadj, M.D., Laurent Garderet, M.D., Murielle Roussel, M.D., Catherine Payen, M.D., Claire Mathiot, M.D., Jean P. Fermand, M.D., Nathalie Meuleman, M.D., Sandrine Rollet, M.S., Michelle E. Maglio, B.S., Andrea A. Zeytoonjian, B.S., Edie A. Weller, Ph.D., Nikhil Munshi, M.D., Kenneth C. Anderson, M.D., Paul G. Richardson, M.D., Thierry Facon, M.D., Hervé Avet-Loiseau, M.D., Jean-Luc Harousseau, M.D., and Philippe Moreau, M.D., for the IFM 2009 Study*

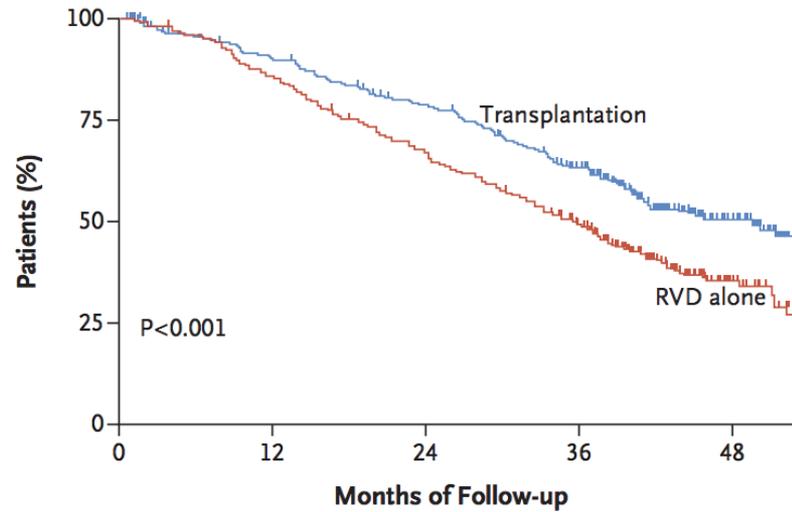
A Progression-free Survival



No. at Risk

RVD alone	350	294	228	157	32
Transplantation	350	308	264	196	50

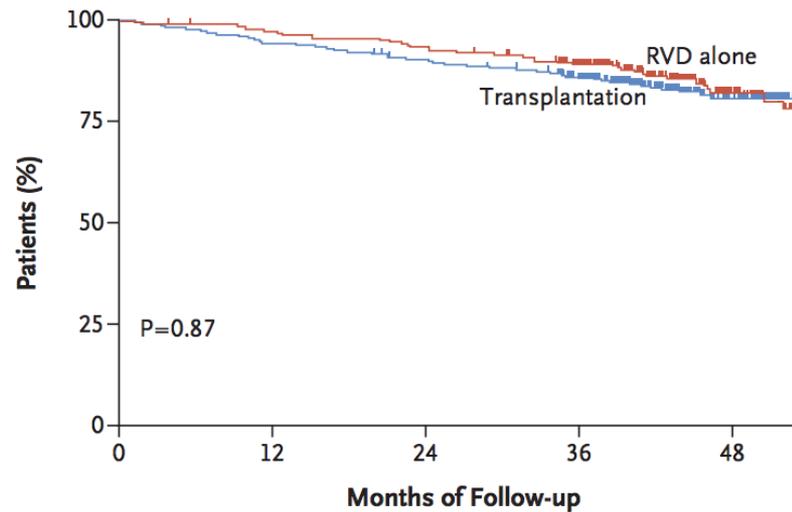
A Progression-free Survival



No. at Risk

RVD alone	350	294	228	157	32
Transplantation	350	308	264	196	50

B Overall Survival



No. at Risk

RVD alone	350	339	325	293	95
Transplantation	350	330	313	281	89

CONGELATION DE L'APHERESE

Mort cellulaire après gel : phénomène bien connu chez les plantes...



Congélation de cellules souches hématopoïétiques

- Descente en température contrôlée
- Utilisation de cryoprotecteurs (DMSO, éthylstarch, albumine, etc.)

Congélation réalisée le Vendredi 05 Août par M

Courbe : 2 PTC UTG

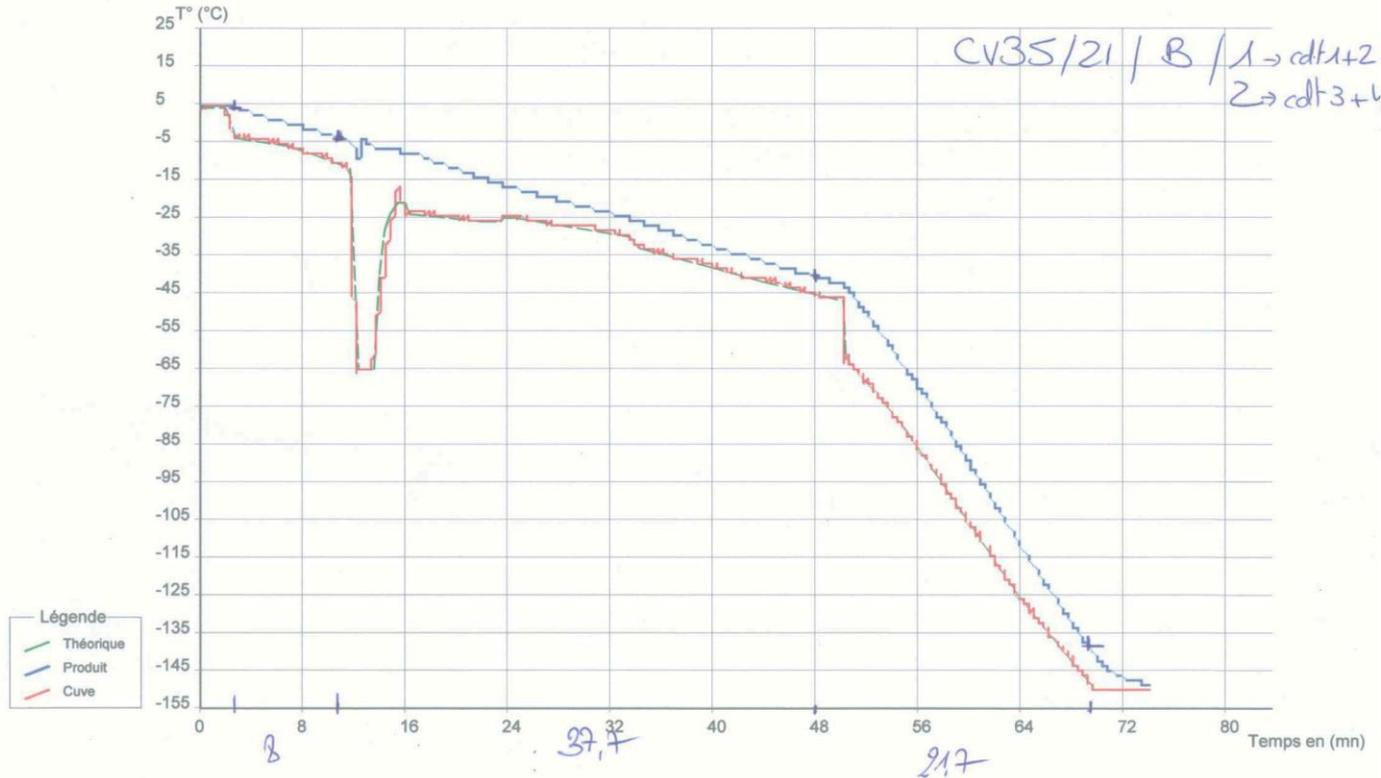
Maintien sur Ecart : 10°

Type de Produit : CSSP+DLI

Patient	Quantité
mon-00010141	1x100 mL 1x50 mL
1x60 mL 1x30 mL	

T°C Mini en fin de congélation -149.2 °C

T°C Maxi en fin de congélation -140.7 °C



Toutes les cellules se congèlent/décongèlent bien?..

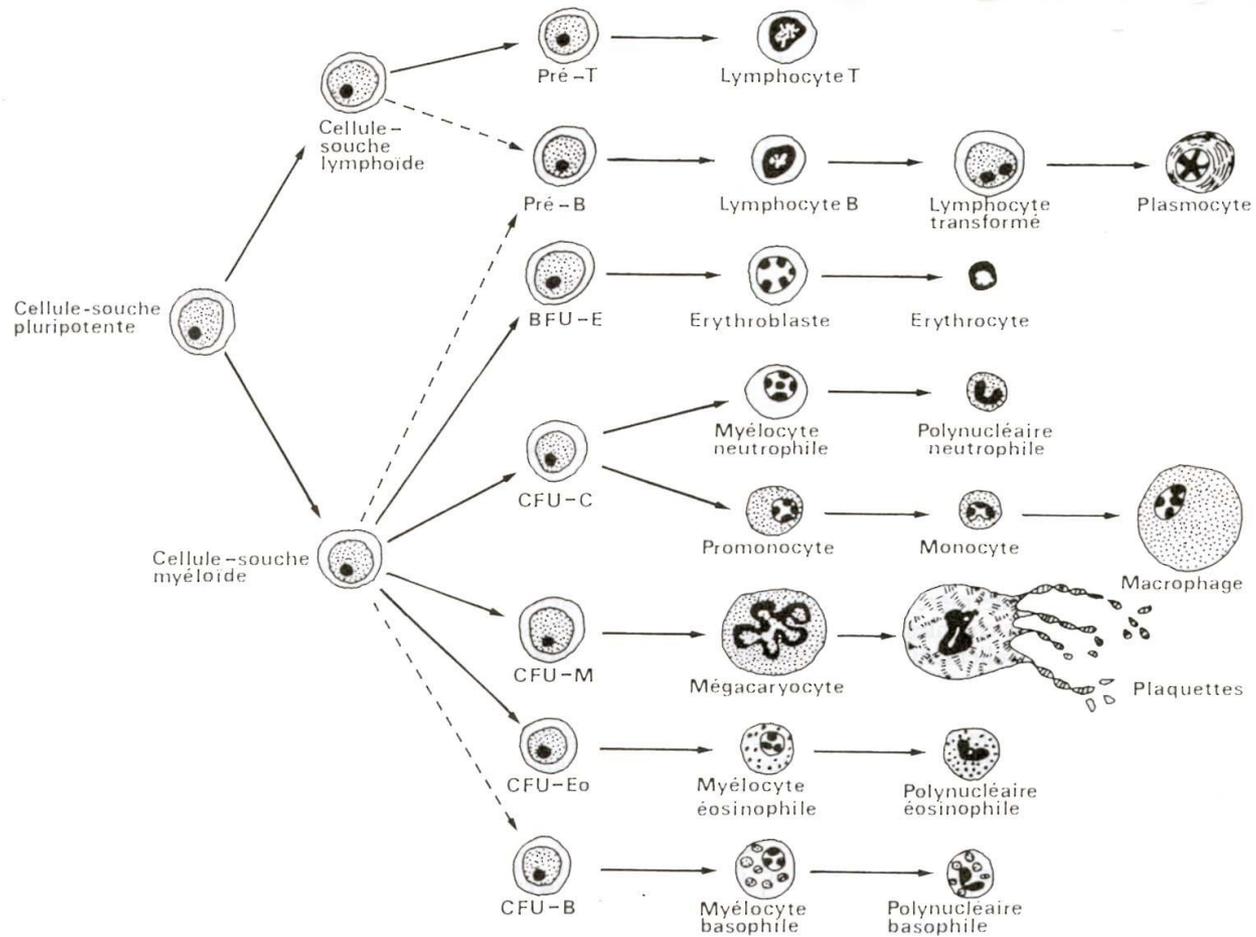
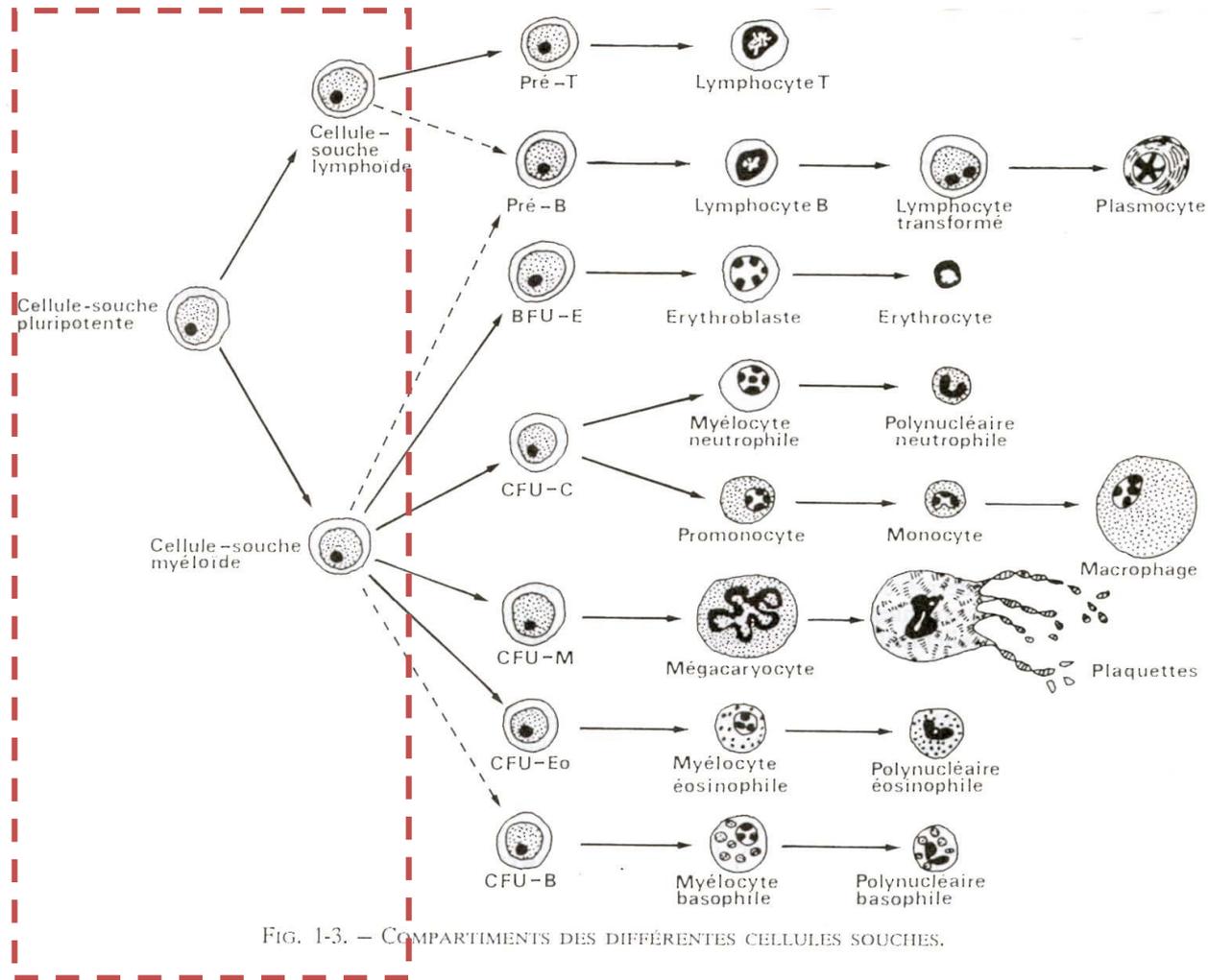


FIG. 1-3. — COMPARTIMENTS DES DIFFÉRENTES CELLULES SOUCHES.

Toutes les cellules se congèlent/décongèlent bien?..

Cellules souches hématopoïétiques



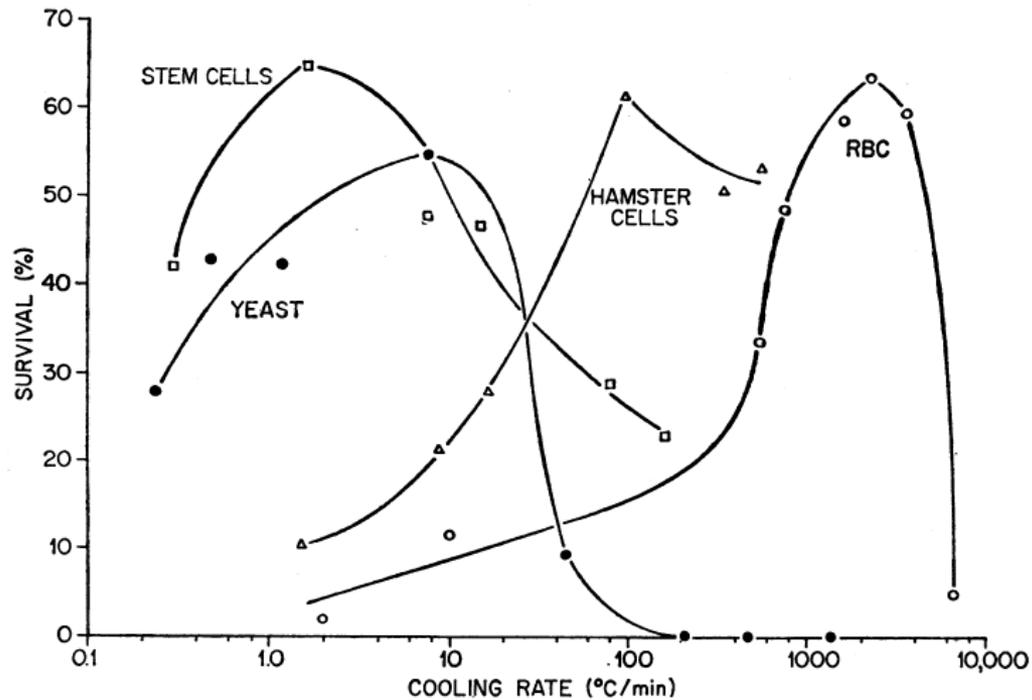
Facile à congeler



Difficile à congeler

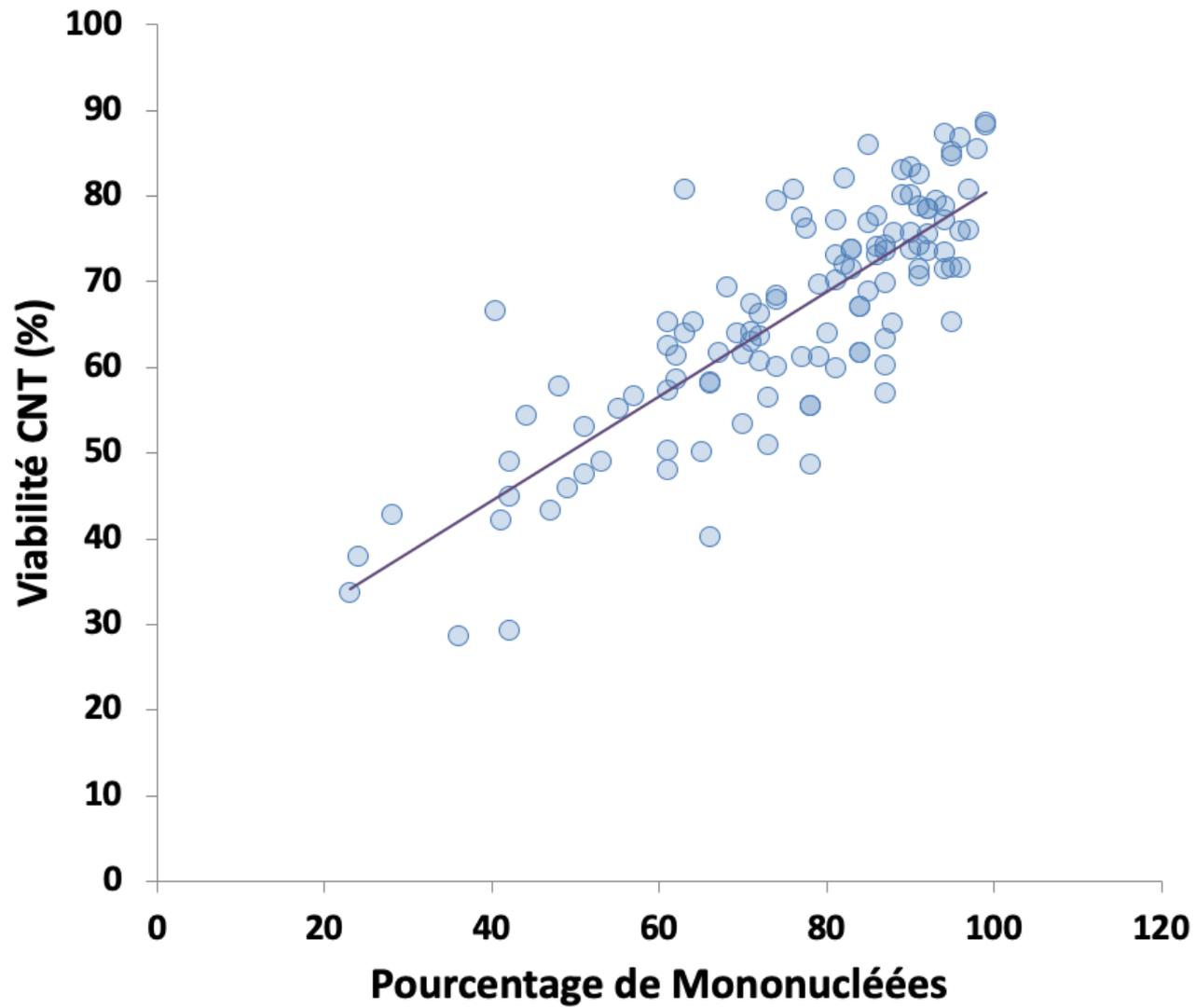
Variabilité de la vitesse de congélation optimum

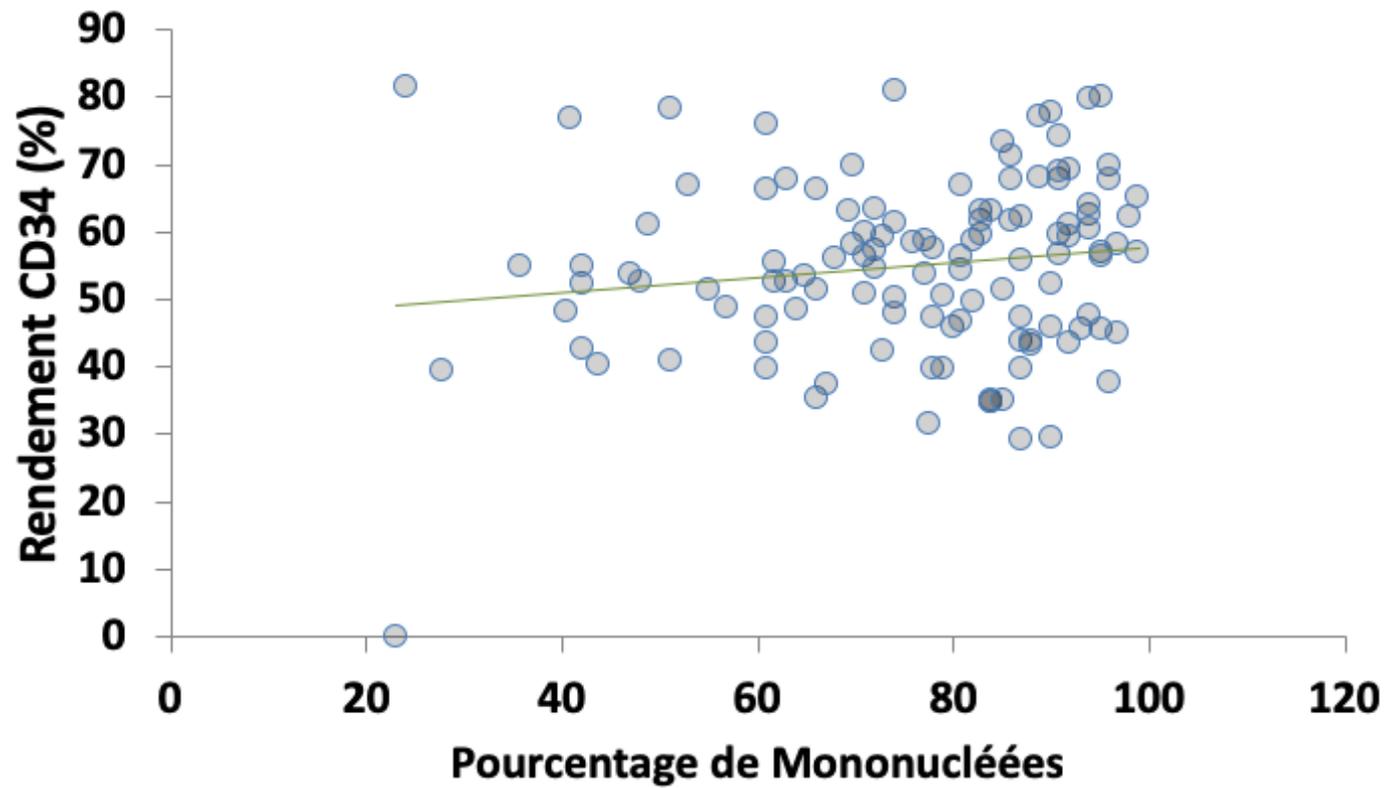
- Variabilité de la vitesse de congélation optimum



Science, Vol 168:939
1970

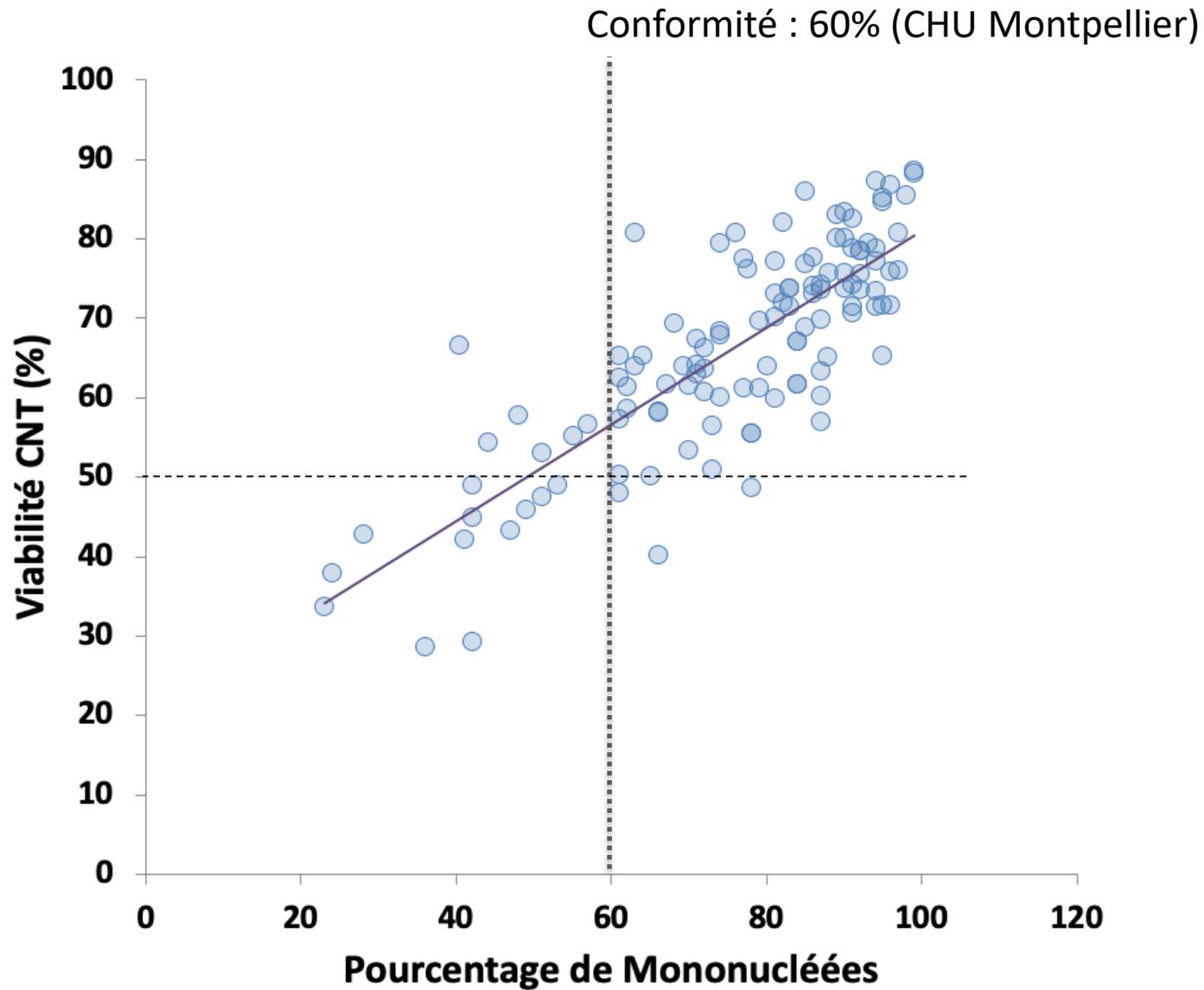
% GRANULOCYTES ET VIABILITE DU PRODUIT

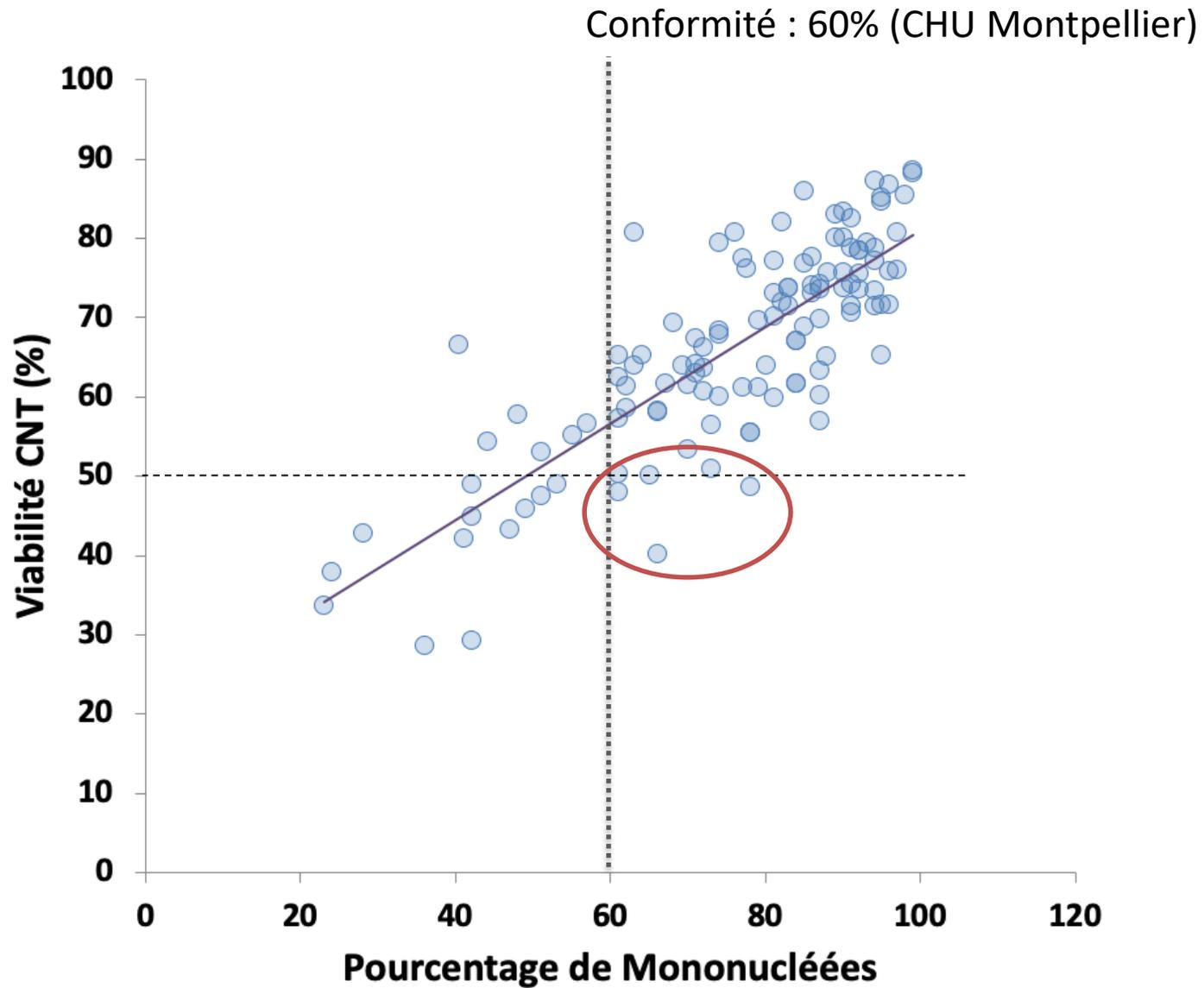




Problématique des mauvaises viabilités

- Difficile de justifier un seuil de conformité < 50% de viabilité totale (cf. ANSM)
- JACIE (France) : 60% de viabilité totale
- Choix de l'UTC de Montpellier : conformité > 50%





% GRANULOCYTES ET AE SEVERES

Facteur confondant d'effets secondaires (AE) à l'injection : DMSO !

Correspondence

Severe neurotoxicity because of dimethyl sulphoxide following peripheral blood stem cell transplantation

Bone Marrow Transplantation (2003) **31**, 315. doi:10.1038/sj.bmt.1703848

P Windrum
TCM Morris

*Department of Haematology,
Belfast City Hospital, Lisburn
Road, Belfast, BT9 7AB,
Northern Ireland*

Bone Marrow Transplantation (2003) **31**, 315
© 2003 Nature Publishing Group All rights reserved 0268-3369/03 \$25.00



www.nature.com/bmt

HEMAPHERESIS

Occurrence and severity of adverse events after autologous hematopoietic progenitor cell infusion are related to the amount of granulocytes in the apheresis product

Boris Calmels, Claude Lemarié, Benjamin Esterni, Caroline Malugani, Aude Charbonnier, Diane Coso, Jean-Marc Schiano de Colella, Eric Deconinck, Denis Caillot, Frédéric Viret, Patrick Ladaique, Valérie Lapierre, and Christian Chabannon

TRANSFUSION 2007;47:1268-1275.

TABLE 3. HPC graft characteristics

Characteristics	AE grade*		p Value†	Number
	0	1-4		
Number of infusions	424	66		490
Before cryopreservation				
CD34+ (×10 ⁶ /kg)	5.0 (1.5-55.5)	5.5 (2.0-31.4)	0.71	490
CD45+ (×10 ⁸ /mL)	2.0 (0.3-7.0)	3.1 (0.3-6.0)	1.5 × 10 ⁻⁵	351‡
CD45+ (×10 ⁹)	52 (3-281)	96 (9-357)	1.2 × 10 ⁻⁵	351‡
Granulocytes (×10 ⁹)	8 (0-152)	33 (0-186)	4.3 × 10 ⁻¹⁴	490
Myelocytes (×10 ⁹)	5 (0-50)	9 (0-60)	2.5 × 10 ⁻⁴	351‡
CD45+ others (×10 ⁹)	31 (0-149)	35 (2-142)	0.16	351‡
Number of cryopreserved bags per infusion	2.6 (1-8)	2.6 (1-6)	0.88	490
Washing technique				
Centrifugation	321	53	0.51§	374
CytoMate	103	13	0.51§	116
After thawing and <u>washing</u>				
CD34+ (×10 ⁶ /kg)	4.1 (0.3-29.9)	3.9 (0.3-24.4)	0.52	490
CD34+ recovery (%)	85 (9-150)	75 (13-138)	2.8 × 10 ⁻³	490
CD45+ viability (%)	71 (18-98)	57 (17-89)	2.5 × 10 ⁻⁹	490
Volume infused (mL)	263 (50-703)	214 (91-552)	6.4 × 10 ⁻³	484‡
Volume infused (mL/kg)	3.8 (0.5-13.6)	3.3 (1.1-8.2)	0.03	481‡
Infusion flow (mL/min)	9.0 (1.3-45.5)	7.2 (1.4-52.3)	0.06	410‡
Neutrophil engraftment				
ANCII > 0.5 × 10 ⁹ /L (day)	11.0 (6-29)	11.0 (8-33)	0.46	402‡

* Data are reported as median (range).

† U test

‡ Some data not available.

§ Chi-square test.

|| ANC = absolute neutrophil count.

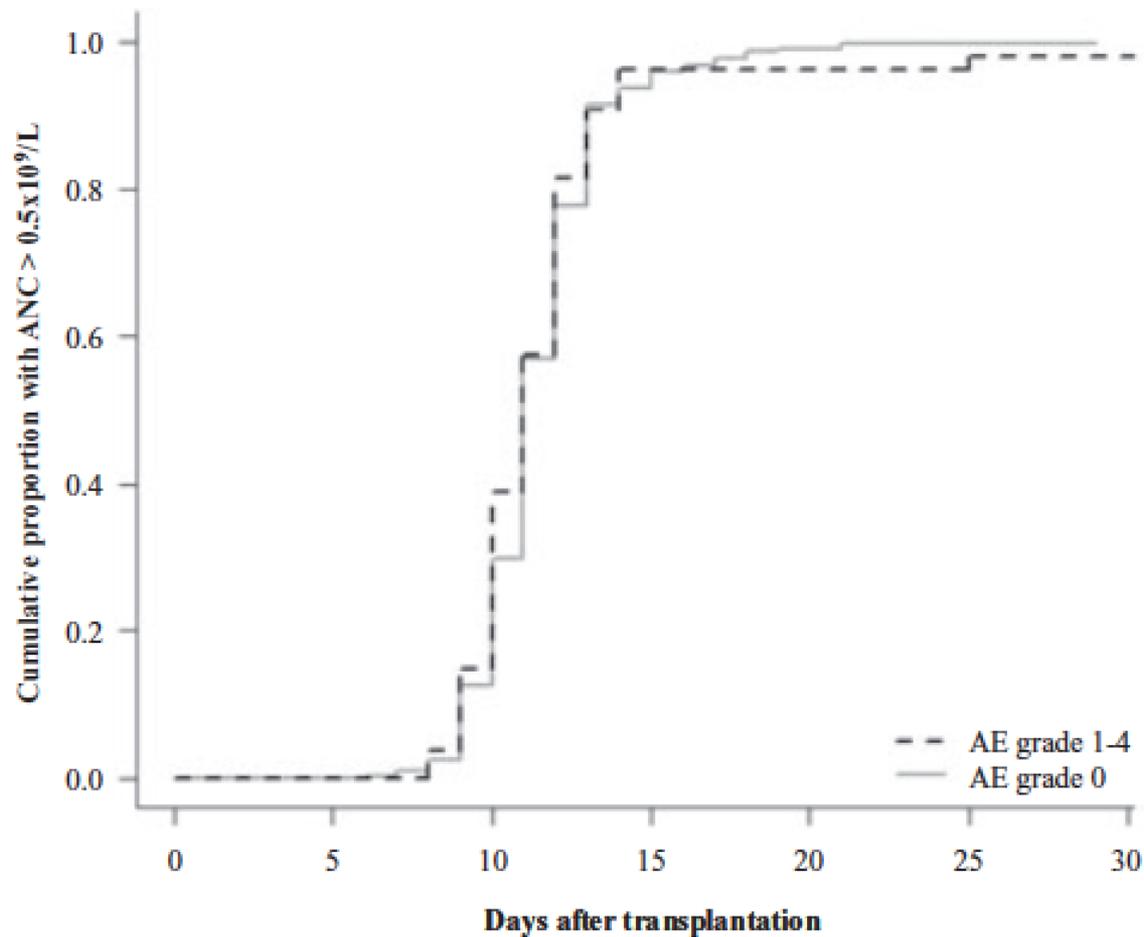


Fig. 3. Hematopoietic reconstitution of patients with or without AEs. ANC = absolute neutrophil count.

TRANSFUSION 2007;47:1268-1275.

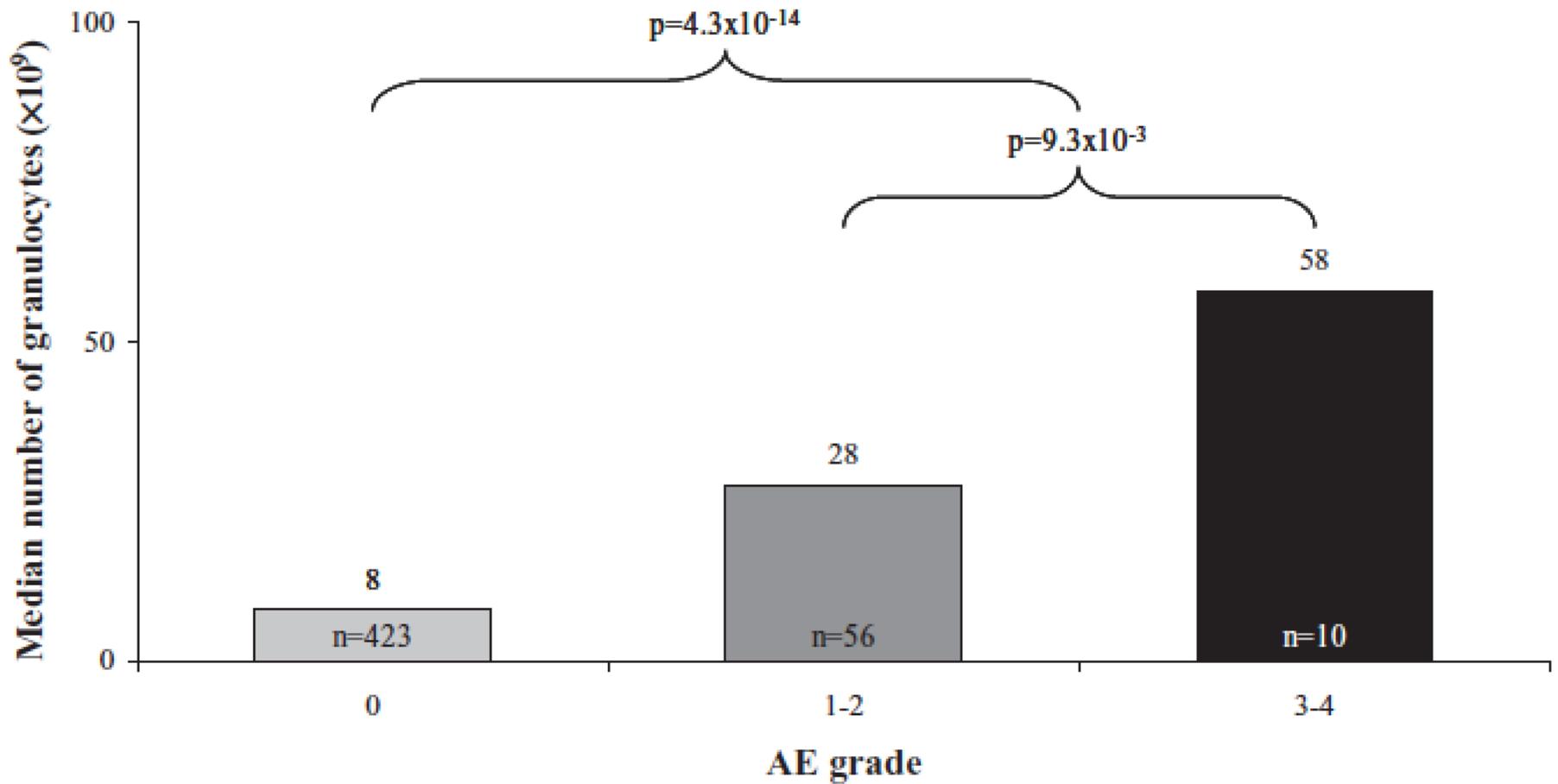


Fig. 1. Prefreeze HPC graft content in granulocytes according to the severity of AEs.

TRANSFUSION 2007;47:1268-1275.

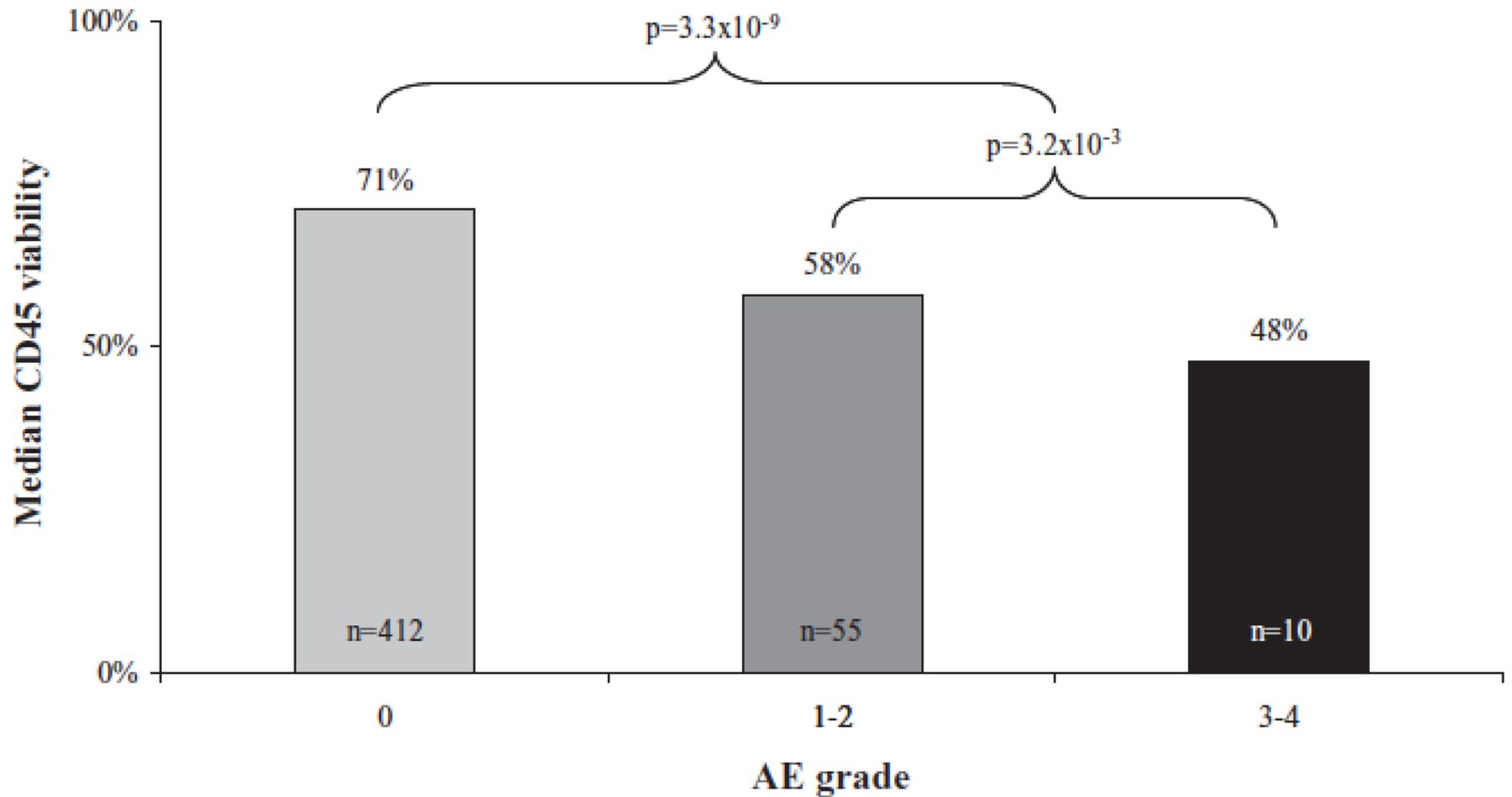


Fig. 2. CD45+ cell viability according to the severity of AEs.

TABLE 2. Details of reported AEs*

AE grade	Number
1	
Throat irritation	18
Thrill	7
Flashing lights	6
Nausea	5
Pruritus	4
Vertigo	1
Chest pain	1
2	
Vomiting	21
Vasovagal episode	5
Flushes	5
Tremor	2
Confusion	1
Abdominal pain	1
Headache	1
3	
Vision loss	1
4	
Loss of consciousness	8
Seizure	7
Cardiac arrest	11

* AEs were graded according to the CTC-NCI classification. When more than one AE was reported per infusion, the highest grade AE was recorded for the infusion.

TRANSFUSION 2007;47:1268-1275.

TABLE 2. Details of reported AEs*

AE grade	Number
1	
Throat irritation	18
Thrill	7
Flashing lights	6
Nausea	5
Pruritus	4
Vertigo	1
Chest pain	1
2	
Vomiting	21
Vasovagal episode	5
Flushes	5
Tremor	2
Confusion	1
Abdominal pain	1
Headache	1
3	
Vision loss	1
4	
Loss of consciousness	8
Seizure	7
Cardiac arrest	11

* AEs were graded according to the CTC-NCI classification. When more than one AE was reported per infusion, the highest grade AE was recorded for the infusion.

TRANSFUSION 2007;47:1268-1275.

CONCLUSION

- Il est important de minimiser les granuleux dans le produit d'aphérèse
- Déterminer un seuil de conformité, déclarer toutes les non-conformités (NC) et les analyser
- Travailler sur le choix de la mobilisation, de la machine d'aphérèse, du ratio temps d'aphérèse/épaisseur de la couche, etc.