

LE GREFFON HEMATOPOIETIQUE ALLOGENIQUE VU SOUS L'ANGLE DE LA THERAPIE CELLULAIRE

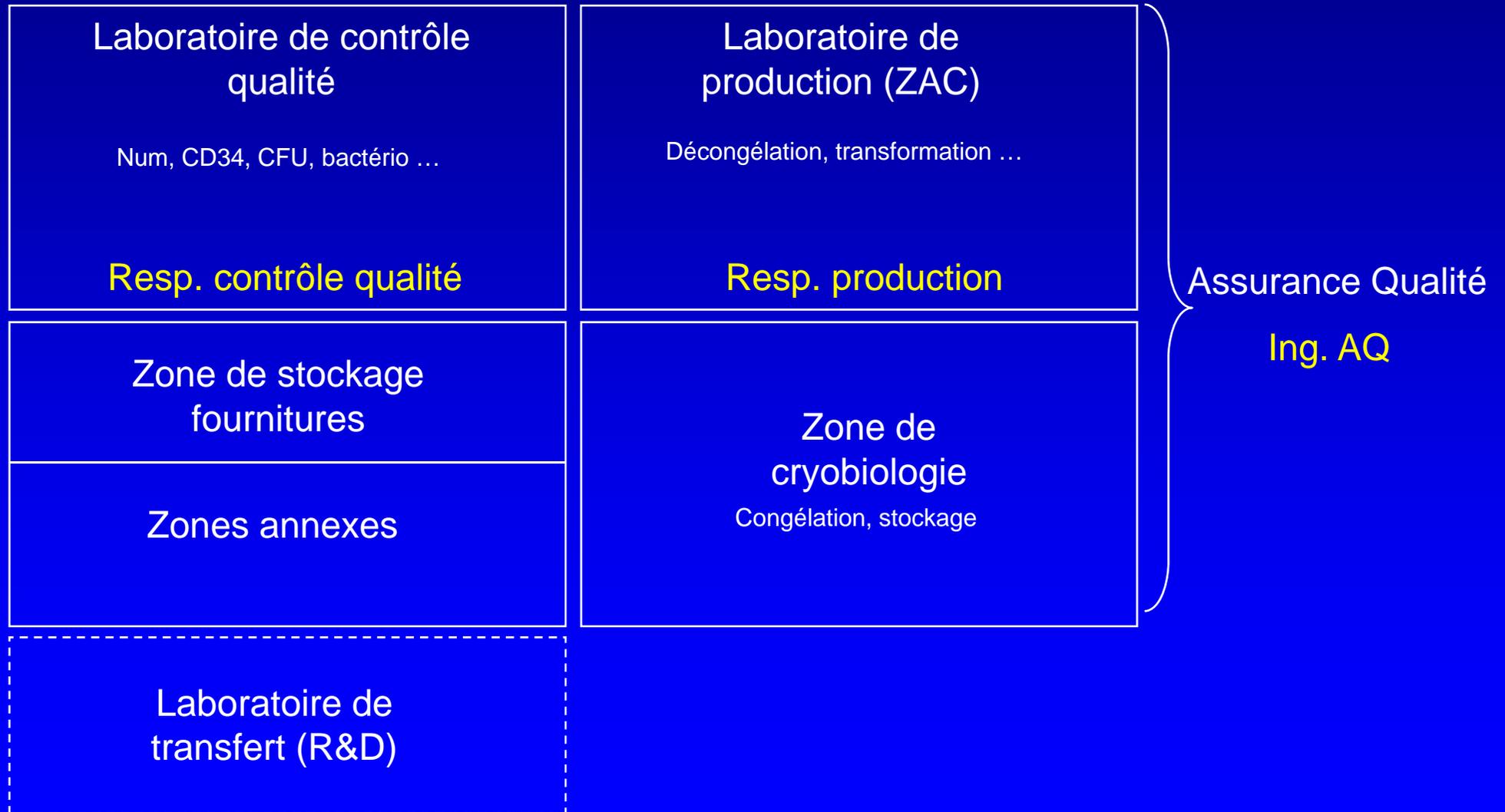
Dr Delphine Rea
Unité de Thérapie Cellulaire et Service des Maladies du Sang
Hôpital Saint-Louis, Paris
AIH JJH 30 septembre 2006

THERAPIE CELLULAIRE

- **Thérapie cellulaire:** administration à un patient de cellules humaines, autologues ou allogéniques, dont le but est de prévenir, traiter ou atténuer une maladie
- **Activité strictement règlementée et contrôlée par l'AFSSAPS**
 - Autorisation d'établissement et renouvellement d'autorisation tous les 5 ans (décret n°2001-909 du 1^{er} octobre 2001)
 - Encadrement juridique strict
 - Bonnes pratiques de prélèvement, transport, transformation et conservation des CSH et CMN à visée thérapeutique (arrêté du 16 décembre 1998, décret 2005-440 du 10 mai 2005)
 - Conditions d'autorisation pour la mise en oeuvre d'essais cliniques (arrêté du 3 février 2003)
 - Règles de sécurité sanitaire portant sur le prélèvement et l'utilisation des éléments et produits du corps humain (décret 2005-1618 du 21 décembre 2005).
 - Traçabilité draconienne (personnels, cellules, PTA, fournitures, appareils, réactifs ...)
- **Harmonisation des pratiques à l'échelon européen *via* des directives**

STRUCTURE D'UN LABORATOIRE DE THERAPIE CELLULAIRE

Responsable médical



SECTEUR CONTRÔLE QUALITE

- **Responsabilité distincte de celle de la production**
- Compétence du laboratoire vérifiée par contrôles de qualité externes pluriannuels réalisés par l'AFSSAPS
- **Contrôle de la qualité des greffons**
 - A réception (produit initial)
 - Sur le produit final après transformation
 - Juste avant délivrance au patient (frais ou décongelé)
 - Juste avant congélation
 - Eventuellement aux étapes intermédiaires de transformation
- **Greffons hématopoiétiques**
 - Numération cellulaire sur automate
 - Mesure de viabilité par cytométrie de flux (IP ou 7-AAD)
 - Mesure quantitative des cellules d'intérêt (CD34, CD3 ...)
 - Evaluation fonctionnelle des cellules souches (CFU-GM)
 - Contrôle microbiologique aéro-anaérobie

SECTEUR PRODUCTION

- Responsabilité distincte de celle du contrôle qualité
- Zone à pression et atmosphère contrôlées
- Accès réservé et entrées contrôlées
 - SAS personnel, SAS produits, SAS déchets, SAS fourniture, SAS échantillon
- Salles de production: étapes de transformation (sauf descente en température et conservation des greffons congelés)
 - Concentration
 - Déplasmatisation
 - Déplaquettisation
 - Désérythrocytation
 - Immunosélection
 - Culture
 - Irradiation UV (PCE)
 - Décongélation
 - Thérapie génique si locaux accrédités

LA ZAC: ENVIRONNEMENT CONTRÔLE

- Contrôles bactériologique et mycologique des surfaces
- Contrôles de l'air: bactériologie, mycologie, particules

Classe	Degré	Efficacité filtre terminal (%)	Nb Particules/m ²		Max micro- organismes/ m ³
			0.5 μ	5 μ	
100	A2	99.997	3 500	0	< 1
1 000	B		35 000	200	
10 000	C		350 000	2 000	
100 000	D	95	3 500 000	20 000	< 500

Niveau 1: congélation / délivrance sans transformation préalable autre que par des moyens physiques en circuit clos

Niveau 2: transformation selon des procédés réalisés en système clos

Niveau 3: transformation selon des méthodes nécessitant des étapes en système ouvert

Minimum: salle classe D sous PSM classe A

SECTEUR CRYOBIOLOGIE

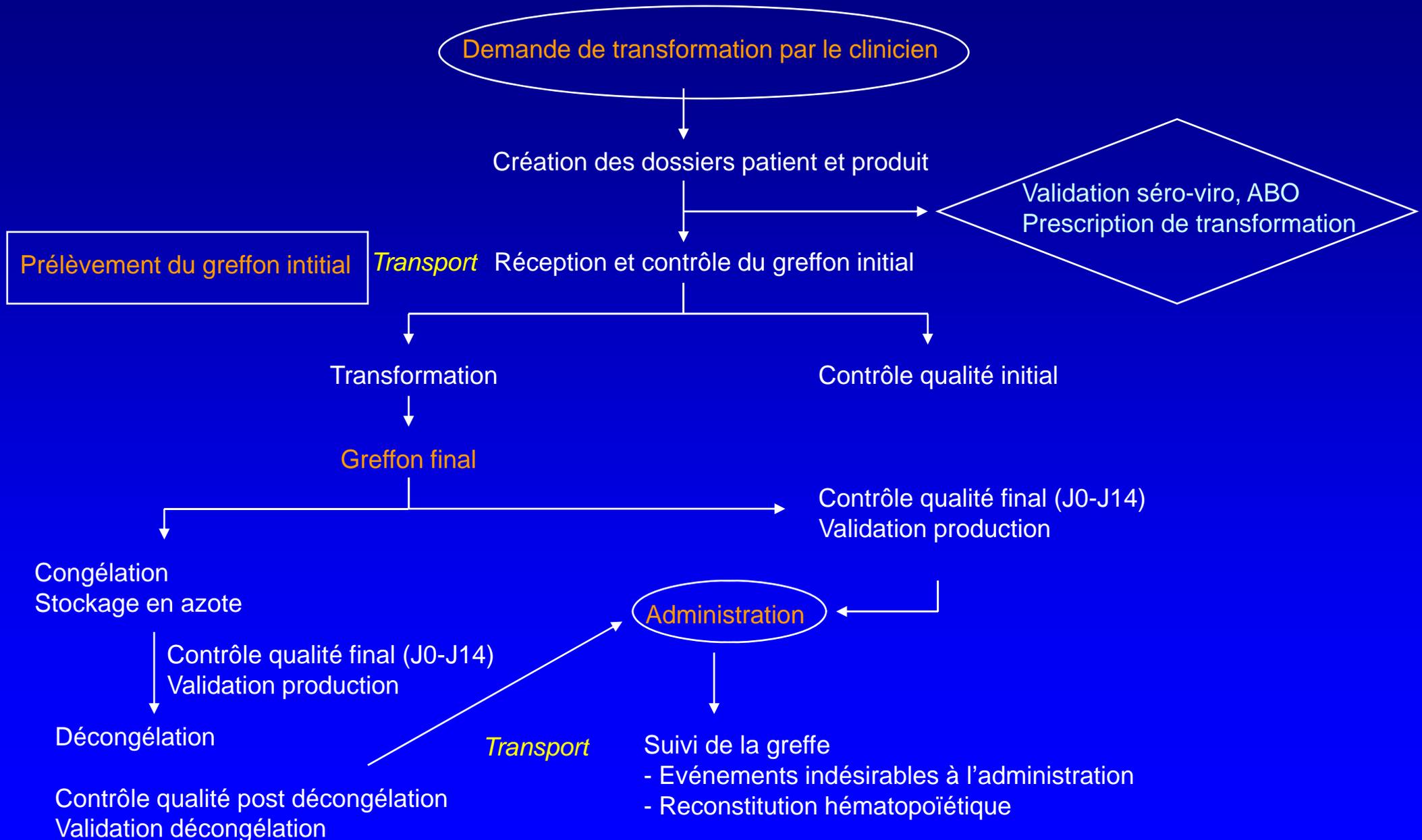
- Descente en température contrôlée des greffons et stockage en azote
 - Azote liquide à -196°C
 - Vapeur d'azote à -135°C
- Zone à température et humidité contrôlées avec extraction d'air continu et en cas de teneur en $\text{O}_2 < 19\%$, sous alarme



L'ASSURANCE QUALITE

- **Repose sur les Bonnes Pratiques:**
 - Prélèvement
 - Transformation
 - Contrôle Qualité
- **Concerne:**
 - La conception des locaux et le contrôle de l'environnement
 - La qualification et la validation des équipements
 - La qualification et la formation du personnel
 - Les matières premières, réactifs et consommables
- **Comprend:**
 - Le système documentaire (procédures, modes opératoires, instructions)
 - La traçabilité des opérations de transformation
 - La traçabilité des cellules donneur/receveur
 - La description des modalités de biovigilance et de rappel des produits

CIRCUIT DU GREFFON ALLOGENIQUE



VALIDATION SERO-VIRO - PRESCRIPTION TF

- **Sérologies règlementaires: < 4 semaines précédant le prélèvement* (allogreffe)**
 - Agp24, VIH 1 et 2, Ac anti-HCV, Ag HbS et Ac anti-Hbc, Ac anti-HLTVI ou I/II, syphilis (TPHA), Ac anti-EBV (IgG totales ou Ac anti-VCA), Ac anti-CMV (IgM, IgG), séro toxo
 - Dépistage palu selon le risque de transmission
 - Sérologie West Nile virus (USA en période de transmission)
- En cas de risque de transmission **VIH, HCV, HBV, HTLVI ou syphilis**, la greffe est interdite mais il existe des mesures dérogatoires après information et consentement du patient (hépatite B et C) (décret 2005-1618).
- **Groupes sanguins: examens règlementaires**
 - ABO, Rh, C, E, c e si Rh neg, RAI, Ac anti-A ou B immuns, Hb, Ht
- Validation séro/viro au LTC: conforme/non conforme
- Prescription de transformation: selon spécifications du clinicien, type de greffon et groupe ABORH - RAI du couple donneur/receveur

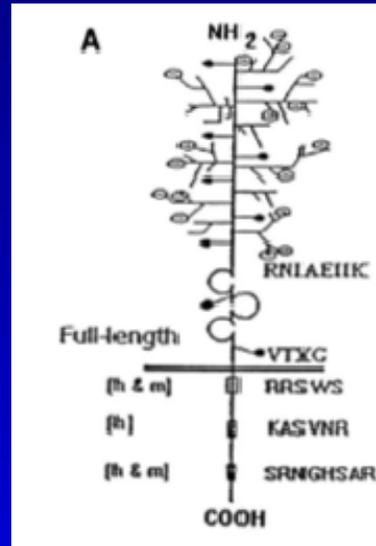
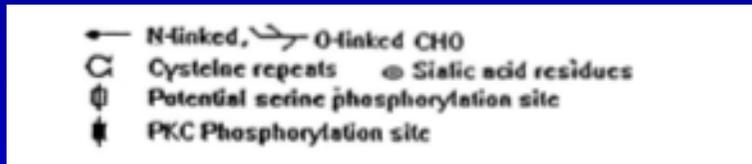
* Décrets 95-195 16/02/1995, 97-928 9/10/1997, 2003-1153 28/1/2003,

LES EXAMENS DU CONTRÔLE QUALITE EN ROUTINE

- **Numération**
 - Cellules nucléées totales
- **Viabilité des CNT**
 - En cytométrie de flux: marquage 7-AAD ou iodure de propidium
- **Quantification des populations cellulaires d'intérêt**
 - Cellules CD34+: marquage CD45/CD34 en cytométrie de flux
 - Lymphocytes CD3+ (greffons allogéniques et lympho du donneur)
- **Tests fonctionnels: CFU-GM: difficile à standardiser et résultats rendus après 14 jours de culture**
- **Contrôle microbiologique sur flacons d'hémoculture aéro-anaérobie (10-14 jours)**



MARQUAGE CD34 DES CSH: LA MOLECULE CD34



Domaine extracellulaire
 Fortement N- et O-glycosylé:
 famille des sialomucines

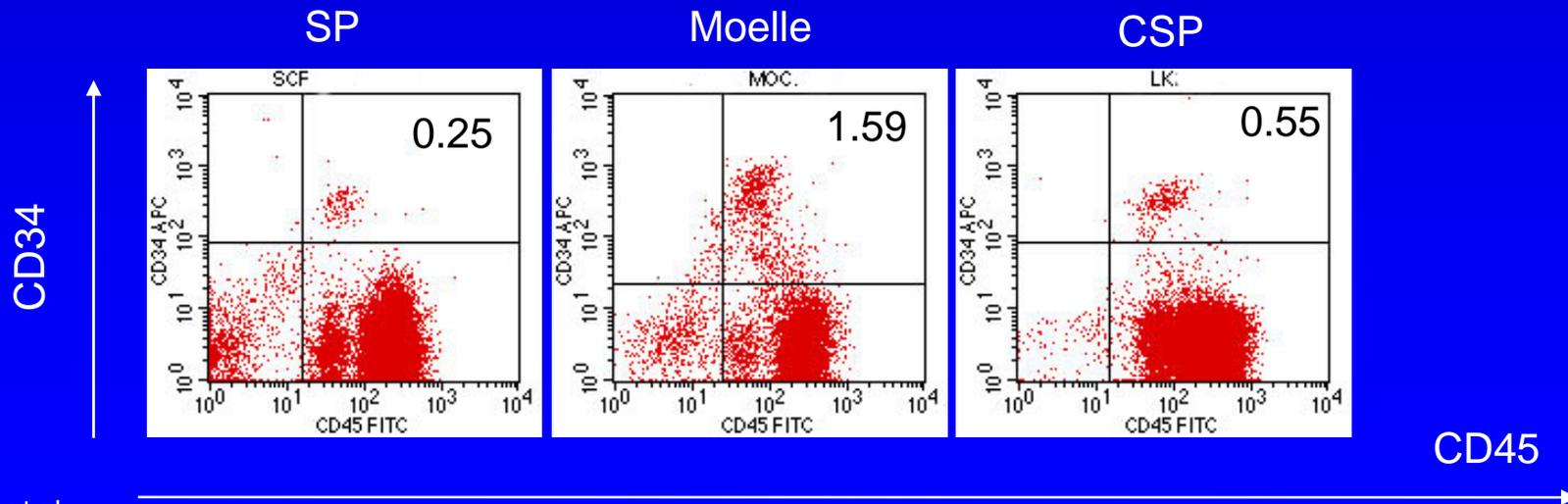
Domaine trans-membranaire

Domaine intracellulaire:
 signalisation

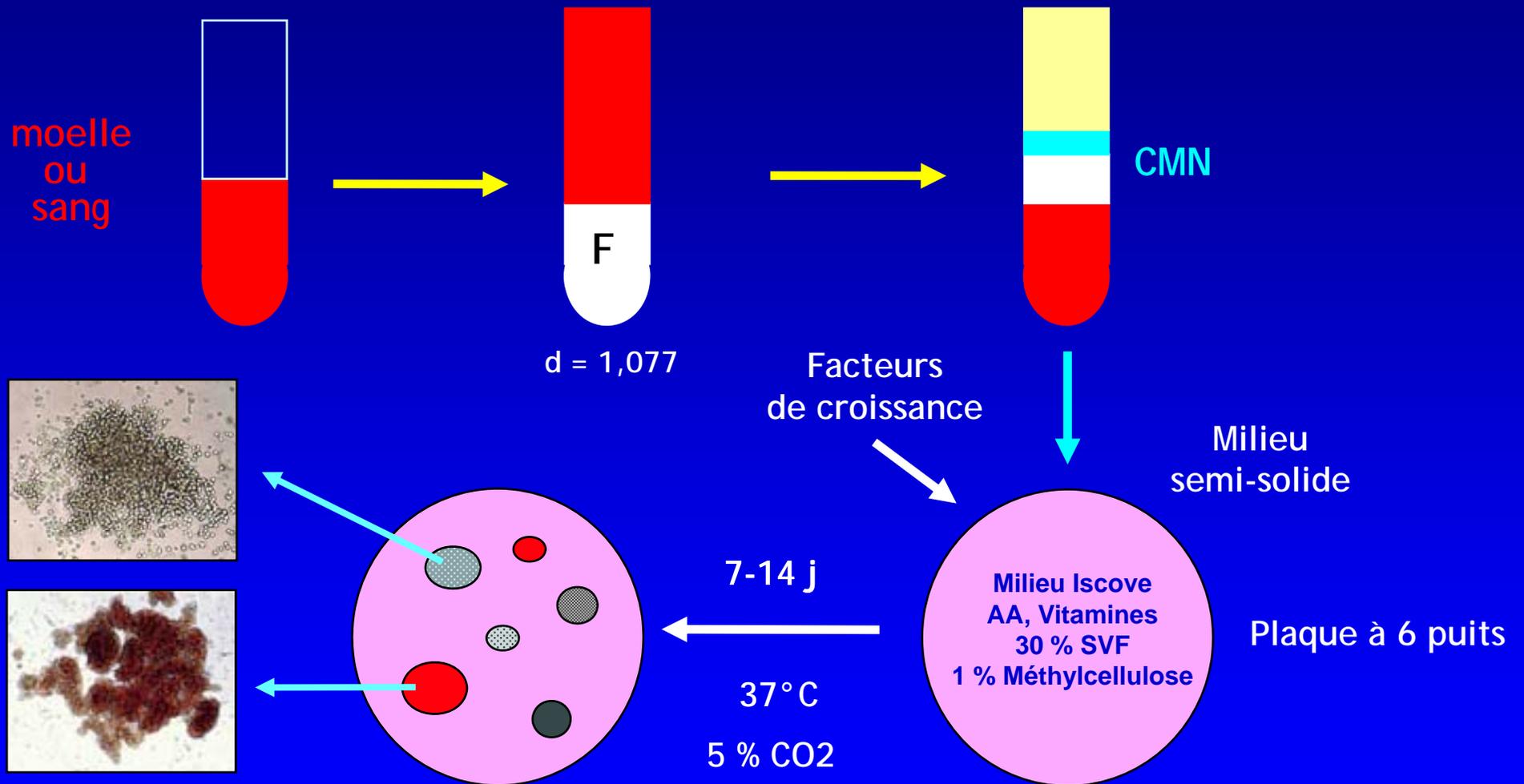
- 3 classes d'anticorps selon leur capacité à reconnaître CD34 après traitement enzymatique: neuraminidase, O-glycoprotéase et chymopapaine.
- Classe III obligatoire: reconnaissance des épitopes résistants aux 3 enzymes: quelque soit l'état de glycosylation de la molécule CD34. En association avec un anti-pan CD45 qui doit reconnaître toutes les isoformes de CD45.
- 2 techniques de numération des CD34 (double ou simple plateforme)

MARQUAGE CD34 DES CSH

*	Cordon (n=13)	Moelle (n=12)	CSP (n=11)
ml	93 ± 9	963 ± 63	172 ± 40
CNT x10 ⁹	1.75 ± 0.23	23.02 ± 1.48	37.7 ± 3
% CD34+	0.3 ± 0.06	0.99 ± 0.17	0.77 ± 0.15
Cellules CD34+ x10 ⁶	5.45 ± 1.28	227.4 ± 34.46	277.9 ± 57.4

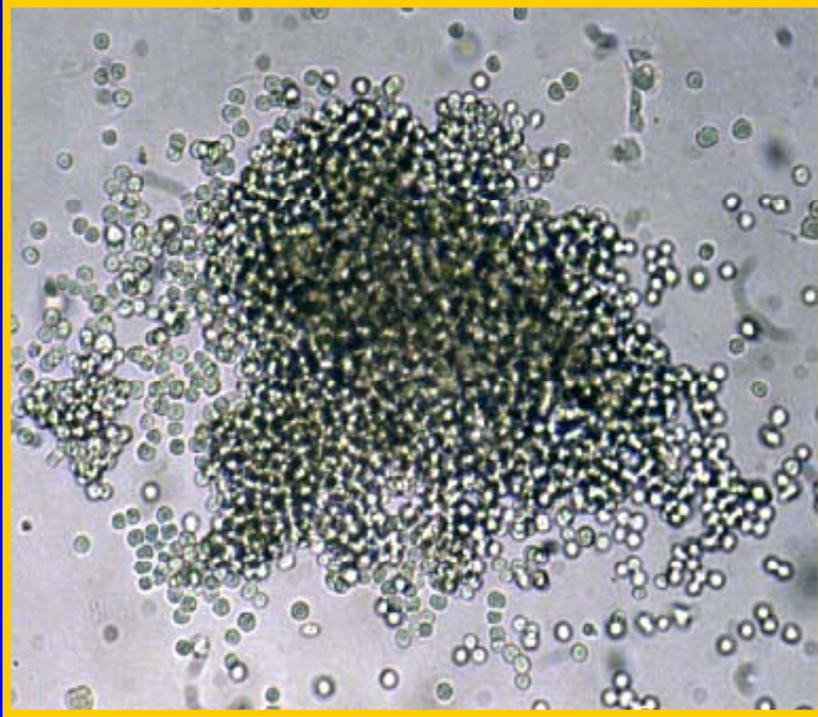


TESTS CLONOGENIQUES: PRINCIPE



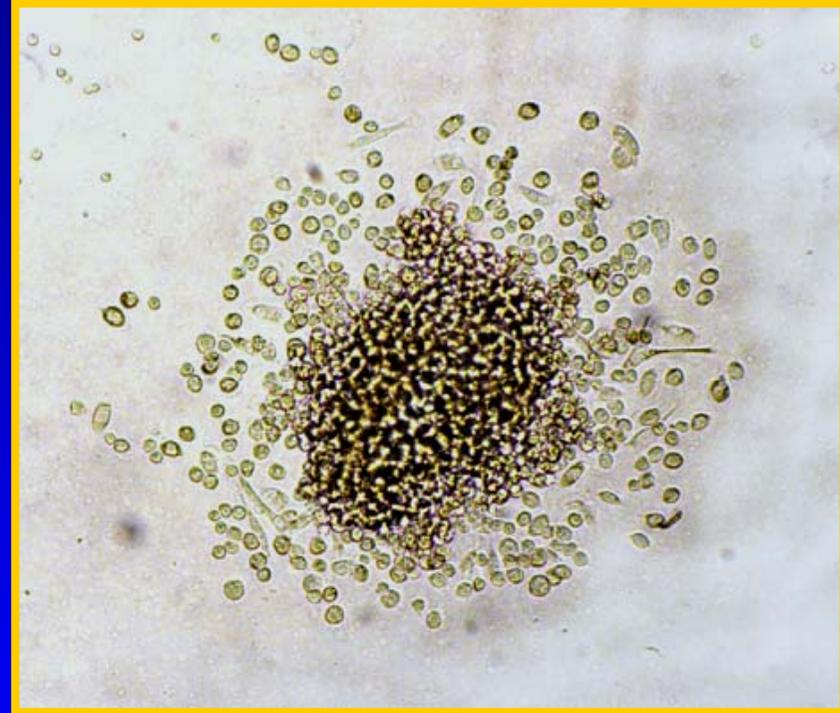
Par ex. : G-CSF + GM-CSF + IL3 + EPO +/- SCF

TESTS CLONOGENIQUES: RESULTATS



CFU-GM

Comptage des
colonies
contenant plus
de 50 cellules



CFU-M

LA PRODUCTION EN ROUTINE

- **Moelle allo**
 - Filtration systématique
 - Concentration quasi systématique (simple ou par buffy coat)
 - Désérythrocytation si incompatibilité ABO majeure et selon RAI donneur/receveur
- **CSP allo**
 - Déplasmatisation si incompatibilité ABO mineure
 - Désérythrocytation exceptionnelle
 - Déplaquettisation avec réinjection des plaquettes au donneur si plaq post cyta < 50 000/mm³
- **Sang placentaire**
 - Congélation/décongélation
 - Pas de réduction de volume pré-congélation à Saint-Louis
- **CMN allo**
 - Congélation/décongélation

GREFFONS ALLOGENIQUES ET COMPATIBILITE ABO: ASPECTS TECHNIQUES

- **Désérythrocytation des moelles**

- Si GR > 125ml: sur séparateur de cellule type Cobe Spectra en flux continu
- Si GR < 125ml: par centrifugation sur gradient de Ficoll
- Objectif: GR résiduels < 20-25ml

- **Déplasmatisation des CSP**

- Centrifugation dur laveur type Cobe 9221, élimination du surnageant et resuspension en solution isotonique

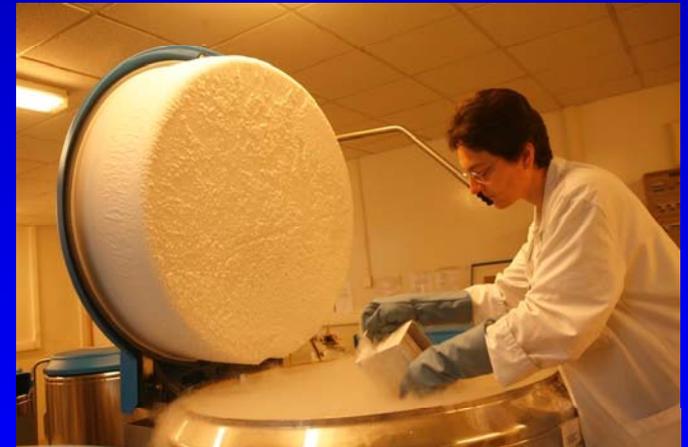
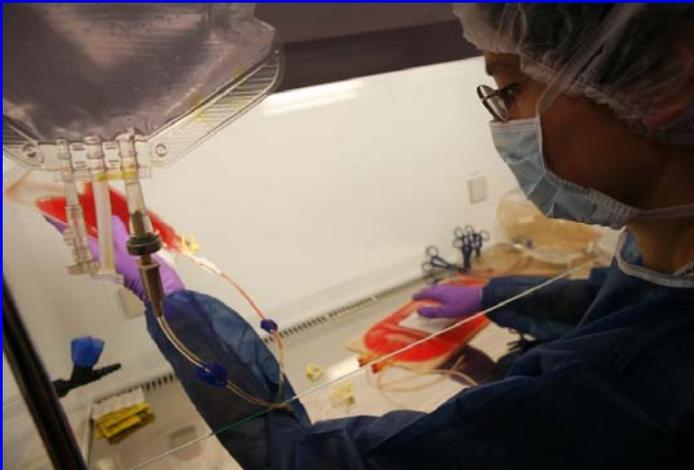
- **Désérythrocytation des CSP: cas exceptionnel**

- Le volume des GR est toujours < 125ml
- Pour désérythrocyter sur Cobe Spectra, il faut rajouter un CGR de groupe O phénotypé compatibilisé



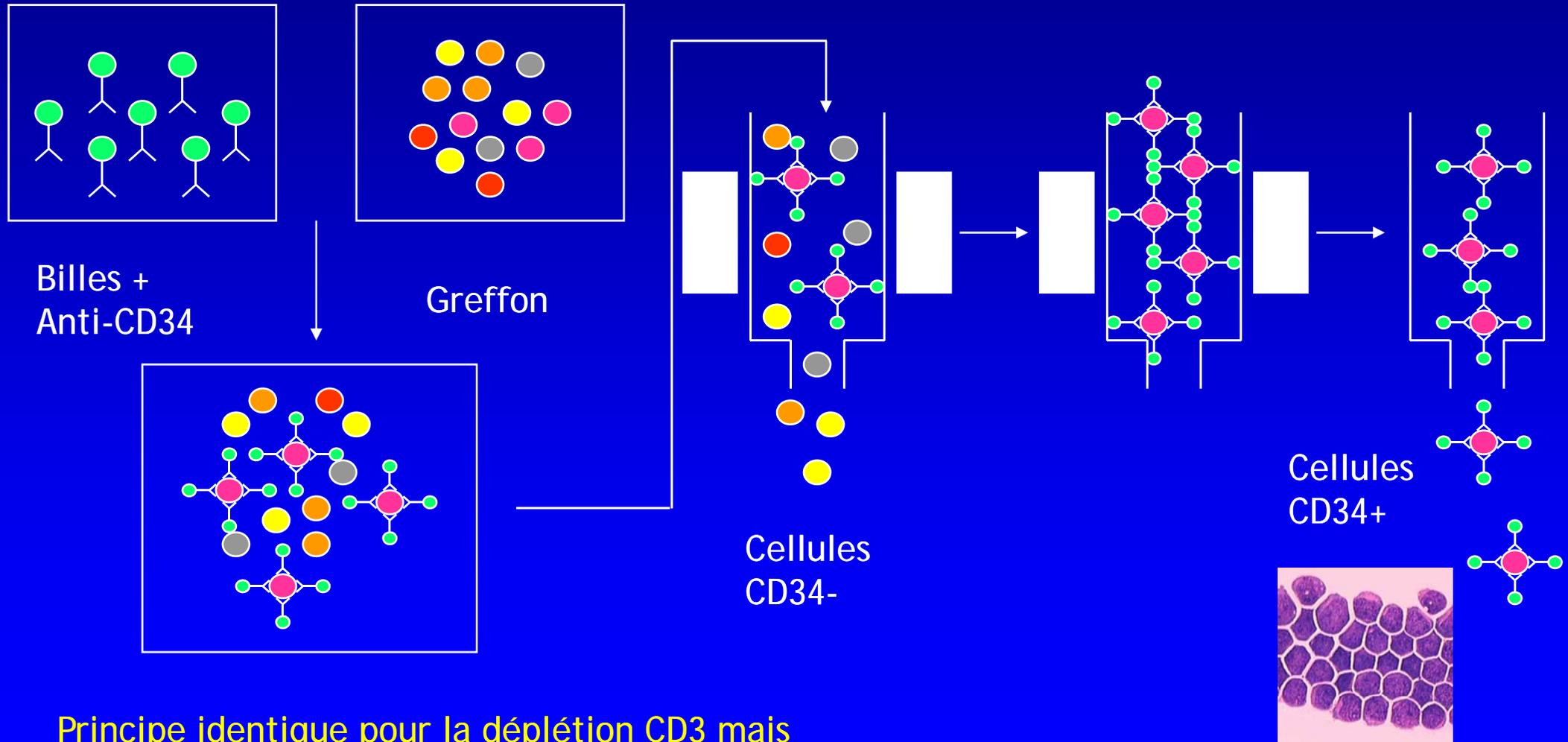
CONGELATION/DECONGELATION: ASPECTS TECHNIQUES

- **Congélation:**
 - Avec cryoprotecteur et descente en température contrôlée puis stockage en azote liquide ou vapeur
- **Décongélation**
 - Rapide au bain marie puis lavage sur Cobe 2991
 - pour élimination du DMSO



AUTRES TECHNIQUES DE PRODUCTION: IMMUNOSELECTION

Ex: sélection CD34



Principe identique pour la déplétion CD3 mais avec conservation de la fraction CD3 négative

SELECTION CD34 : TECHNIQUE CLINIMACS

Solution
d'incubation

Aimant

Poche de recueil
des cellules purifiées

Cellules à purifier

Solution
de lavage

Pompe
péristaltique

Programmateur

Poche de recueil
des cellules négatives
et des lavages



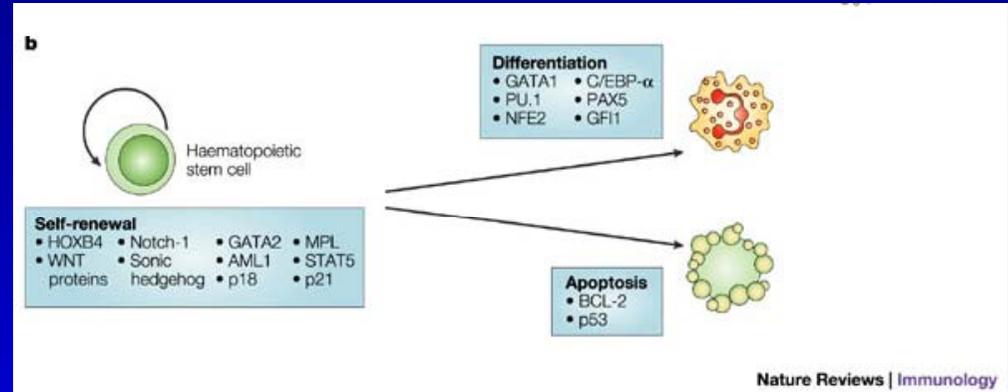
T déplétion > 3 log
Récupération CD34 souvent affectée

AUTRES TECHNIQUES DE PRODUCTION: CULTURE/EXPANSION

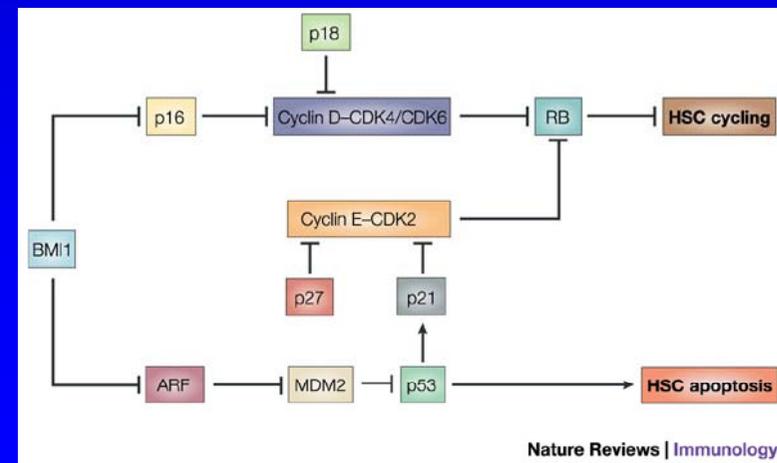
ex expansion des CSH

- Objectif: augmenter le nombre de CSH et de progéniteurs multipotents pour améliorer le taux et la vitesse de reconstitution hématopoïétique
- Culture *in vitro* des CSH en présence de cocktail de cytokines
- Particulièrement intéressant pour le sang placentaire mais dvp des greffes doubles cordons
- Problème: Engagement massif des cellules souches vers des précurseurs incapables de soutenir l'hématopoïèse à long terme

Modulation expression facteurs transcription



Régulation cycle cellulaire



Sorrentino Nature Reviews Immunology 2004

AUTRES TECHNIQUES DE PRODUCTION: TRANSFERT DE GENE

- **OBJECTIF:**
 - Correction d'un défaut fonctionnel
 - Apport d'une nouvelle fonction
- **MOYENS:**
 - Insertion génique par transduction grâce à un vecteur
 - Vecteurs rétroviraux préférables pour une insertion à long terme
- **QUELLES APPLICATIONS DANS LE DOMAINE DES CSH?**
 - Maladies génétiques constitutionnelles avec gène défectueux parfaitement identifié
 - Déficits immunitaires congénitaux
 - Hémoglobinopathies sévères

AU TOTAL

- L'hémato-oncologie est le principal domaine de la thérapie cellulaire ...
- La thérapie cellulaire doit travailler de concert avec les services d'hémato-oncologie et de greffe de moelle.
- La réglementation est stricte.
- Le transfert de la recherche aux essais cliniques se fait *via* la recherche et développement dans le respect des règles régissant la sécurité sanitaire des produits.