



Modalités de préparation, cryopréservation, décongélation des cellules souches hématopoïétiques et précautions pour infusion au patient : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC)

Florence Boulanger¹, Véronique Decot², Geneviève Bulliard³, Boris Calmels⁴, Christine Giraud⁵, Marie-Noëlle Lacassagne⁶, Alessandra Magnani⁷, Fabienne Pouthier⁸, Jean-Baptiste Thibert⁹, Yordanka Tirefort¹⁰, Ibrahim Yakoub-Agha¹¹, Etienne Baudoux¹²

Reçu le 17 août 2016
Accepté le 1^{er} septembre 2016
Disponible sur internet le :
31 octobre 2016

1. EFS Nord de France, UTC, 96, rue de Jemmapes, CS 22018, 59013 Lille cedex, France
2. CHU Nancy, hôpitaux de Brabois, UTC BDT BSP, allée du Morvan, 54500 Vandoeuvre-Lès-Nancy, France
3. Grand hôpital de Charleroi (GHdC), laboratoire hématologie, 3, Grand'ruie, 6000 Charleroi, Belgique
4. Institut Paoli-Calmettes, centre de thérapie cellulaire, 232, boulevard Ste-Marguerite, BP 156, 13273 Marseille cedex 9, France
5. CHU-EFS Poitiers, banque de sang placentaire, 350, avenue Jacques-Cœur, 86012 Poitiers cedex, France
6. CHU Amiens Picardie, laboratoire de thérapie cellulaire, 80054 Amiens cedex 1, France
7. Hôpital Necker-enfants malades, hématologie, 149, rue de Sèvres, 75015 Paris, France
8. EFS Bourgogne-Franche-Comte, ICT, BP 1937, 25020 Besançon cedex, France
9. EFS Bretagne, TC et BSP, BP 91614, 35016 Rennes cedex, France
10. Hôpitaux universitaires de Genève, hématologie, 4, rue Gabriel-Perret-Gentil, 1205 Genève, Suisse
11. CHU de Lille, université Lille 2, LIRIC Inserm U995, 59000 Lille, France
12. CHU Sart-Tilman, hématologie clinique, bâtiment B35, 4000 Liège, Belgique

Correspondance :

Etienne Baudoux, CHU Sart-Tilman, hématologie clinique, laboratoire de thérapie cellulaire, bâtiment B35, 4000 Liège, Belgique.
e.baudoux@chu.ulg.ac.be

Mots clés

Cellules souches
hématopoïétiques
Cryopréservation
Décongélation

■ Résumé

Introduction > À ce jour malgré l'existence d'un cadre réglementaire et de référentiels, il n'y a pas de véritables recommandations concernant la prise en charge au laboratoire des produits de thérapie cellulaire.

Méthode > Une enquête auprès de 23 laboratoires de thérapie cellulaire (France, Belgique et Suisse) a permis de répertorier les pratiques actuelles pour les spécifications des produits

cellulaires arrivant au laboratoire, de leurs modalités de préparation pour la cryopréservation, le stockage, la décongélation et enfin la réinjection au patient.

Résultats > L'analyse des données montre une grande variabilité des volumes collectés et des concentrations des produits cellulaires. Malgré des pratiques relativement homogènes de prise en charge des cellules au laboratoire, les techniques varient d'un centre à l'autre surtout pour les solutions cryoprotectrices et la décongélation. Au cours de l'atelier ces pratiques ont été discutées, vérifiées avant élaboration et rédaction de recommandations sur les points suivants : préparation et cryopréservation, décongélation, précautions (à la réinjection) au lit du patient.

Conclusion > Ce travail permet d'identifier des axes d'amélioration en termes de collecte, de choix de solution de lavage des cellules décongelées et de validation des conditions de transport.

Keywords

Hematopoietic stem cells
Cryopreservation
Thawing

■ Summary

Modalities for preparation, cryopreservation, thawing of hematopoietic stem cells and precautions for infusion to patient: Guidelines from the Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy (SFGM-TC)

To date, despite an existing regulatory framework and standards, there are no true technical recommendations. A survey of 23 cell processing facilities (France, Belgium and Switzerland) has allowed to overview current practices according to cellular products specifications upon arrival at the facility, with modalities for their preparation prior to cryopreservation, storage, thawing and finally for infusion to patient. Data analysis shows great variability of collected volumes and cell concentrations in cellular products. Despite homogeneous practices for handling cells at the facility, methods vary between centers, especially for the choice of cryoprotective solutions and thawing methods. During the workshop, practices have been discussed and summarized to write of recommendations about the following topics: processing and cryopreservation, thawing, bedside precautions (for infusion). This work identifies some improvements in terms of collection, choice of wash solution of thawed cells and validation of the conditions of carriage.

État actuel de la question

En 2014, l'utilisation de produits cryopréservés à visée d'auto-greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) a concerné 3123 patients en France, 395 en Suisse et 412 en Belgique. Il existe aujourd'hui des référentiels et des dispositions réglementaires qui encadrent les pratiques de production des CSH. Ces textes ne fournissent cependant pas de recommandations techniques. Aussi cette étude a-t-elle pour objectif de proposer des éléments destinés à harmoniser les pratiques de préparation, congélation, décongélation et les modalités de réinjection des produits cellulaires autologues.

Méthodologie

La méthodologie retenue comporte deux grandes étapes :

- la réalisation d'une enquête ;
- l'analyse statistique des données de prélèvement, de préparation, de contrôle qualité, de congélation, et des modalités de réinjection des cellules autologues prélevées.

L'étude s'est appuyée sur une enquête composée de 3 questionnaires abordant les pratiques de congélation-décongélation ainsi que les précautions prises lors de la réinjection au patient.

Elle a été menée auprès des responsables de 23 laboratoires de thérapie cellulaire en France, Belgique francophone et Suisse. L'analyse des réponses à l'enquête a permis de dresser un bilan des pratiques dans les centres participants ([Document supp 1](#)). Le dépouillement des questionnaires a permis de retrouver des processus globalement homogènes. Cependant, certaines pratiques varient d'un centre à l'autre, surtout en termes de solution de congélation et de décongélation.

L'analyse des données de contrôle des cellules réceptionnées montre une très grande hétérogénéité des volumes des recueils de CSH collectés ainsi qu'une hétérogénéité sur le plan qualitatif, notamment en termes de contenu en cellules CD34+, en granulocytes, voire en globules rouges, sans objectiver de différences significatives quant au type de séparateur utilisé ([Document supp 2](#)).

Recommandations

Préparation et congélation

Contrôle qualité à réception

Les contrôles de qualité qu'il est recommandé de réaliser à réception sont les suivants :

- mesure du volume ;
- concentration en cellules nucléées totales (CNT) ;
- hématocrite ;
- plaquettes ;
- granulocytes ;
- viabilité totale ;
- quantification des cellules CD34+ (idéalement en simple plateforme) ;
- détermination de la viabilité des cellules CD45+ et CD34+.

Après réception du produit d'aphérèse au laboratoire, le stockage temporaire avant cryopréservation doit être réalisé dans une enceinte thermostatée régulée entre 4 et +10 °C avec surveillance et enregistrement de la température.

En fonction de leur volume et leur concentration cellulaire [1,2], les produits d'aphérèse peuvent être dilués ou concentrés par centrifugation. Il appartient à chaque laboratoire de définir son propre seuil limite de concentration cellulaire.

La préparation des poches à cryopréserver (fractions) est fonction du nombre de greffes prévues (avec un minimum de 2 poches par greffe).

Délai avant congélation

Le délai avant congélation doit être le plus court possible, idéalement de 6 à 12 heures, avec un maximum de 24 heures après le prélèvement.

Contrôles avant congélation

(Document supp 3).

Préparation avant congélation

Pour la préparation de la solution cryoprotectrice, on utilise du DMSO dilué à 20 % dans une solution macromoléculaire de manière à obtenir une concentration finale à 10 % de DMSO après un mélange volume à volume avec le recueil [1].

Les solutions macromoléculaires recommandées peuvent être :

- du sérum albumine (HSA 4 %) : l'utilisation de ce produit dérivé du sang impose d'assurer une traçabilité rigoureuse des consommables, ce qui entraîne une gestion complexe pour les laboratoires de thérapie cellulaire ;
- de l'hydroxy-éthyl-amidon (HEA) : il s'agit d'une solution macromoléculaire standardisée, disposant d'une autorisation de mise sur le marché et dont l'osmolarité peut varier avec le fabricant ; l'HEA est à utiliser avec des réserves pour les patients souffrant d'allergie à ce produit [3] ;
- du plasma autologue : ceci peut être une alternative mais ce n'est pas une solution standard.

La solution cryoprotectrice doit être préalablement refroidie à 4 °C avant d'être mélangée à la préparation cellulaire.

Le mélange suspension cellulaire et solution cryoprotectrice doit se faire de façon progressive, avec un débit de 10 à 20 mL/min sous agitation constante et maintien d'une température contrôlée (+4/+10 °C) afin de limiter le choc osmotique et d'homogénéiser au mieux le produit en 10 minutes maximum [4].

Une fois le DMSO au contact des cellules, celles-ci doivent être conservées à +4/+10 °C pendant une durée n'excédant pas 30 minutes avant le début de la congélation.

Descente en température programmée et stockage

L'utilisation d'automates permettant de maîtriser et de tracer la descente en température par injection programmée d'azote est vivement recommandée.

La programmation d'une descente en température, selon les recommandations du fournisseur, doit permettre de limiter le pic de surfusion et doit se poursuivre jusqu'à ce que la poche atteigne une température d'au moins -80 °C [1].

L'appareil doit permettre de visualiser la courbe propre à la poche témoin et la courbe propre à l'enceinte de refroidissement en vue de validation [5] (figure 1).

Après descente en température, les poches doivent être conservées à une température inférieure à -150 °C avec surveillance et enregistrement de température.

En l'absence d'équipement de cryogénie utilisant de l'azote ou en cas de panne de ceux-ci, la congélation et le stockage peuvent être réalisés dans une enceinte à -80 °C, préalablement validée, et pour une durée de stockage limitée, inférieure à 6 mois [1,6].

Respect des volumes de remplissage

Il est important de respecter les volumes optimaux de remplissage des poches de cryopréservation et de répartir un volume identique dans chaque poche. Un sur-remplissage expose à un risque de congélation non homogène [1].

Lorsque le fabricant le recommande, l'utilisation d'un suremballage doit être respectée afin de sécuriser les poches stockées ; il est alors important de vider l'air du suremballage avant de procéder à sa soudure [7].

Échantillons de référence

Des échantillons de la suspension cellulaire (cryotubes ou segments attachés) prélevés après ajout de la solution cryoprotectrice doivent être conservés selon les procédures locales afin de pouvoir effectuer des contrôles à posteriori, si cela s'avérait nécessaire (standard JACIE Version 6?D8.14).

Décongélation

Avant la validation d'une prescription pour greffe, il est important de vérifier la cohérence de l'identité du receveur entre la prescription et le produit, le contrôle qualité du greffon et l'intégrité des poches en stock (soudures, connexion des tubulures, suremballage, absence de plis...) notamment si elles sont anciennes. Selon l'organisation du laboratoire et sa procédure de validation, les produits sont décongelés au laboratoire (19 centres) ou au lit du malade (4 centres). Les avantages et inconvénients des deux méthodes de décongélation sont détaillés dans le [tableau 1](#) [5]. Le laboratoire doit disposer d'une procédure de sauvegarde des cellules en cas de fuite à la décongélation.

Il appartient donc à chaque centre de sélectionner et de valider une méthode de décongélation : bain-marie classique avec eau

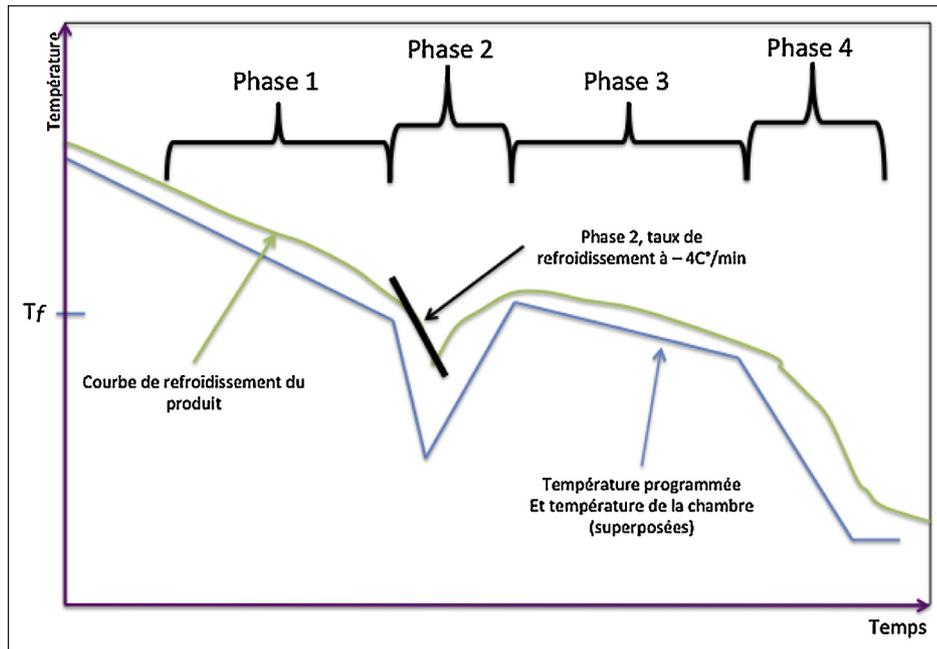


FIGURE 1
 Courbe d'abaissement contrôlé de la température (adaptée du Practical handbook of cellular Therapy cryopreservation, AABB 2015)

TABLEAU I
 Avantages et inconvénients des 2 méthodes de décongélation

	Avantages	Inconvénients
Décongélation au lit du malade	Rendement cellulaire Transport vers des centres greffeurs éloignés Possibilité de programmer la réinjection, voire de l'étaler	Équipes soignantes habilitées Réinjection de DMSO
Décongélation/lavage au laboratoire	Élimination du DMSO et des débris cellulaires	Pertes cellulaires Délai de réinjection par rapport à la décongélation Coût Maîtrise de la technique Réinjection immédiate dès réception

stérile ou à sec. Cette dernière méthode est recommandée afin de limiter l'utilisation d'eau en zone classée.

La température est programmée entre +38 °C et +40 °C, afin d'assurer une remontée rapide de la température du produit, en 2 à 5 minutes [1] pour préserver la viabilité et la fonctionnalité cellulaire.

Une fois le produit décongelé, sa température devrait être maintenue en dessous 10 °C ; le temps d'exposition des cellules au DMSO (avant infusion ou avant lavage) devant être le plus court possible [4].

Décongélation au laboratoire

Techniques de lavage : selon l'équipement du laboratoire, et après validation de la méthode, il est possible de procéder au

lavage soit à l'aide de techniques semi-automatisées (Sepax, Lovo, Cobe2991), soit par technique manuelle avec centrifugeuse à poches.

Solutions de dilution et de lavage : l'utilisation d'une solution macromoléculaire (HSA ou HEA) [8] est recommandée ; celle-ci est à ajouter aux cellules le plus rapidement possible dès la décongélation.

Solutions de suspension cellulaire : il est conseillé d'utiliser la même solution macromoléculaire que celle ayant servi au lavage (HSA, HEA).

Le volume de suspension est à définir en fonction :

- du poids et de l'état clinique du patient ;
- de la concentration cellulaire (max : 200 × 10⁹/L).

Il est préconisé de filtrer les cellules avant distribution en utilisant un filtre de 200 µm [4,8,9].

Les greffons décongelés et lavés sont transportés à des températures comprises entre +18 °C et +24 °C et sont accompagnés si possible d'un enregistreur de température.

Contrôles après décongélation (Document supp 3)

Les données objectivent une récupération en CD34+ de l'ordre de 70 % avec des variabilités très importantes (Document supp 4).

La variabilité de la viabilité des cellules CD45 semble liée à l'importance de la contamination en granulocytes.

L'ajout d'ACD à la solution de décongélation-lavage semble minorer la récupération en CD34. Cependant, son utilisation peut être recommandée en cas de contamination en granulocytes génératrice d'agrégats à la décongélation.

Décongélation au lit du patient

La décongélation est réalisée par du personnel formé régulièrement et disposant de consignes écrites (y compris en cas d'incident de poche). Elle est faite à l'aide d'un bain-marie qualifié avec réinjection immédiate au patient. Cette pratique est d'usage dans certains laboratoires après vérification de la dose de DMSO à réinjecter qui ne doit pas excéder 1 g/kg/j [10] et peut nécessiter la réinjection en plusieurs jours :

- les cellules sont transportées au lit du patient en Dry Shipper ;
- le volume maximal à réinjecter est de 10 mL/kg/j, avec un débit maximal de 10 mL/min et particularité de 4 mL/kg/j pour les enfants de moins de 10 kg [11] ;
- si la dose de DMSO à réinjecter est supérieure, il est recommandé de fractionner la réinjection des poches afin de limiter les effets indésirables liés à l'injection du DMSO, à l'hypothermie, voire à la contamination importante en granulocytes [9,12-14].

Précautions au lit du patient

La mise en place d'une prémédication de type antihistaminique, voire de corticoïdes, est recommandée [3] :

- si la contamination en granulocytes est importante [9,12-14], le service clinique doit en être informé pour adapter la prémédication, et le débit d'infusion. Il doit alors mettre en place une surveillance rapprochée [12] ;
- pour les produits décongelés au laboratoire, il est impératif de respecter la péremption du produit décongelé (4 heures après la fin de la préparation). Le volume maximum à réinjecter est de 10 mL/kg chez l'adulte et 20 mL/kg chez l'enfant ;
- en cas de décongélation au lit du malade, le débit d'infusion sera le plus rapide possible (10 mL/min) afin de limiter l'exposition des cellules contenant du DMSO toxique à température ambiante, sachant qu'il est nécessaire d'opérer une surveillance rapprochée pour les enfants de moins de 10 kg [11] ;
- interactions avec d'autres traitements :

- il est essentiel d'éviter l'administration simultanée de produits sanguins avec les produits cellulaires,
- d'autre part, la voie veineuse d'administration des produits cellulaires doit être réservée exclusivement à cet usage ;
- lors de la libération, et à réception des cellules, l'étiquetage et l'aspect de la poche sont contrôlés (standards JACIE) ;
- surveillance du patient :
 - la surveillance des patients doit être adaptée en fonction de leur état ; elle sera plus rapprochée pour certains d'entre eux (patients âgés, de sexe féminin [13]) ainsi que pour les produits très concentrés en cellules et en granulocytes [9,10] ;
- déclaration d'événements indésirables (EI) [3] :
 - le produit cellulaire doit être accompagné d'une fiche de libération reprenant, outre les caractéristiques du produit et les précautions d'utilisation et de conservation, la traçabilité la tolérance à l'injection et d'une éventuelle prémédication. Ce document doit être retourné au laboratoire à l'issue de la réinjection,
 - il est indispensable de faire un rapport sur tout dysfonctionnement ou événement indésirable au laboratoire en utilisant le document de traçabilité de la réinjection. Le cas échéant, une « Déclaration de biovigilance » (ANSM ou AFMPS) sera complétée,
 - elle sera initiée selon les Recommandations de l'Atelier SFGM-TC de 2011 : signalement des incidents et effets indésirables après greffe de cellules souches hématopoïétiques ;
- traçabilité :
 - celle-ci est réalisée selon les exigences de la réglementation et des standards JACIE.

Conclusion

Face aux divergences de pratiques, ce travail permet d'identifier des axes d'amélioration voire de standardisation des procédures de collecte en termes de protocole d'anticoagulation, de volume de collecte et surtout de contamination en granulocytes.

Deux questions subsistent : quel est le rationnel de l'utilisation d'HSA 4 % ou HEA en tant que solution de lavage des cellules décongelées et quel sont les impacts de la température et la durée du transport des cellules décongelées ?

Financement : la SFGM-TC reçoit l'aide financière des laboratoires Amgen, Astellas, Biosafe, Celgene, Chugai, Jazz Pharmaceuticals, Gentium, Gilead, Janssen, Keocyt, Macopharma, Mallinckrodt Pharmaceuticals, MSD, Mundipharma, OrpheliPharm, Pfizer, Pierre Fabre, Sandoz, Sanofi, Spectrum, Takeda, Teva, Therakos, Vifor pharma.

Déclaration de liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Matériel complémentaire

Complément électronique disponible sur le site Internet de *Bulletin du cancer* (<http://dx.doi.org/10.1016/j.bulcan.2016.09.002>).

Références

- [1] Akkøk CA, Liseth K, Melve GK, Ersvaer E, Hervig T, Bruserud Ø. Is there a scientific basis for a recommended standardization of collection and cryopreservation of peripheral blood stem cell grafts? *Cytotherapy* 2011;13(8):1013-24. <http://dx.doi.org/10.3109/14653249.2011.574117> [Epub 2011 Apr 20. Review. PMID: 21504376].
- [2] Fleming KK. Cryopreservation of hematopoietic and non-hematopoietic stem cells *Transfusion and Apheresis. Science* 2006;34.
- [3] Sauer-Heilbronn A. Patient care during infusion of hematopoietic progenitor cells. *Transfusion* 2004.
- [4] Martin-Henao GA. Adverse reactions during transfusion of thawed hematopoietic progenitor cells from apheresis are closely related to the number of granulocyte cells in the leukapheresis product. *Vox sanguinis*; 2010.
- [5] Practical handbook of cell therapy cryopreservation. AABB; 2015.
- [6] Clapissou G. Cryopreservation with Hydroxyethylstarch (HES)+Dimethylsulfoxide (DMSO) gives better results than DMSO alone. *Bull Cancer* 2004.
- [7] Abbruzzese L. A new freezing and storage procedure improves safety and viability of haematopoietic stem cells and neutrophil engraftment: a single institution experience. *Vox sanguinis*; 2010.
- [8] Michael A. Cox "Historical perspectives and the future of adverse reactions associated with haemopoietic stem cells cryopreserved with dimethyl sulfoxide". *Cell Tissue Bank* 2012.
- [9] Cordoba R. The occurrence of adverse events during the infusion of autologous peripheral blood stem cells is related to the number of granulocytes in the leukapheresis product. *BMT* 2007.
- [10] Calmels B. Occurrence and severity of adverse events after autologous hematopoietic progenitor cell infusion are related to the amount of granulocytes in the apheresis product. *Transfusion* 2007.
- [11] Paul Schlegel. Transient loss of consciousness in pediatric recipients of dimethylsulfoxide (DMSO)-cryopreserved peripheral blood stem cells independent of morphine co-medication. *Haematologica* 2009.
- [12] Milone G. Adverse events after infusions of cryopreserved hematopoietic stem cells depend on non-mononuclear cells in the infused suspension and patient age. *Cytotherapie Vol* 2007.
- [13] Bernal T. Serious adverse events during hematopoietic stem cells infusion are determined by the number of infused granulocytes. *EBMT* 2008;457.
- [14] Lemarie C. Clinical experience with the delivery of thawed and washed autologous blood cell, with an automated closed fluid management device: cytomate. *Transfusion* 2005.