

L'autogreffe de Cellules Souches Hématopoïétiques

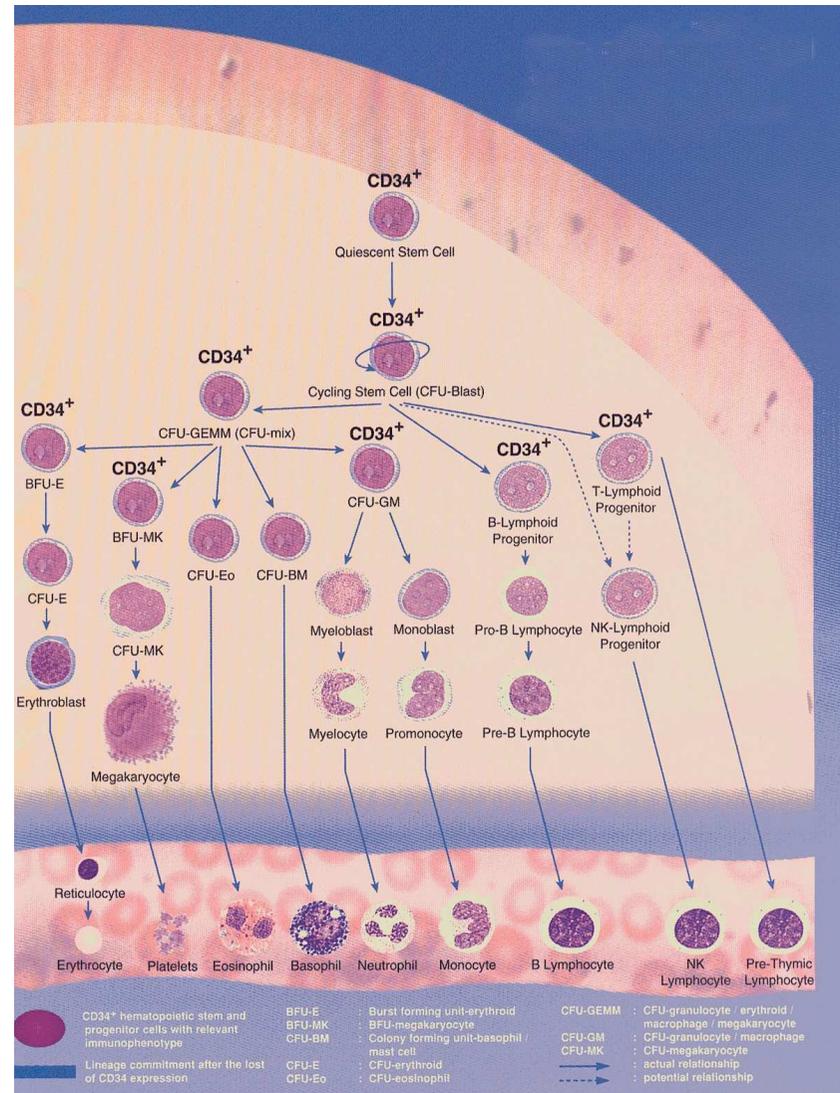
DES PH IPR – Mars 2019
Dr Loïc REPPEL, MCU-PH
UTCT – CHRU Nancy



Plan

- Hématopoïèse et Cellules Souches Hématopoïétiques
- L'autogreffe
 - Définition
 - Historique
 - Principes et objectifs
 - Indications
 - Quelques chiffres
- Réalisation pratique
 - Prélèvement CSH
 - Contrôle qualité CSH
 - Cryoconservation
 - Conditionnement du patient
 - Réinjection et reconstitution hématopoïétique

Hématopoïèse



Hématopoïèse

- Etat physiologique: Division des CSH toutes les 20 à 25 semaines soit 2 fois par an
- Etat pathologique: demande hématopoïétique accrue (infection, chimiothérapie), sortie de quiescence, division accélérée pour restaurer rapidement le compartiment des progéniteurs.
- Puis retour à la quiescence
- La quiescence
 - Partie des CSH
 - Maintien intégrité génétique et fonctionnelle
 - Résistance à la chimiothérapie

Hématopoïèse

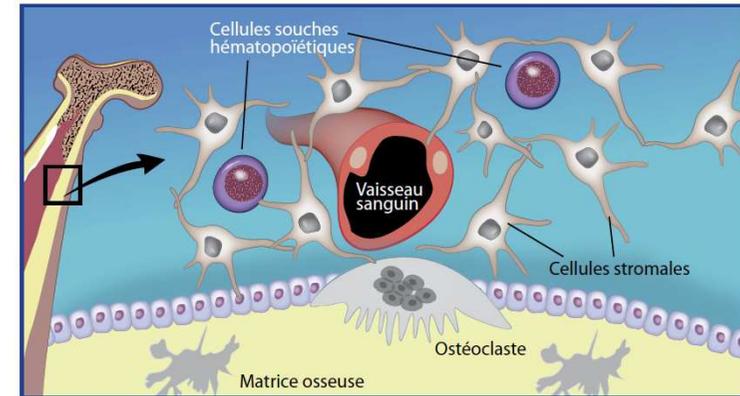
- Cellules matures fonctionnelles
 - Après maturation, migration vers sang circulant et tissus
 - Absence de potentiel prolifératif et durée de vie limitée
 - GR: 120 jours
 - Plaquettes: 7 jours
 - PNN: 24H
 - Equilibre homéostatique: production/seconde
 - 2 millions GR
 - 15 millions PLQ
 - 500000 GB
 - Augmentation possible à l'état pathologique (hémorragie/infection)

Les Cellules Souches Hématopoïétiques

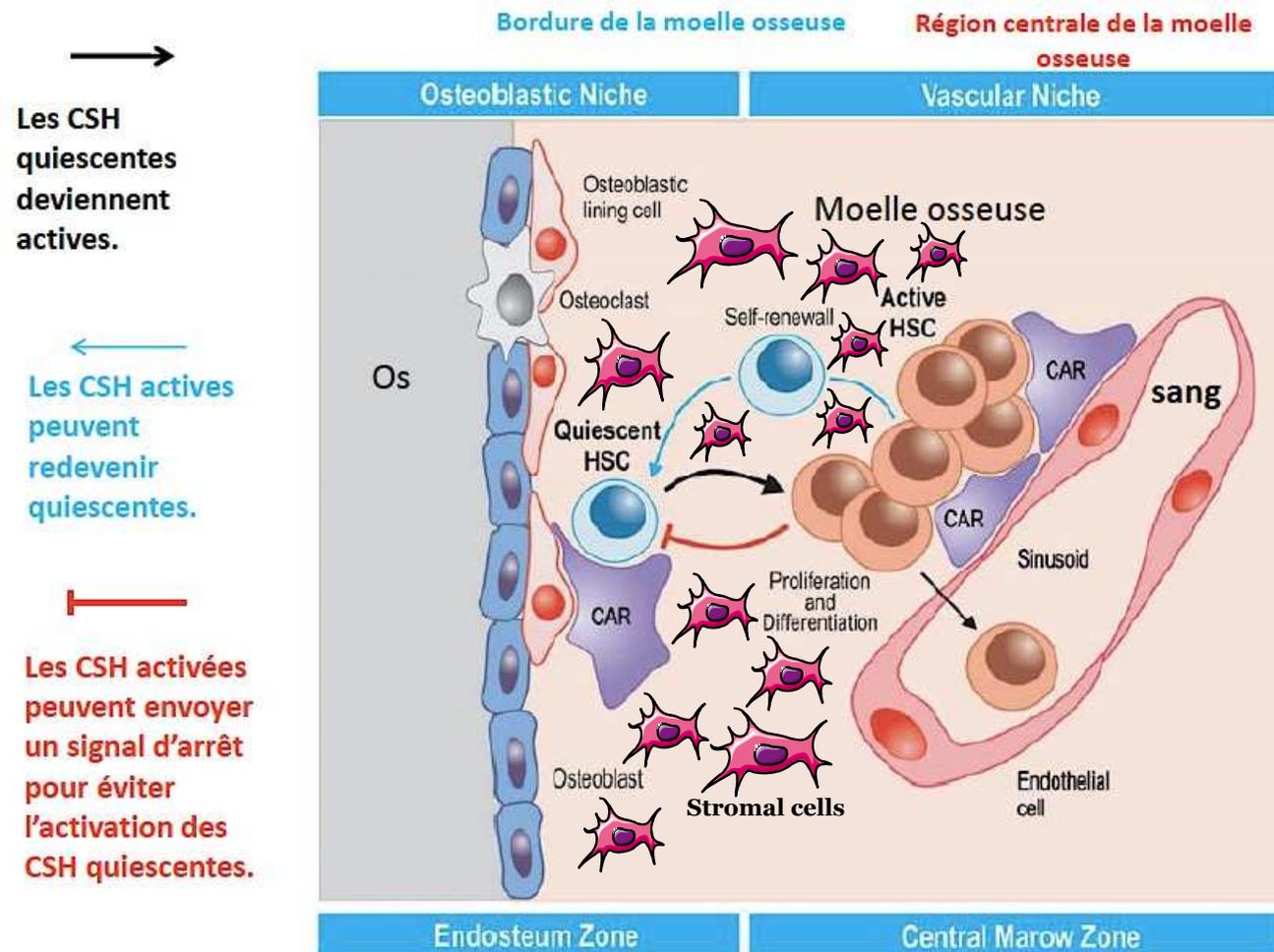
- Assure l'hématopoïèse: reconstitution lignées sanguines
- Capable d'auto-renouvellement et différenciation
- Non reconnaissable morphologiquement
- Identité phénotypique (CD34) et fonctionnelle
- Réside dans la moelle osseuse: la niche médullaire
- <0.05% dans le sang circulant

La niche médullaire

- Microenvironnement spécialisé
- Constituée de cellules « supports »
 - Niche endostéale
 - Niche vasculaire
- Expriment des facteurs membranaires ou sécrétés (diffusibles)
- Permettent la survie et le renouvellement des CSH

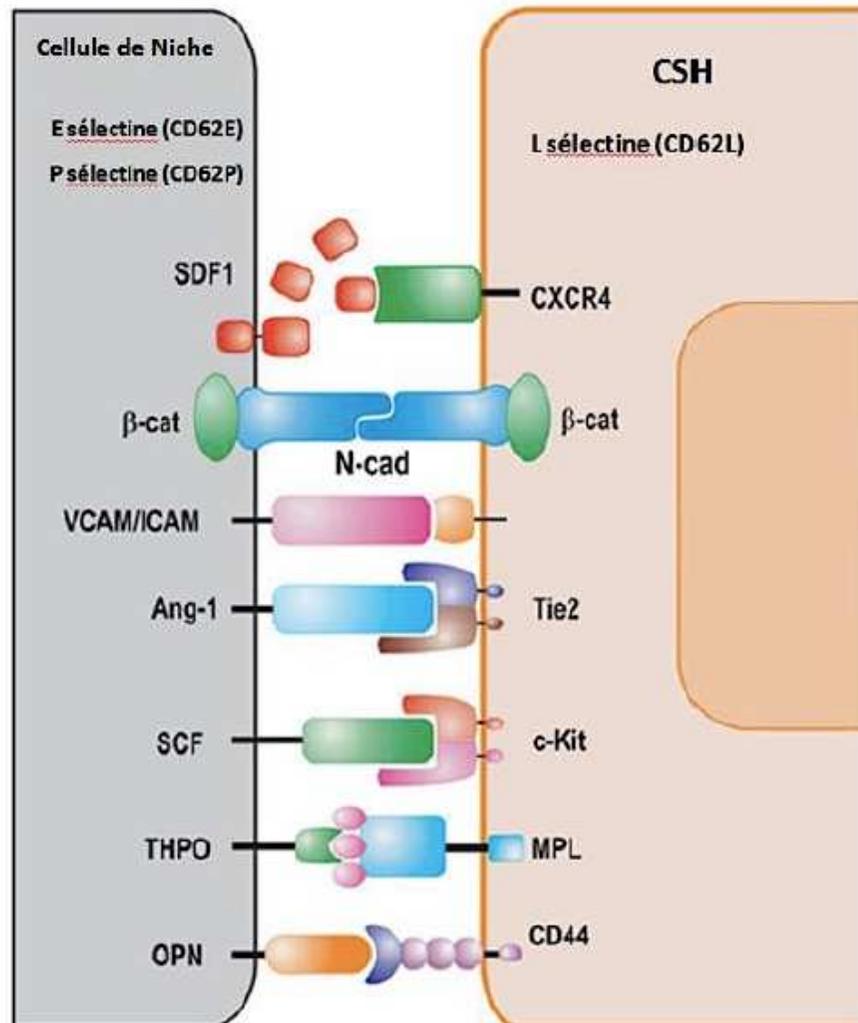


La niche médullaire



D'après Suarez-Alvarez, 2012

La niche médullaire



Environnement médullaire non cellulaire

- Molécules d'adhésion cellulaire
 - Sélectines
 - Intégrines
 - Molécules CAM
- Autres molécules
 - Cytokines et chimiokines
 - Protéases
 - Facteurs de croissance vasculaires

Plan

- Hématopoïèse et Cellules Souches Hématopoïétiques
- L'autogreffe
 - Définition
 - Historique
 - Principes et objectifs
 - Indications
 - Quelques chiffres
- Réalisation pratique
 - Prélèvement CSH
 - Contrôle qualité CSH
 - Cryoconservation
 - Conditionnement du patient
 - Réinjection et reconstitution hématopoïétique

L'autogreffe - Définition

- Procédure thérapeutique permettant d'assurer la reconstitution du tissu hématopoïétique après un traitement par radio/chimiothérapie dont la toxicité est létale sans le support de la greffe

L'autogreffe - Historique

- Début des années 1980
 - Premiers recours aux réinjections de CSH autologues (source médullaire)
- Début des années 1990
 - Evolution des modes de prélèvement des CSH (source sanguine périphérique grâce aux techniques de mobilisation)
 - Augmentation du nombre d'autogreffes depuis 1990

L'autogreffe - Principes et objectifs

- Autogreffe de CSH = conditionnement + réinjection des CSH (+ gestion des effets secondaires)
- Injection de CSH autologues à un patient atteint d'une maladie néoplasique - hématologique ou non - après chimiothérapie intensive
- But : éradication de la maladie résiduelle post chimiothérapie initiale par le conditionnement
- Intérêt réinjection CSH : pallier les effets délétères du traitement intensif sur le tissu hématopoïétique

GREFFON = SUPPORT DE TRAITEMENT

L'autogreffe - Indications

- Hémopathies malignes +++
- Tumeurs solides sans métastases médullaires
 - Neuroblastomes, cancer du sein, tumeurs germinales, etc.
- Maladies auto-immunes
 - SEP, Sclérodermie, LES, MC
 - Alternative aux traitements IS

L'autogreffe - Indications

- Hémopathies malignes
 - Myélome multiple
 - 1ère ligne
 - Objectif : prolongation de la survie
 - Lymphomes malins non hodgkiniens
 - en 1ère ligne pour les LNH de haut grade, et en rechute
 - Objectif : guérison
 - Lymphome de Hodgkin
 - en rechute
 - Objectif : guérison
 - Leucémies aiguës myéloïdes
 - si allogreffe non possible

L'autogreffe - Quelques chiffres

Figure CSH G1. Evolution du nombre de patients ayant eu une autogreffe de CSH

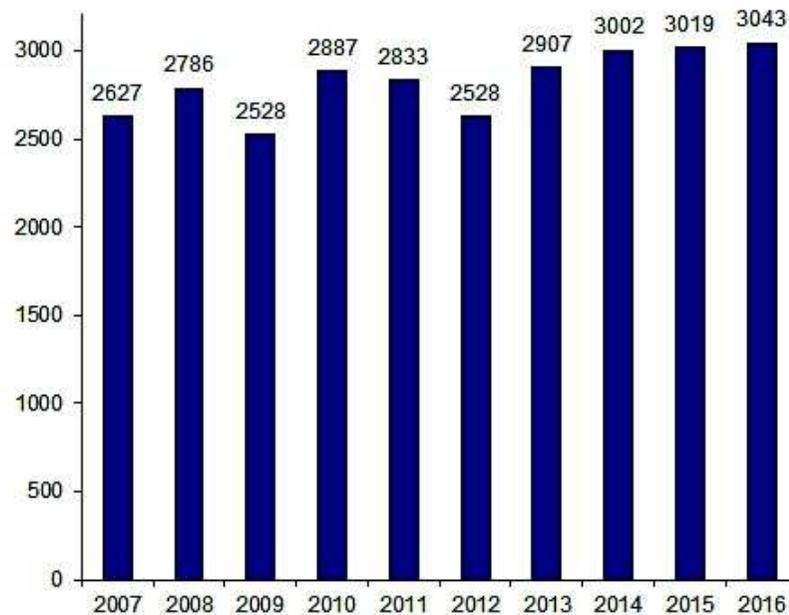
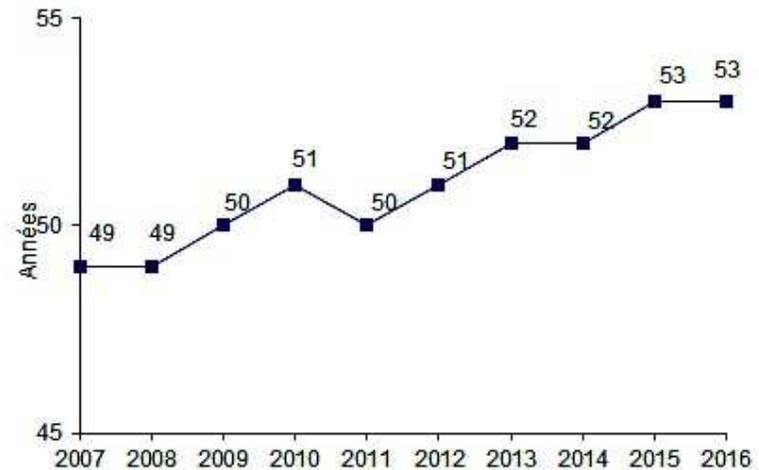


Figure CSH G2. Evolution de l'âge moyen des patients ayant eu une autogreffe de CSH



L'autogreffe - Quelques chiffres

Figure CSH G3. Evolution de la répartition des indications d'autogreffe de CSH

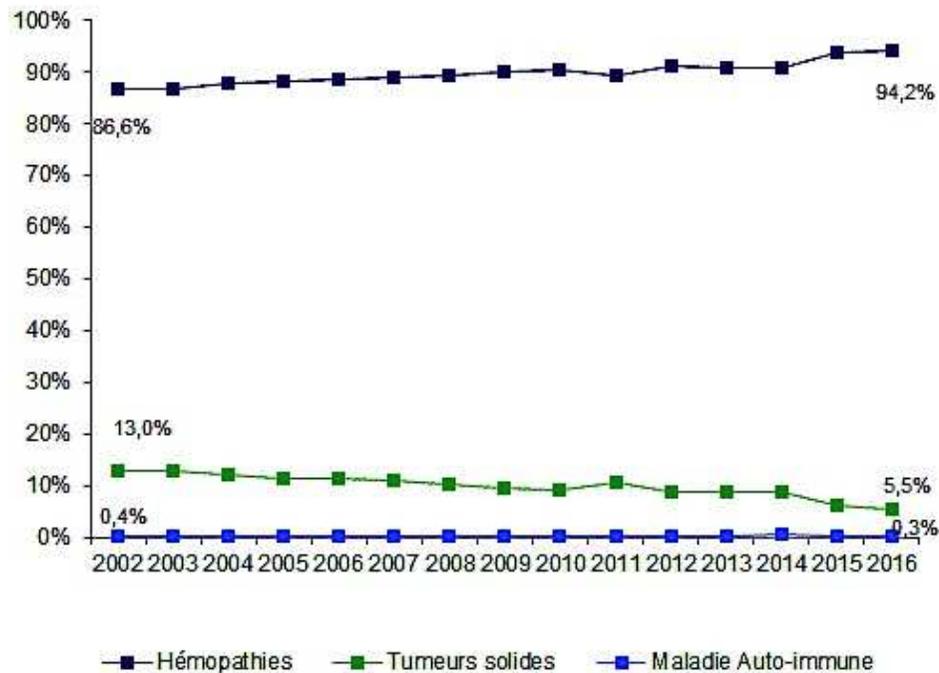


Figure CSH G4. Répartition des diagnostics chez les patients ayant eu une autogreffe de CSH en 2016 (hémapathies)*

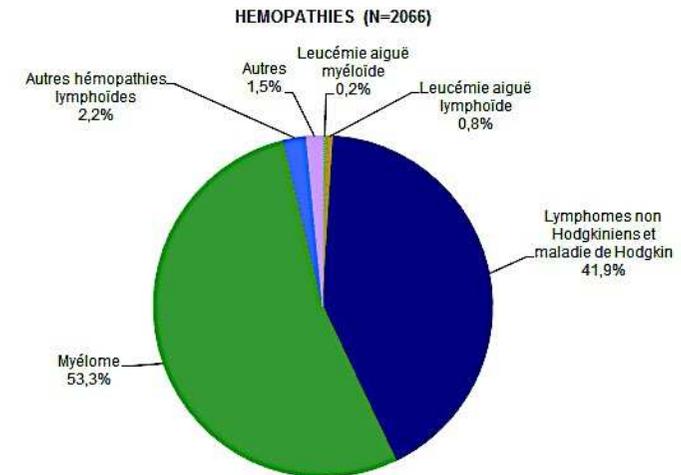
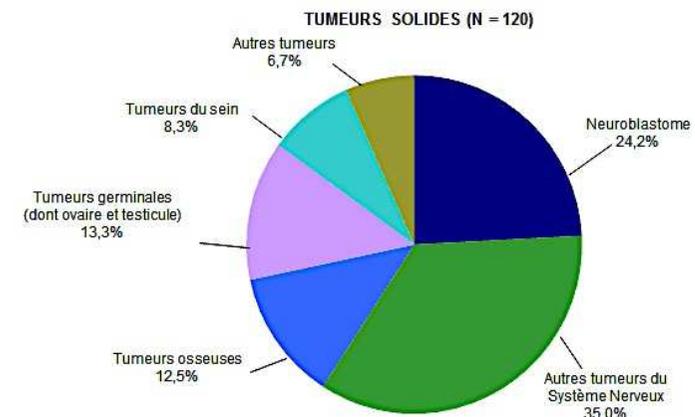


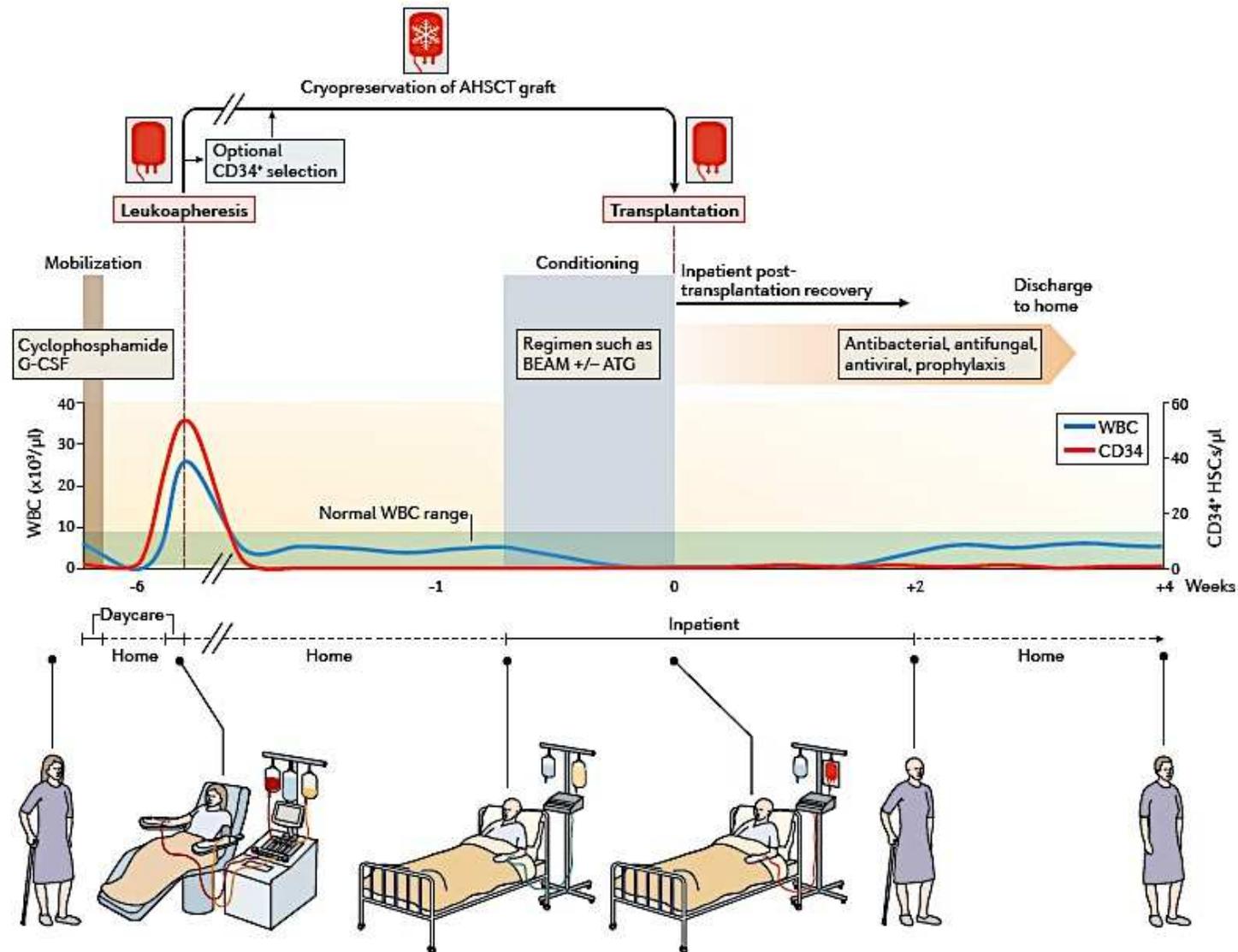
Figure CSH G5. Répartition des diagnostics chez les patients ayant eu une autogreffe de CSH en 2016 (tumeurs solides)*



Plan

- Hématopoïèse et Cellules Souches Hématopoïétiques
- L'autogreffe
 - Définition
 - Historique
 - Principes et objectifs
 - Indications
 - Quelques chiffres
- Réalisation pratique
 - Prélèvement CSH
 - Contrôle qualité CSH
 - Cryoconservation
 - Conditionnement du patient
 - Réinjection et reconstitution hématopoïétique

Stratégie globale



Prélèvement CSH

- **Recueillir des CSH multipotentes**
 - Capables d'auto-renouvellement et de multipotence
 - Reconstitution hématopoïétique tardive mais stable
 - Intéressant toutes les lignées
- **Recueillir des progéniteurs plus matures (CS engagées)**
 - Moins d'auto-renouvellement mais différenciation ++
 - Reconstitution hématopoïétique précoce mais transitoire
 - Intérêt clinique : diminuer le risque infectieux et la consommation de produits sanguins

Prélèvement CSH

SOURCES DE CSH

MOELLE OSSEUSE



CELLULES SOUCHES PERIPHERIQUES (CSP)



Prélèvement de moelle osseuse

- Technique historique
- 0,1% des greffons autologues en 2016
- Au bloc opératoire sous AG
- Au niveau des crêtes iliaques postérieures
- Ponctions multiples de 20 mL/kg chez l'enfant et 800 à 1200 mL chez l'adulte
- Filtration: élimination particules osseuses et graisseuses
- Prélèvement correct : $2 \text{ à } 3 \cdot 10^8$ cellules nucléées/kg de poids du receveur (numération en cours de prélèvement pour ajuster le volume à prélever)
- Enrichissement possible en CMN



Prélèvement de CSP

- <0.05% dans le sang circulant
- Nécessité d'une **mobilisation**

- Stratégie:
 - Facteur de croissance seul: G-CSF (Neupogen®, Granocyte®)
 - 10 µg/kg/j pendant 6 jours en sous-cutanée en 2 injections
 - Chimiothérapie + facteur de croissance : synergie d'action
 - 5 µg/kg/j, en sous-cutanée, débuté 24 h après la fin de la chimiothérapie
 - 1er recueil : J 4 puis J5 puis J6 éventuellement
 - Réalisés dans unités d'hémaphérèse thérapeutique

- En pratique
 - Surveillance sortie d'aplasie/dosage CD 34+ ($>10 \cdot 10^6/l$)

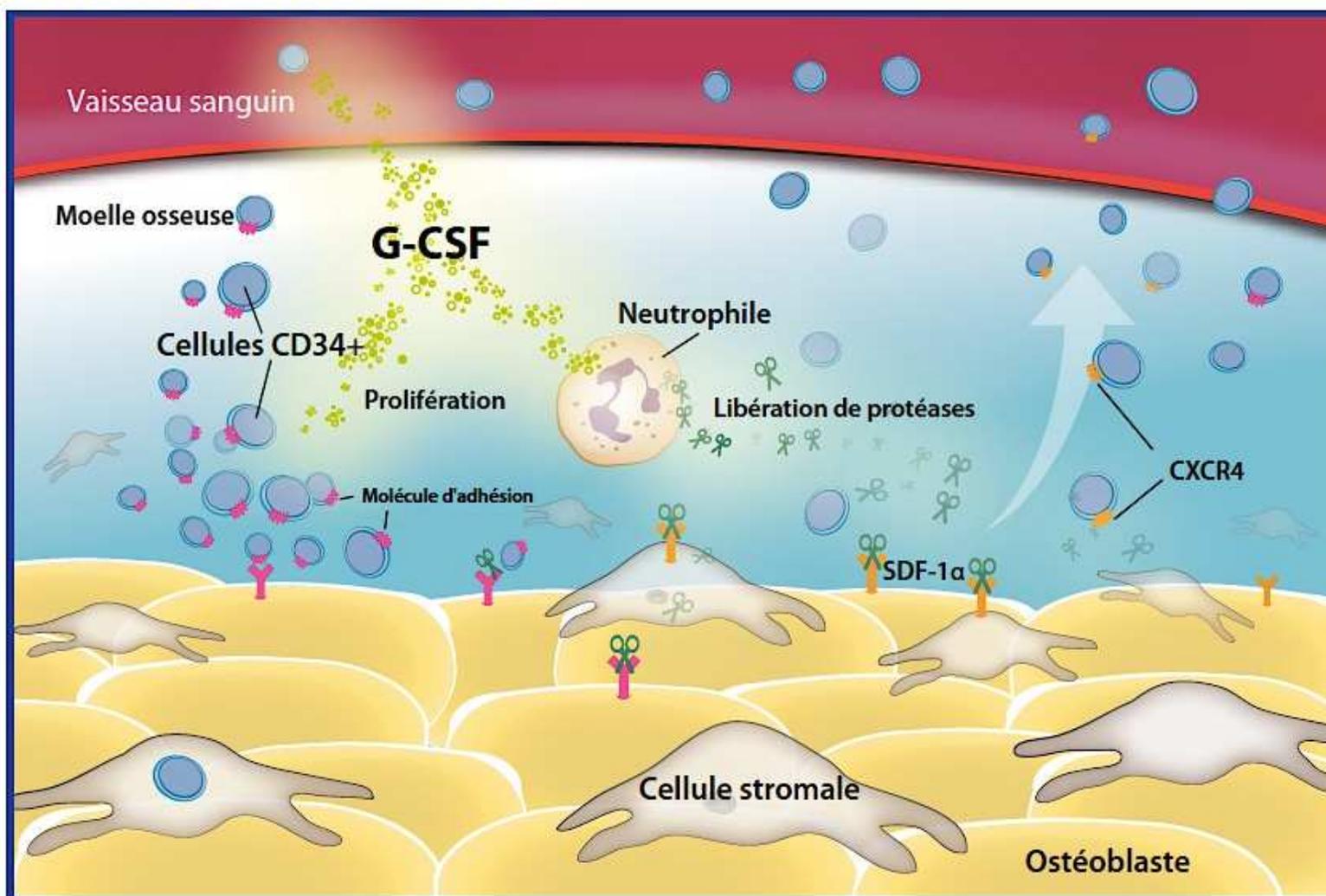
 - Prélèvement au niveau cathéter double voie
 - Passage du sang dans un kit de séparation par gradient de densité
 - Centrifugation et recueil des CMN
 - Reste de cellules réinjecté au patient
 - Traitement de 2 à 3 masses sanguines

 - Nombre moyen de recueils : 2 à 3
 - Seuil pour un greffon autologue correct : 3 à 5 $\cdot 10^6$ CD34/kg



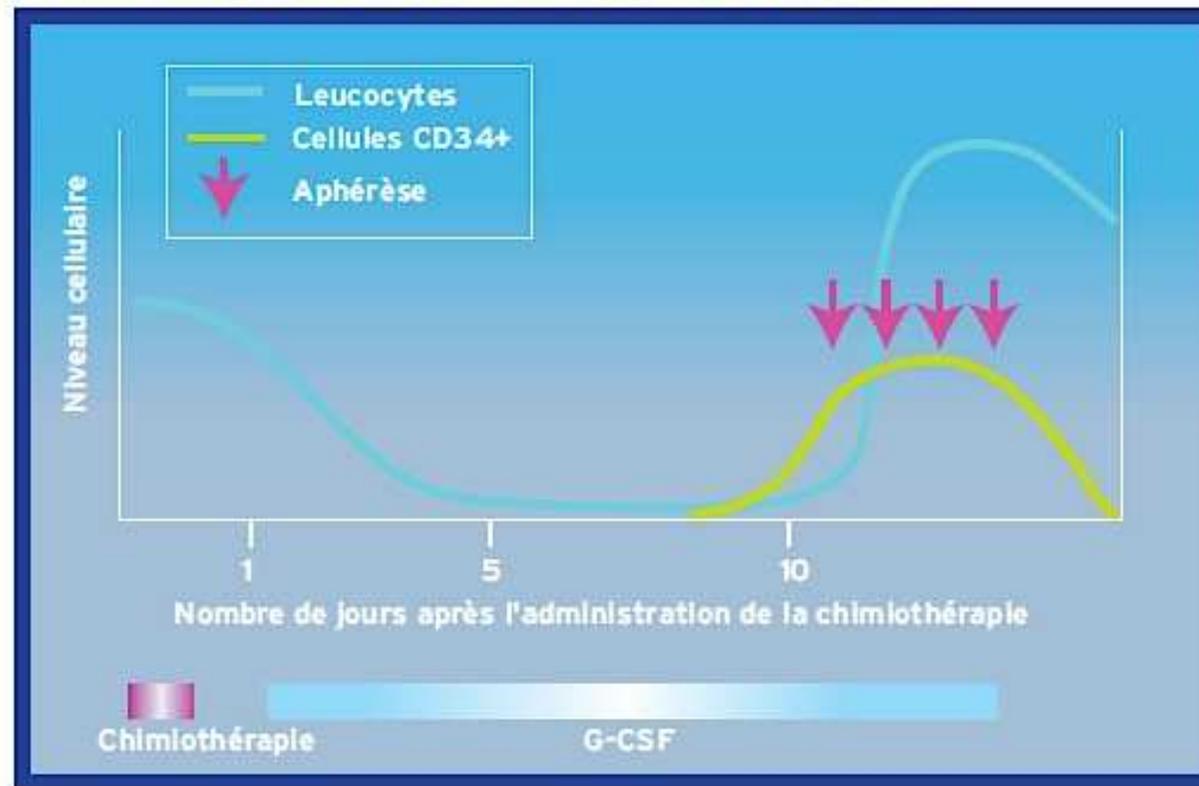
Prélèvement de CSP

Figure 6. Mécanisme d'action du G-CSF⁴³⁻⁴⁶



Prélèvement de CSP

Figure 7. Cinétique généralisée du leucocyte et de la cellule CD34+ Mobilisation dans le sang périphérique après une chimiothérapie et l'administration de cytokines

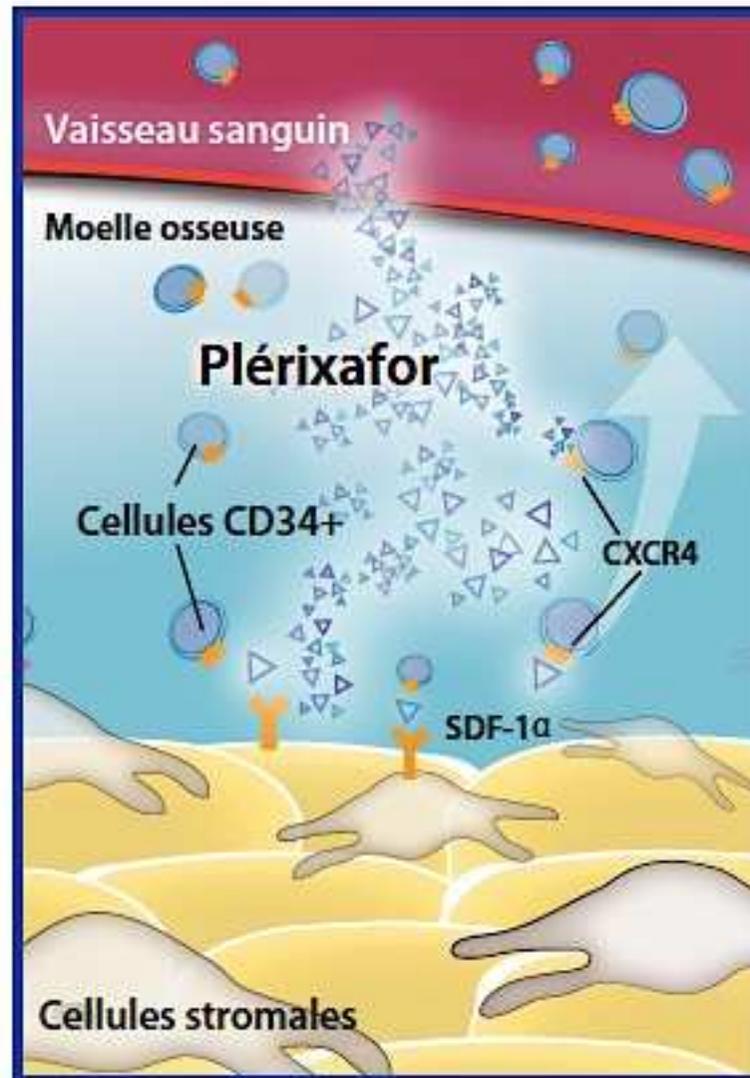


Prélèvement de CSP

- **En cas d'échec de mobilisation**
- Risques de mauvaise réponse à la mobilisation
 - Importance cumulée des traitements antérieurs
 - Utilisation de certaines chimiothérapies (fludarabine...)
 - Pathologies (leucémies aiguës) et envahissement médullaire
 - Age du patient (> 50 ans)
- En cas d'échec ou de greffon insuffisant
 - Nouvel essai à la cure suivante
 - Antagoniste de CXCR4 (Plérixafor Mozobil®) associé au G-CSF
 - Prélèvement de MO

Prélèvement de CSP

Figure 8. Mécanisme d'action du plérixafort³⁷⁻⁴¹



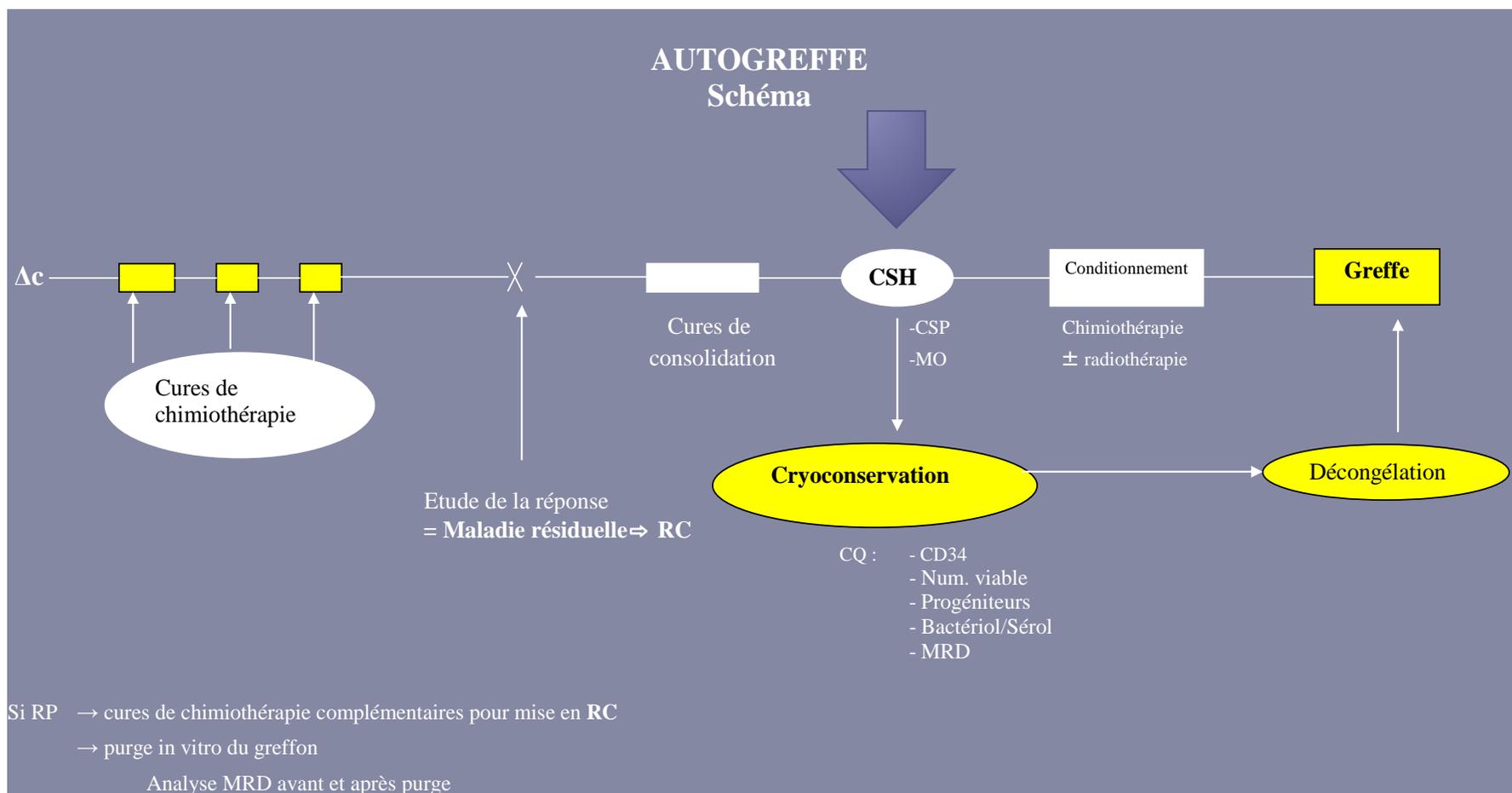
Prélèvement de CSH

| Méthode de collecte | Avantages | Inconvénients |
|---------------------|---|---|
| Moelle osseuse | <ul style="list-style-type: none"> • Collecte unique • Mise en place spéciale de cathéter non requise • Utilisation des cytokines non requise | <ul style="list-style-type: none"> • Pratiqué dans un établissement ayant une structure de soins intensifs en raison de l'anesthésie générale • Prise de greffe de neutrophiles et de plaquettes plus lente • Taux de morbidité et de mortalité plus élevés • Contamination du produit par les cellules tumorales potentiellement plus élevée |
| Sang périphérique | <ul style="list-style-type: none"> • Anesthésie générale non requise et possibilité d'être effectuée en consultation externe • Prise de greffe de neutrophiles et de plaquettes plus rapide • Associé à des taux de morbidité et de mortalité inférieurs • Contamination du produit par les cellules tumorales potentiellement moins élevée | <ul style="list-style-type: none"> • La collecte peut durer plusieurs jours • Nécessite parfois la mise en place de cathéter à gros calibre et à double lumière pour la collecte • Les hémorragies, les embolies et les infections sont des complications possibles liées à l'insertion du cathéter veineux central |

Quand prélever les CSP?

- Si absence d'envahissement tumoral médullaire
 - prélèvement des CSH avant toute chimiothérapie
 - = greffon le plus riche possible
- Si envahissement tumoral médullaire
 - Contre-indication formelle de prélever des CSH en phase blastique
- Schéma de prélèvement
 - Mise en Rémission Complète (RC)
 - Cures de consolidation de chimiothérapie = Purge in vivo
 - Evaluation de la Maladie résiduelle
 - = cellules tumorales médullaires (limite de l'AG / ttt *ex vivo*)

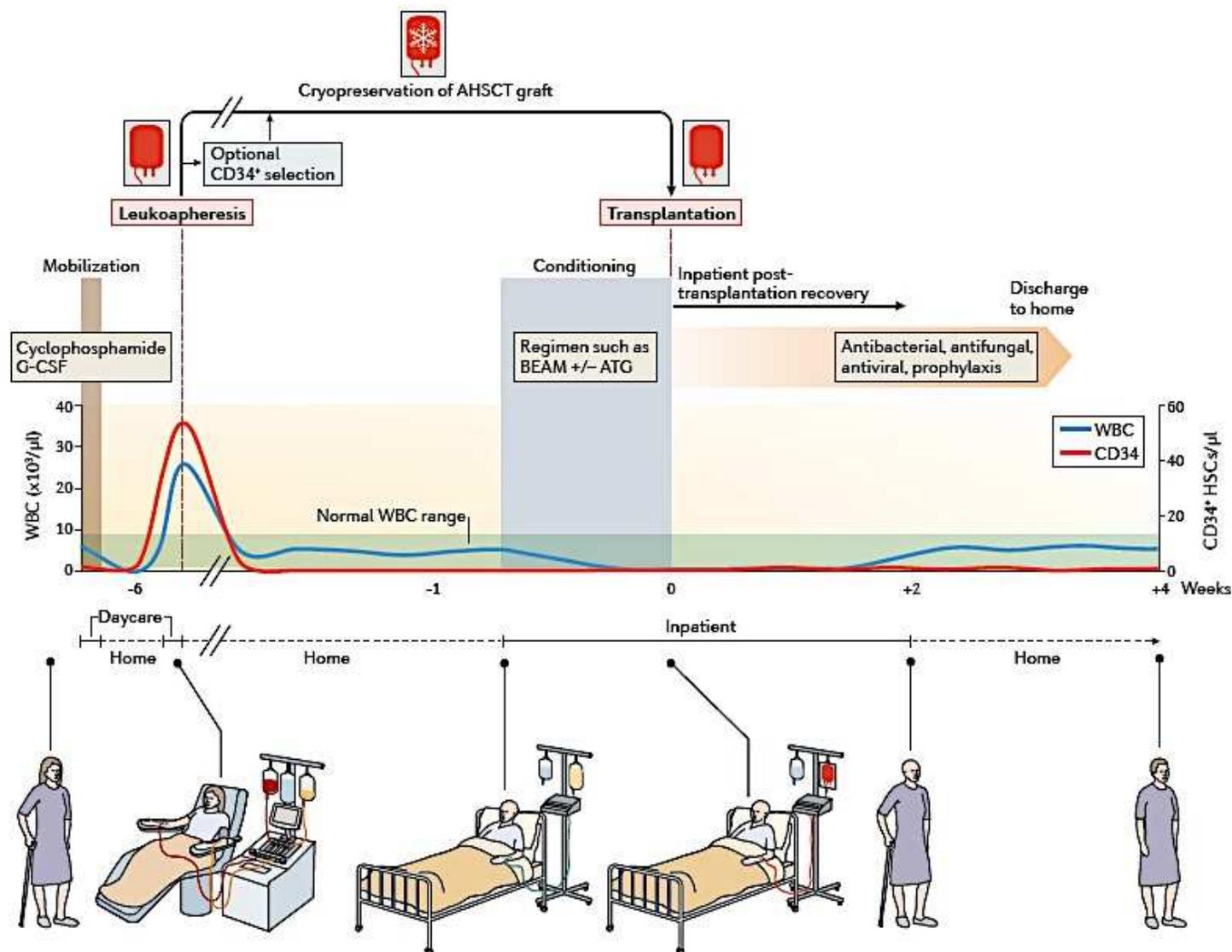
Quand prélever les CSP?



Plan

- Hématopoïèse et Cellules Souches Hématopoïétiques
- L'autogreffe
 - Définition
 - Historique
 - Principes et objectifs
 - Indications
 - Quelques chiffres
- Réalisation pratique
 - Prélèvement CSH
 - **Contrôle qualité CSH**
 - Cryoconservation
 - Conditionnement du patient
 - Réinjection et reconstitution hématopoïétique

Stratégie globale



Les CQ réalisés sur les greffons hématopoïétiques

Sécurité

- Marqueurs infectieux
(*Donneurs/Receveurs*)
- Contrôle
microbiologique

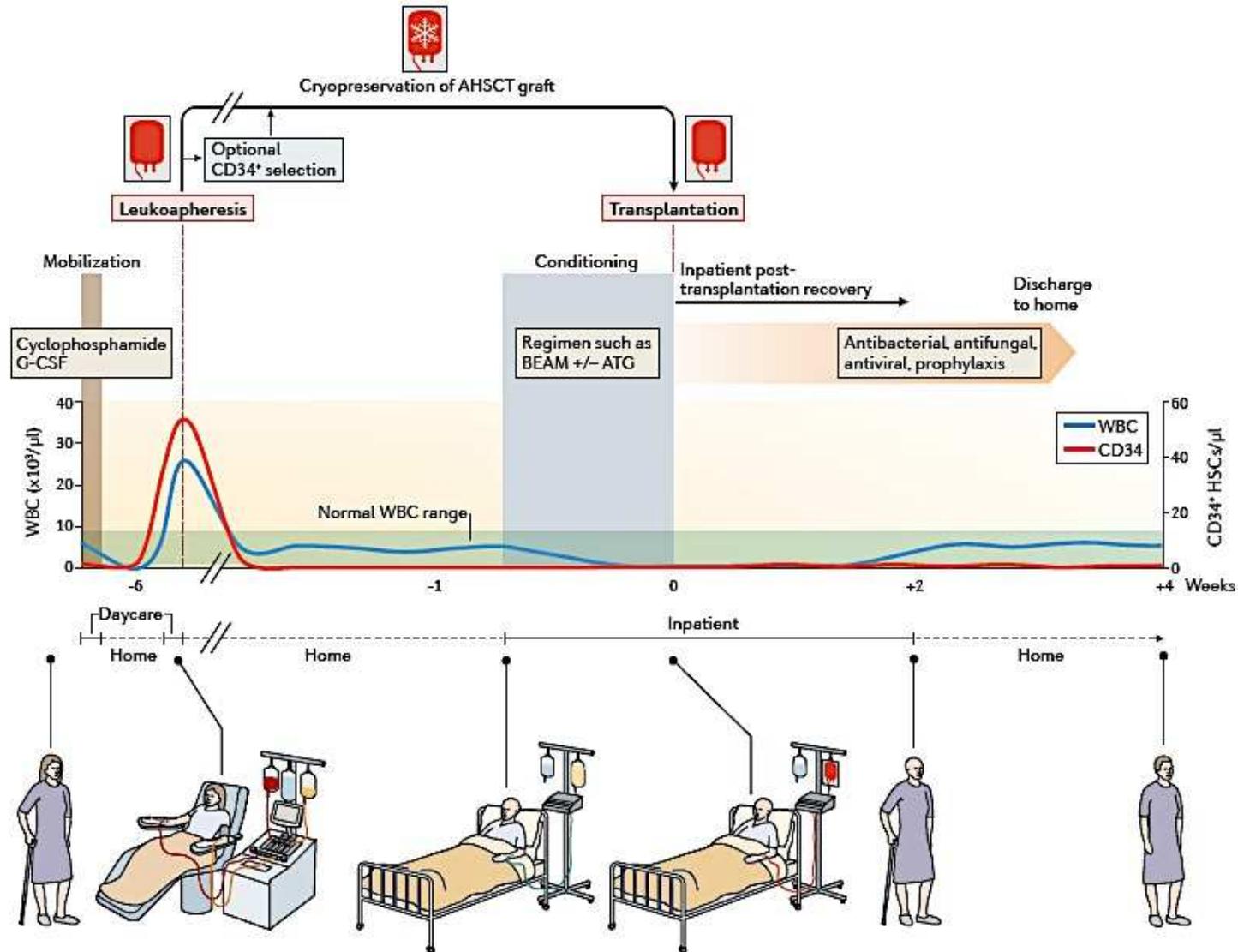
Efficacité

- Numérations cellulaires:
 - Cellules Nucléées
Totales (CNT)
 - Cellules CD34/CD45+
- Titrage des
progéniteurs
hématopoïétiques

Plan

- Hématopoïèse et Cellules Souches Hématopoïétiques
- L'autogreffe
 - Définition
 - Historique
 - Principes et objectifs
 - Indications
 - Quelques chiffres
- Réalisation pratique
 - Prélèvement CSH
 - Contrôle qualité CSH
 - **Cryoconservation**
 - Conditionnement du patient
 - Réinjection et reconstitution hématopoïétique
 - Gestion des complications

Stratégie globale



Cryoconservation des CSH



- Intérêt de la cryoconservation
 - Permet de dissocier le prélèvement des cellules, de leur utilisation
- Réalisée au sein de l'UTC
- Conservation pendant une courte durée (24 h)
 - Réfrigérateur : pour des CSP en attente de congélation (afin de limiter les risques de prolifération bactérienne)
 - Température ambiante (15 à 25°C) : pour des CSH fraîches (MO) que l'on doit transporter (allogreffe)
- Conservation pendant une durée indéterminée
 - Cryoconservation en azote liquide à -196°C dans des cryopoches ou en vapeur d'azote à -150°C.
- Le froid est un très bon agent conservateur à condition de savoir prévenir les lésions qu'il inflige aux cellules

Cryoconservation des CSH

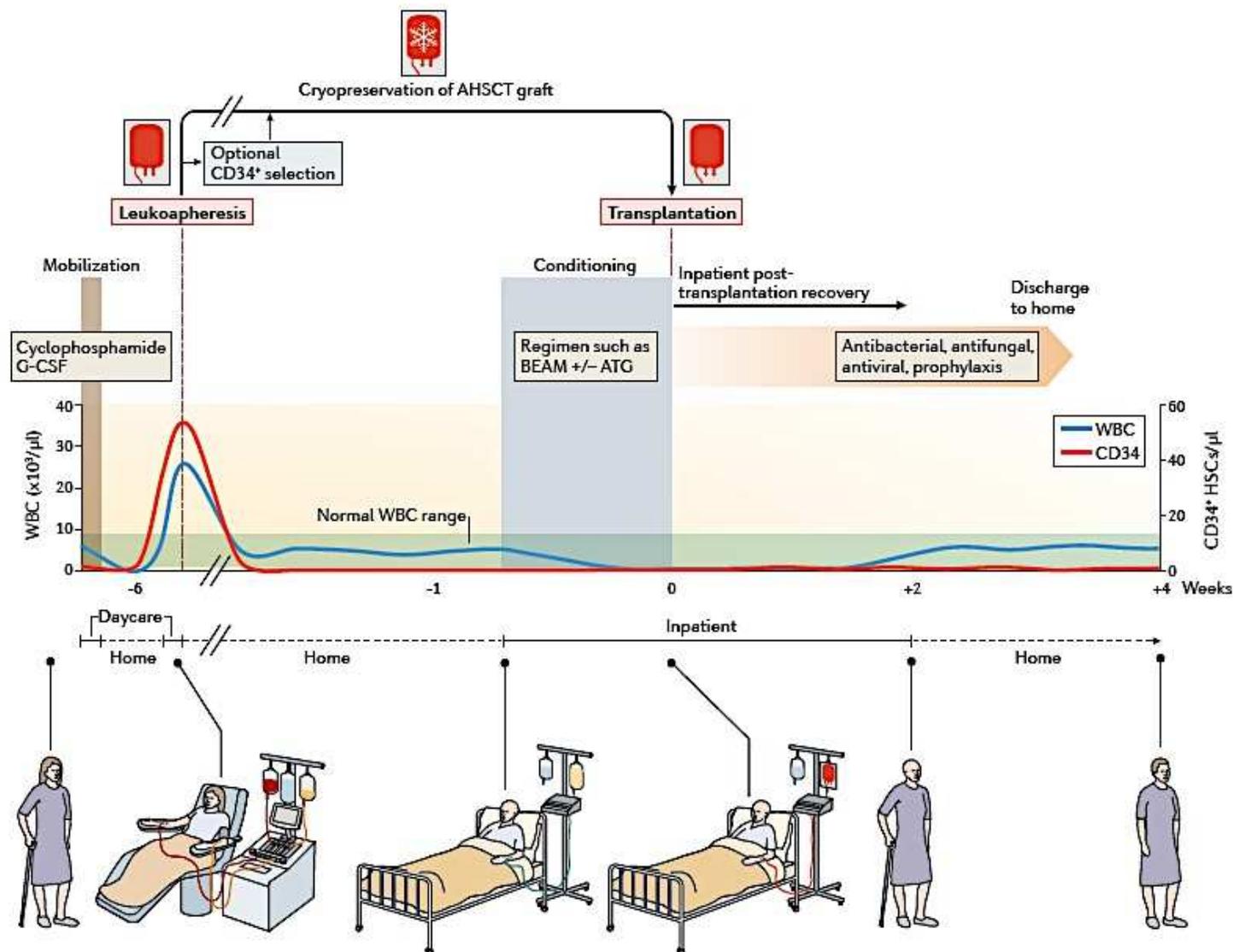


- Importance d'une congélation progressive et programmée
 - $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$
- Utilisation d'un cryoprotecteur
 - **DMSO 10%**
 - Glycérol
 - Sucrose
- DMSO
 - Toxicité à température ambiante : travail à 4°C
 - Congélation en présence d'une macromolécule afin de diminuer l'eau libre des cellules : diminue la formation de cristaux
 - Concentration cellulaire à respecter
 - Introduction de la solution cryoprotectrice de façon progressive
- Appareil de congélation
 - Appareil programmable de descente en température
 - Programme de congélation fonction du type cellulaire
 - Sonde dans poche témoin
 - Sonde dans l'appareil (chambre de congélation)

Plan

- Hématopoïèse et Cellules Souches Hématopoïétiques
- L'autogreffe
 - Définition
 - Historique
 - Principes et objectifs
 - Indications
 - Quelques chiffres
- Réalisation pratique
 - Prélèvement CSH
 - Contrôle qualité CSH
 - Cryoconservation
 - **Conditionnement du patient**
 - Réinjection et reconstitution hématopoïétique

Stratégie globale



Conditionnement du patient

- Hospitalisation en secteur protégé
 - Chambres à air filtré
 - SAS – port de blouses et gants
- Prévention de la contamination microbienne endogène
 - Bains de bouche
 - Décontamination digestive
 - Prévention des infections herpétiques par l'utilisation d'Aciclovir
- Perfusion sur cathéter veineux central tunnelisé
- En cas de risque de maladie veino-occlusive
 - Utilisation de Busulfan dans le conditionnement
 - Prévention par héparinothérapie à dose préventive

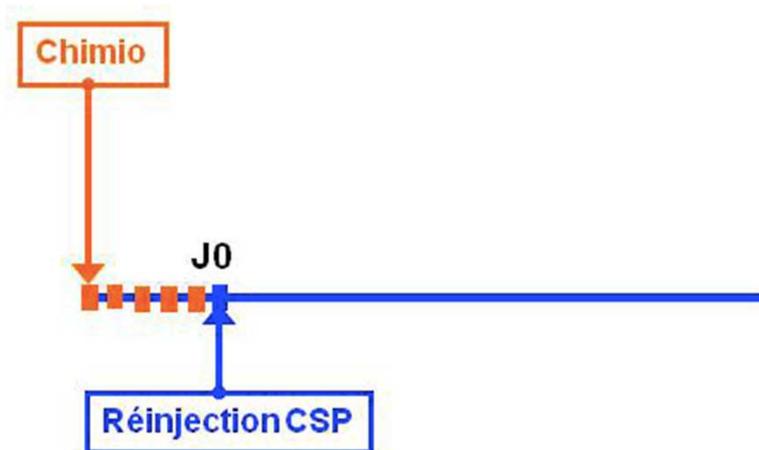


Conditionnement du patient

- Traitement proprement dit
 - = intensification thérapeutique / chimiothérapie intensive
- Variable selon la pathologie
- Comporte toujours une ou plusieurs molécules de chimiothérapie +/- une irradiation corporelle totale ICT (TBI) de 2 à 12 Gy

Déroulement du conditionnement

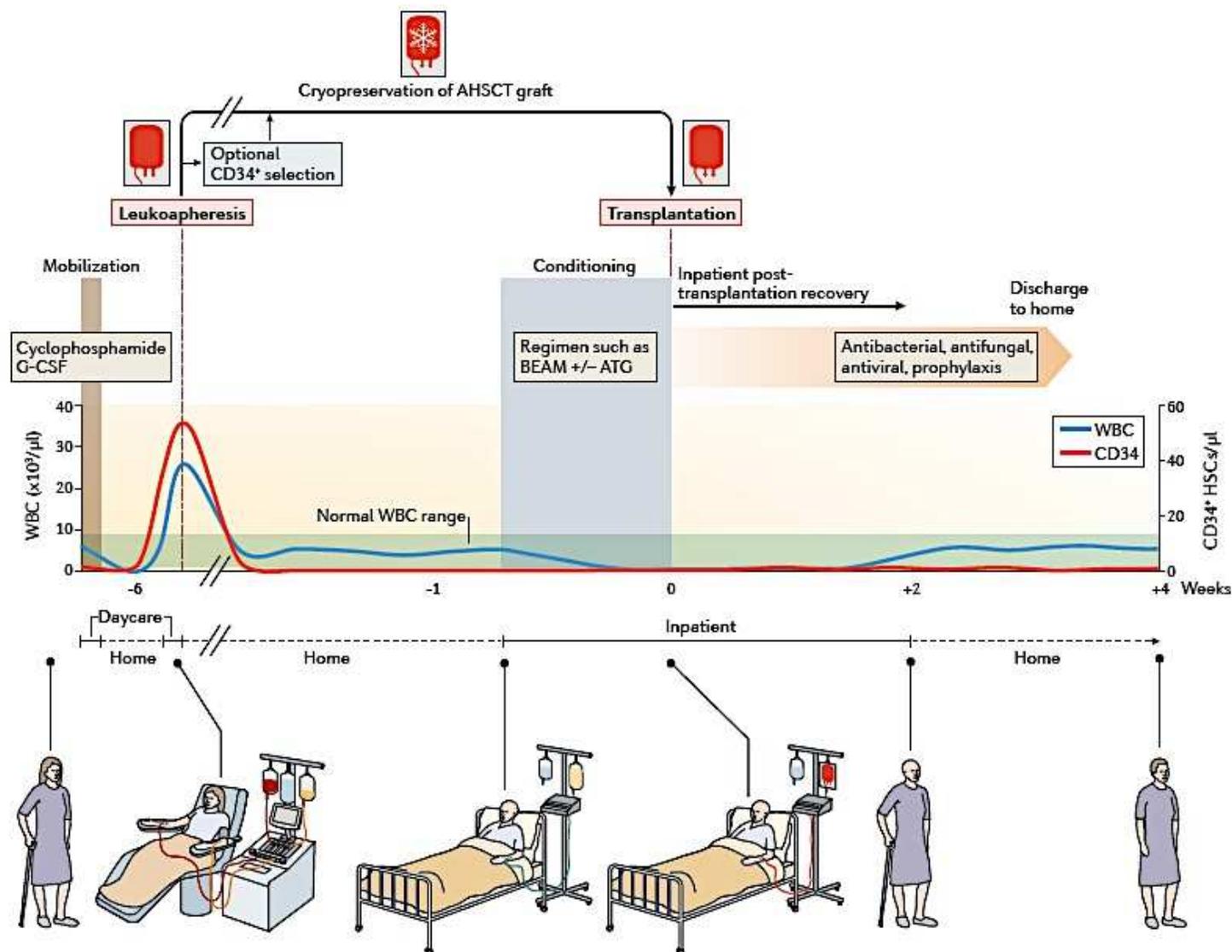
- Conditionnement de durée variable : début à J-8, J-5 ou J-2
- Autogreffe à J0 : réinjection en 30 à 45 min



Plan

- Hématopoïèse et Cellules Souches Hématopoïétiques
- L'autogreffe
 - Définition
 - Historique
 - Principes et objectifs
 - Indications
 - Quelques chiffres
- Réalisation pratique
 - Prélèvement CSH
 - Contrôle qualité CSH
 - Cryoconservation
 - Conditionnement du patient
 - **Réinjection et reconstitution hématopoïétique**

Stratégie globale



Décongélation CSH

- A l'Unité de thérapie cellulaire
- Après confirmation du service clinique

- Décongélation rapide à 37°C
- Lavage en albumine 4% + NaCl + ACD
 - Élimination d'un maximum de DMSO

- Contrôles qualité
 - Microbiologiques
 - Numération: CNT, CD34 + Viabilité
 - Rendement
 - CFU-GM

Réinjection et RH

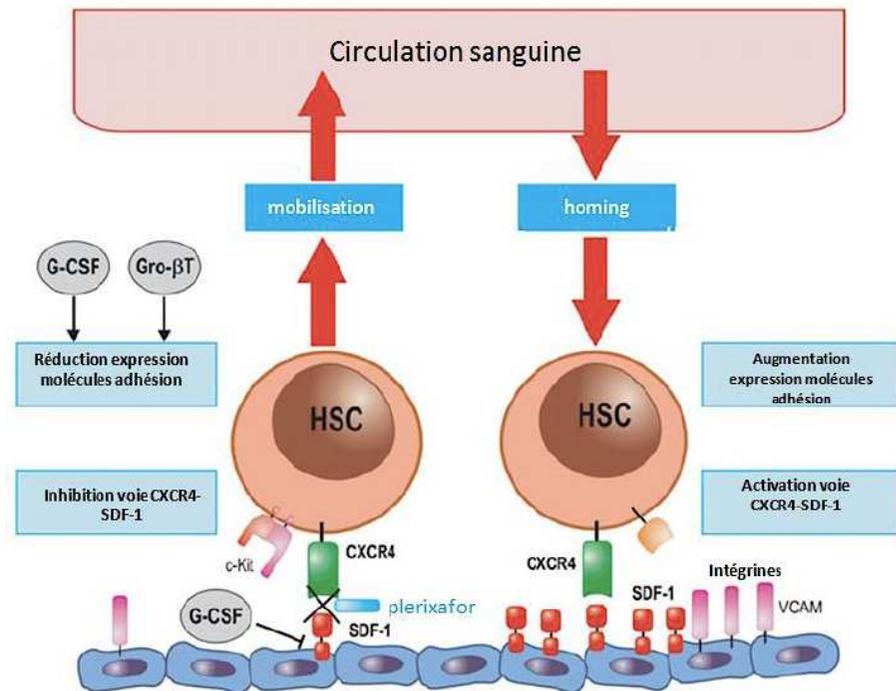
- Pré-médication
 - Anti-histaminique, anti-pyrétique
- Ligne IV équipée
- Surveillance ++

Tableau 9. Complications associées à l'injection de cellules souches autologues^{1,2,16,82}

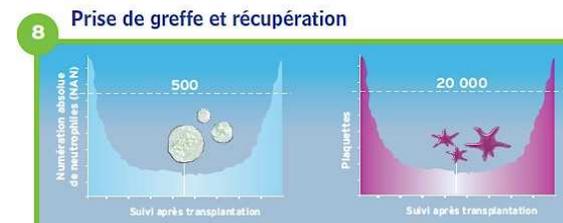
| Effet indésirable | Signes et symptômes | Action corrective |
|--|--|-----------------------------------|
| Réaction contre le DMSO | <p><u>Fréquents</u> : nausées, vomissements, crampes abdominales, céphalée, arrière-goût d'ail</p> <p><u>Rares</u> : Hypotension, tachycardie, essoufflements, fièvre, complications neurologiques</p> | Traitement des symptômes |
| Oedème | Rétention hydrique, gonflement, prise de poids, hypertension artérielle | Diurétiques, restriction hydrique |
| Contamination du produit de cellules souches | Hypotension, tachycardie, essoufflements, fièvre, frissons, rigidités, hémoculture positive pour les pathogènes microbiens | Antibiotiques, soins intensifs |

Réinjection et RH

- Réinjection IV
- Recolonisation de la MO
- Phénomène de Homing
 - Rolling sur endothélium médullaire (sélectines)
 - Adhérence (intégrines)
 - Attraction par gradient de SDF-1 produit par le stroma
 - Transmigration vers le stroma médullaire



Réinjection et RH

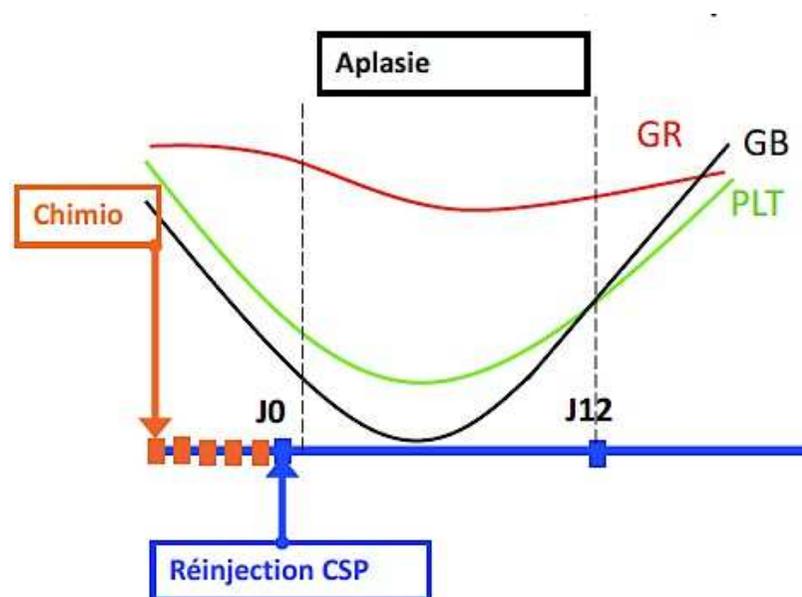
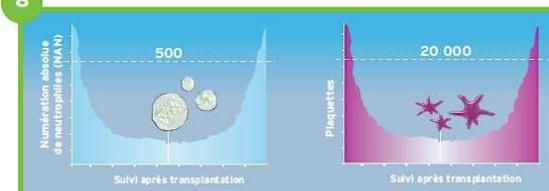


- Importance de la quantité de cellules CD34+ sur la vitesse de reconstitution de l'hématopoïèse
 - **Spécification:** $\geq 2 \cdot 10^6$ CD34+/kg
- Seuils variables en fonction de la pathologie, de l'envahissement médullaire initial et de la lignée concernée
- Récupération des PN neutrophiles ($> 500/\text{mm}^3$)
- Récupération des Plaquettes ($> 20\ 000/\text{mm}^3$)
- Pas de valeur prédictive de la quantité de CFU-GM sur la reconstitution hématopoïétique

Réinjection et RH

- Reconstitution hématopoïétique
 - PNN $> 500/\text{mm}^3$
 - Plaquettes $> 20\ 000/\text{mm}^3$
- 12 à 13 jours en moyenne

8 Prise de greffe et récupération



Utilisation du G-CSF

- Toujours employé en post-autogreffe afin de réduire la durée d'aplasie
 - Délai optimal de début du G-CSF ?
 - Intérêt du Pegfilgrastim ?
 - Pas d'effet sur la mortalité liée aux infections
- A débiter dès Jo ?
 - Restauration PNN > 500/mm³ plus rapide (+1j, $p < 0.001$)
 - Mais absence d'impact sur les soins de support, le temps d'hospitalisation ...
 - En pratique début à J+2 ou J+5

Echec de prise de greffe

- Rare après autogreffe
- Mais conséquences majeures avec neutropénie prolongée et risque important d'infections fongiques
- Allogreffe de secours (conditionnement atténué)