



Conservation/congélation des greffons de CSH dans un contexte pédiatrique : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC)

John De Vos¹, Eva de Berranger², Charlotte Jubert³, Cécile Pochon⁴, Catherine Letellier⁵, Valérie Mialou⁶, Anne Sirvent⁷, Ibrahim Yakoub-Agha⁸, Jean-Hugues Dalle⁹

Reçu le 20 avril 2017
Accepté le 30 avril 2017
Disponible sur internet le :
21 novembre 2017

1. CHU de Montpellier, unité de thérapie cellulaire, 80, avenue Fliche, 34295 Montpellier cedex 5, France
2. CHRU de Lille, hôpital Jean-de-Flandre, service pédiatrie et hématologie, rue Eugène-Avinée, 59037 Lille cedex, France
3. CHU Bordeaux, hôpital des enfants, unité d'hématologie oncologie pédiatrique, place Amélie-Raba-Léon, 33000 Bordeaux, France
4. CHU de Nancy, service d'hématologie, unité de transplantation médullaire allogénique, 54500 Vandœuvre-lès-Nancy, France
5. EFS Rennes, rue Pierre-Jean-Gineste, 35016 Rennes, France
6. Centre hospitalier Lyon Sud, établissement français du sang (EFS) Rhône Alpes, cell therapy laboratory, 69310 Pierre-Bénite, France
7. CHRU de Montpellier, département d'onco-hématologie pédiatrique, 34295 Montpellier, France
8. CHU de Lille, université de Lille2, LIRIC Inserm U995, 59000 Lille, France
9. Université Paris 7, hôpital Robert-Debré, service d'hémato-immunologie, 75019 Paris, France

Correspondance :

Jean-Hugues Dalle, université Paris 7, hôpital Robert-Debré, service d'hémato-immunologie, 75019 Paris, France.
jhugues.dalle@gmail.com

Mots clés

Cellules souches
hématopoïétiques
Cellules CD34⁺
Pédiatrie
Congélation
Composition du greffon

Résumé

Dans une démarche qui vise à uniformiser les procédures d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, la Société francophone de greffe de moelle et thérapie cellulaire (SFGM-TC) a organisé les 7^e ateliers d'harmonisation des pratiques en allogreffe en septembre 2016 à Lille. L'objectif de notre atelier est d'aborder le sujet de la conservation et congélation des cellules souches hématopoïétiques dans un contexte pédiatrique et de fournir des recommandations.

Keywords

CD34⁺ cells
Congelation
Graft composition
Hematopoietic stem cells
Pediatrics

■ Summary

Preservation/congelation of hematopoietic stem cell grafts in a pediatric context: Guidelines from the Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy (SFGM-TC)

The Francophone Society of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy (SFGM-TC) organized the 7th allogeneic hematopoietic stem cell transplantation clinical practices harmonization workshop series in September 2016 in Lille, France. The objective of our workshop is to provide a discussion on the conservation and congelation of hematopoietic stem cells in a pediatric setting as well as our recommendations for this technique.

Définition du « contexte pédiatrique » : donneur ou receveur mineur.

Questions posées

Les questions posées sont :

- don dirigé de sang placentaire en intra-familial ;
- qualification des donneurs mineurs ;
- définition des seuils de collecte : cible, seuil minimal, seuil maximal ;
- indications de congélation des greffons de CSH en fonction des richesses cellulaires en situation autologue, en situation allogénique géno-identique et en situation phéno-identique 9 et 10/10 ;
- volume maximal des greffons.

Méthodologie

Une revue de la littérature a été réalisée sur le site Pubmed en croisant les mots-clés suivants : « cell dose », « pediatrics », « child », « children », « autologous stem cell transplantation », « allogeneic stem cell transplantation », « graft versus host disease », « CD34 positive cells », « graft composition », « plerixafor », « transfusion », « engraftment », « healthy donor » « harvest ». Un questionnaire en ligne de 18 questions a été élaboré par les auteurs et diffusé à deux reprises à l'ensemble des membres de la SFGM-TC par messagerie électronique. Plusieurs membres d'un même centre pouvaient répondre de façon autonome. Dix-huit réponses ont été reçues et analysées.

État de l'art et recommandations (par question)

Don dirigé de sang placentaire en intra-familial

Le don dirigé de sang placentaire en intra-familial :

- indications ;
- critères de conservation/destruction ;
- organisation/faisabilité du prélèvement ;
- techniques de conservation.

État actuel de la question

Indications

Il existe des recommandations de l'Agence de la biomédecine (ABM) et du Réseau français de sang placentaire (RFSP) de mars 2009 définissant les indications de prélèvement lorsqu'il existe

dans la fratrie un enfant atteint d'une des pathologies suivantes avec indication potentielle de greffe :

- hémoglobinopathie ;
- maladie métabolique ;
- aplasie médullaire constitutionnelle ou acquise ;
- leucémie aiguë lymphoblastique ou myéloïde (LAL/LAM) dont la première rémission date de moins de 5 ans ;
- tumeur solide pour laquelle la greffe allogénique est proposée dans le cadre de la recherche clinique ;
- autre, notamment les affections génétiques dans le cadre de la recherche clinique.

Critères de conservation/destruction

Le RFSP recommande :

- de se rapprocher des standards établis pour la conservation non apparentée en termes de volume, richesse, viabilité et exigences microbiologiques (sérologies et bactériologie) ;
- que le typage HLA de l'enfant atteint est requis lors de la demande de conservation. Pour les affections non malignes, seules les USP HLA compatibles 5 ou 6/6 sont conservées. Pour les maladies malignes la compatibilité minimale doit être de 3/6 ;
- que la possibilité de destruction soit indiquée dans la notice d'information et le consentement signé par la mère. La destruction sera réalisée en cas d'abandon du projet de greffe allogénique avec cette USP.

Organisation/faisabilité

La prescription de conservation doit être faite par le médecin en charge de l'enfant malade et adressée à la maternité où accouche la mère et au laboratoire de thérapie cellulaire.

La mère doit être informée des modalités de ce prélèvement y compris de la possibilité ultérieure de réaliser un prélèvement médullaire chez l'enfant à naître, et signer un consentement de conservation de l'USP à visé allogénique pour l'enfant nommé et son accord ou refus d'utilisation de cette USP à des fins de recherche en cas d'abandon du projet d'allogreffe avec cette USP pour l'enfant nommé.

Techniques de conservation

Le RFSP recommande d'utiliser des poches sans réduction de volume tout en laissant le choix à chaque banque.

Recommandations**Indications**

Les auteurs sont en accord avec les recommandations de ABM/RFSP complétées des précisions suivantes :

- pour les affections génétiques, il doit exister un marqueur permettant de faire le diagnostic soit sur l'USP, soit sur l'enfant à naître ;
- pour les LAL et LAM à moins de 5 ans de la dernière rémission ;
- il n'existe pas actuellement d'indication de conservation d'USP en direction de l'un des deux parents atteints d'une pathologie avec indication d'allogreffe en vue d'une éventuelle greffe d'USP haplo-identique.

Critères de conservation/destruction

Les auteurs sont en accord avec les recommandations de ABM/RFSP complétées des précisions suivantes :

- quelle que soit l'indication de greffe, seules sont conservées les USP compatibles 5 et 6/6 avec l'enfant atteint ;
- pour les pathologies génétiques, les auteurs recommandent la conservation des USP non compatibles avec l'enfant atteint si les parents expriment le souhait d'avoir d'autres enfants dans l'avenir.

Organisation/faisabilité

La réalisation du prélèvement doit être idéalement organisée dans une maternité dont le personnel est formé au prélèvement de sang placentaire. À défaut, la réalisation d'une formation minimale du préleveur est indispensable.

Un consentement type et un exemple de notice d'information, qui devront être adaptées aux pratiques de chaque centre, sont mis à disposition sur le site internet de la SFGM-TC ou peuvent être demandé aux auteurs correspondants.

Techniques de conservation

Les auteurs recommandent d'utiliser des poches sans réduction de volume afin d'éviter toute perte cellulaire.

Qualification des donneurs mineurs**État actuel de la question**

Rappel de la loi : le prélèvement sur mineur ou sur majeur protégé est interdit par l'article L. 1241-2, sauf situations dérogatoires prévues aux articles L. 1241-3 pour les mineurs. « Par dérogation (...), en l'absence d'autre solution thérapeutique, un prélèvement de cellules hématopoïétiques recueillies par prélèvement dans la moelle osseuse ou dans le sang périphérique peut être fait sur un mineur au bénéfice de son frère ou de sa sœur ».

L'apport de la révision de 2011, par l'expression « ou dans le sang périphérique » entre en contradiction avec les dispositions législatives du L. 1221-6 du même code qui n'ont, alors, pas été modifiées et s'opposent à une modification des caractéristiques du sang chez le mineur avant prélèvement en vue d'une utilisation thérapeutique pour autrui. Cette disposition rendrait impossible l'utilisation de G-CSF pour le recueil de CSH dans le sang périphérique chez un enfant. L'Agence de la biomédecine

prévoit la possibilité d'autoriser cette technique sur demande argumentée des équipes de greffes.

La dérogation s'étend au-delà de la fratrie uniquement pour les CSH de moelle osseuse : « lorsqu'un tel prélèvement n'est pas possible et en l'absence d'autre solution thérapeutique appropriée, le prélèvement de cellules hématopoïétiques issues de la moelle osseuse peut, à titre exceptionnel, être fait sur un mineur au bénéfice de son cousin germain ou de sa cousine germaine, de son oncle ou de sa tante, de son neveu ou de sa nièce. ».

Recommandations

La lecture des textes législatifs indique l'impossibilité de recourir à un donneur mineur pour la réalisation d'une greffe haplo-identique, en particulier au profit d'un de ses parents qui se retrouveraient en situation de « conflit d'intérêt » devant donner l'autorisation de prélèvement à leur profit.

Il est possible que des situations exceptionnelles de don haplo-identique puisse exister à l'endroit d'autres membres de la famille (frère, sœur, cousin(e) germain(e), oncle ou tante) pour lesquels il revient aux équipes de greffe et de prélèvement, au magistrat du Tribunal de Grande Instance et au Comité des experts de juger de « l'absence d'autre solution thérapeutique ».

Définition des seuils de collecte : cible, seuil minimal, seuil maximal

La définition des seuils de collecte : cible, seuil minimal, seuil maximal :

- situations de greffe autologue ;
- situations de greffe allogénique.

État actuel de la question

L'analyse des réponses au questionnaire diffusé par la SFGM-TC démontre l'absence de consensus même s'il est possible que la formulation des questions ait induit une certaine confusion, le terme objectif ayant pu être compris comme « dose minimale » ou « dose optimale ».

Situations de greffe autologue

Il existe des recommandations nationales ou internationales publiées dans la littérature. Ces recommandations ne comprennent généralement pas de spécificités pédiatriques.

En 2014, la Société américaine de greffe de moelle (ASBMT) a publié « *Optimizing autologous stem cell mobilization strategies to improve patient outcome : consensus guidelines and recommendations* » et « *Peripheral progenitor cell mobilization for autologous and allogeneic hematopoietic cell transplantation : guidelines from the ASBMT* » [1,2]. Dans ces documents, le seuil minimal de recueil de CD34+ est fixé à $2 \times 10^6/\text{kg}$ lors des prélèvements de CSP et le seuil optimal est fixé à $5 \times 10^6/\text{kg}$. Aucun seuil maximal n'est proposé. Cependant, l'équipe de Marseille souligne que la contamination du greffon en polynucléaires neutrophiles augmente la survenue d'effets secondaires sévères [3].

Situations de greffe allogénique

Le constat est le même sur l'absence de recommandations spécifiques à la population pédiatrique, en dehors des références citées plus haut et Karakukcu et Unal [4].

Rappel de la loi : le prélèvement maximum autorisé chez le donneur sain en France est de 20 mL/kg de poids corporel du donneur et ce quelle que soit la dose cible prescrite : « le volume maximal prélevé unitairement est de 20 mL par kilogramme du poids de la personne prélevée et le nombre de prélèvements est adapté à la nécessité thérapeutique et fait l'objet d'une décision conjointe du donneur, du médecin préleveur et de l'anesthésiste-réanimateur » (Arrêté du 16 décembre 1998 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives au prélèvement des cellules souches hématopoïétiques issues du corps humain et des cellules mononucléées sanguines utilisées à des fins thérapeutiques, point 3.3.1.3.).

Recommandations

Pour les patients inclus dans des protocoles prospectifs de recherche clinique, il est nécessaire de se reporter au protocole qui le plus souvent définit les doses cellulaires minimale, optimale et maximale.

En l'absence d'inclusion dans une étude de recherche clinique, les auteurs recommandent les doses indiquées dans le [tableau 1](#).

Il n'est pas apparu possible de définir des doses de cellules nucléées totales, de CD34+ ou de CD3+ en situation de greffe haplo-identique chez les patients receveurs d'âge pédiatrique.

En situation autologue

En cas de recueil riche ($> 3 \times 10^6$ CD34+/kg et par greffon) et dans le cas particulier des programmes d'autogreffes multiples dans le traitement des médulloblastomes prévoyant une irradiation de l'axe crano-spinal en post-greffe, il est suggéré de conserver un greffon supplémentaire (quelle que soit sa richesse) pour palier à une éventuelle thrombopénie persistante post-radique.

En situation allogénique

Les recommandations sont peu différentes de celles de l'adulte. La source de CSH privilégiée pour les patients d'âge pédiatrique doit être la moelle osseuse compte tenu du risque avéré d'augmentation d'incidence et de sévérité de GvH chronique (Eapen, 2007 ; Eapen, 2011 ; Peters, 2014), y compris en situation géno-identique.

Sauf exceptions propres à certains protocoles, il n'existe plus d'indication à cryo-conserver de greffons autologues de sauvetage (« *back-up* »).

En cas d'incompatibilité ABO, en fonction de la technique de désérythrocytation utilisée, une attention particulière devra être portée au volume minimal collecté.

Les études de l'impact de la richesse cellulaire du greffon sur le devenir des patients aboutissent à des conclusions parfois contradictoires. Alors qu'un seuil minimal de cellules souches CD34+ dans les greffons de moelle et de CSP est

majoritairement reconnu comme facteur influençant la mortalité liée à la toxicité (TRM) [5,6], l'existence d'un seuil maximal est controversé : un sur-risque de GVH chronique extensive accompagné d'un excès de TRM a été observé, surtout dans les situations de greffe de CSP, chez le receveur adulte après conditionnement myéloablatif ou à intensité réduite, au-delà d'un seuil variant de $8 \text{ à } 11 \times 10^6$ CD34+/kg, y compris dans les situations de greffe géno-identiques, en l'absence de T-déplétion in vivo [7-10]. Ce sur-risque de GVH chronique n'est pas retrouvé dans toutes les études, surtout dans les études pédiatriques, avec de la moelle osseuse [9,11,12]. Deux études portant sur des greffons de moelle osseuse et de CSP phéno-identiques [11,13], tendent à prouver inversement qu'un taux très élevé de CD34+ a un impact positif sur la survie sans augmenter le risque de GVH. Globalement, hormis dans le contexte particulier de greffe géno-identique dans les aplasies médullaires idiopathiques [14], aucun sur-risque de GVH n'a été rapporté pour un taux de CD34+ inférieur à 8×10^6 /kg. Il est à noter qu'aucun seuil plafond n'a été rapporté dans la littérature pour le taux de CNT des greffons médullaires en lien avec la TRM.

Indications de congélation des greffons de CSH en fonction des richesses cellulaires en situation allogénique

État actuel de la question

L'attitude des centres apparaît variable quant à la conduite à tenir avec les « excédents » de greffon, au-delà des seuils maximaux recommandés. Certaines équipes congèlent ces excédents quelle que soit la source cellulaire, d'autres ne cryo-conservent que les excédents de greffon de CSP et éliminent les excédents de greffon médullaire, d'autres enfin administrent la totalité des greffons reçus. L'attitude peut être modulée en fonction de la richesse du greffon résiduel.

La littérature internationale apparaît assez pauvre sur cette question. Certains auteurs proposent la cryoconservation des CSP « primées » par GCSF pour utilisation ultérieure comme équivalent de DLI (pas de sélection CD3+) [15].

Recommandations

L'état des connaissances actuelles ne permet pas d'émettre des recommandations fermes. L'élimination de cellules excédentaires prélevées chez un donneur sain peut être critiquée d'un point de vue éthique, mais ne saurait justifier de dépasser le seuil optimum de cellules à injecter au regard du risque accru de GVH.

Volume maximal des greffons à réinjecter

État actuel de la question

En situation autologue, les recommandations de la SFGM-TC sont de ne pas dépasser 20 mL/kg [16].

Nous n'avons pas identifié de recommandations portant sur les greffons allogéniques.

TABLEAU I

Recommandations des doses de cellules nucléées au cas où le patient n'est pas inclus dans une étude de recherche clinique

	Greffe autologue		Greffe allogénique	
		Allogreffe géno-identique	Allogreffe phéno-identique	
			HLA compatible 10/10	HLA compatible 9/10
Moelle osseuse				
CNT (10^8 /kg)	1			
Seuil optimal	NA	4	4	4
Seuil minimal	NA	2 ²	2 ²	2
Seuil maximal	NA	Aucun	???	???
Incompatibilité ABO majeure	NA	+ 30 %	+ 30 %	+ 30 %
CD34+	NA			
Seuil optimal	NA			
Seuil minimal	NA			
Seuil maximal	NA			
CD3+	NA	Aucun	Aucun	Aucun
CSP				
CNT (10^8 /kg)				
Seuil optimal	NA			
Seuil minimal	NA			
Seuil maximal	NA			
Incompatibilité ABO majeure	NA	Greffon pauvre en globules rouges		
CD34+ (10^6/kg)				
Seuil optimal	4 ³	6 ⁴	6	6
Seuil minimal	2 ³	4 ⁴	4	4
Seuil maximal	Aucun	Aucun	8	8
CD3+	NA			

¹Situation exceptionnelle d'impossibilité de mobilisation, se référer au protocole dans lequel le patient est inclus.

²Pour les pathologies non malignes, le seuil minimal recommandé est de 3×10^8 CNT/kg.

³En cas de programme de « multi-autogreffe » dans la prise en charge des tumeurs solides, le seuil minimal recommandé est de 3×10^6 CD34+/kg afin de ne pas retarder le programme thérapeutique du fait d'une mauvaise reconstitution hématopoïétique, en particulier sur la lignée plaquettaire.

⁴Situation exceptionnelle de greffe de CSP en situation géno-identique à partir d'un donneur intra-familiale ayant une contre-indication au don de moelle.

N/A: Not Available

Il existe des recommandations HAS/ANSM publiées en novembre 2014 portant sur les bonnes pratiques transfusionnelles donc peu adaptées aux greffons de CSH.

Recommandations

En situation autologue, les auteurs préconisent de suivre les recommandations publiées en 2016.

En situation allogénique, il est sans doute préférable que le volume total du produit cellulaire n'excède pas 20 mL/kg en procédant à une réduction de volume au laboratoire de thérapie cellulaire. Si malgré tout, le volume excède 20 mL/kg, l'attitude

d'allonger la durée de transfusion du greffon selon sa date de péremption, suivie ou non de l'administration d'un diurétique (furosémide) est proposée.

Questions résiduelles : réalisation d'études rétrospectives sur :

- la reconstitution plaquettaire en fonction de la dose cellulaire en autogreffe : le seuil minimal de 2×10^6 est-il suffisant (ou raisonnable) ;
- l'effet GvL comparé des DLI « standards » et des DLI réalisées avec des CSP primées dans les hémopathies malignes en adulte. Évaluer si cette étude est réalisable chez l'enfant (peu probable).

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

Références

- [1] Giral S, Costa L, Schriber J, et al. Optimizing autologous stem cell mobilization strategies to improve patient outcomes: consensus guidelines and recommendations; *Biol Blood Marrow Transplant* 20 (3), 2014;p. 295-308.
- [2] Duong HK, Savani BN, Copelan E, et al. Peripheral blood progenitor cell mobilization for autologous and allogeneic hematopoietic cell transplantation: guidelines from the American Society for Blood and Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(9):1262-73.
- [3] Calmels B, Lemarié C, Esterni B, et al. 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;47(7):1268-75.
- [4] Karakukcu M, Unal E. Stem cell mobilization and collection from pediatric patients and healthy children. *Transfus Apher Sci* 2015;53(1):17-22.
- [5] Dominietto A, Lamparelli T, Raiola AM, et al. Transplant-related mortality and long-term graft function are significantly influenced by cell dose in patients undergoing allogeneic marrow transplantation. *Blood* 2002;100(12):3930-4.
- [6] Collins NH, Gee AP, Durett AG, et al. The effect of the composition of unrelated donor bone marrow and peripheral blood progenitor cell grafts on transplantation outcomes. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16(2):253-62.
- [7] Mohty M, Bilger K, Jourdan E, et al. Higher doses of CD34+ peripheral blood stem cells are associated with increased mortality from chronic graft-versus-host disease after allogeneic HLA-identical sibling transplantation. *Leukemia* 2003;17(5):869-75.
- [8] Zaucha JM, Gooley T, Bensinger WI, et al. CD34 cell dose in granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood mononuclear cell grafts affects engraftment kinetics and development of extensive chronic graft-versus-host disease after human leukocyte antigen-identical sibling transplantation. *Blood* 2001;98(12):3221-7.
- [9] Remberger M, Törlén J, Ringdén O, et al. Effect of total nucleated and CD34(+) cell dose on outcome after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2015;21(5):889-93.
- [10] Singh AK, Savani BN, Albert PS, Barrett AJ. Efficacy of CD34+ stem cell dose in patients undergoing allogeneic peripheral blood stem cell transplantation after total body irradiation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;13(3):339-44.
- [11] Kätwak K, Porwolik J, Mielcarek M, et al. Higher CD34(+) and CD3(+) cell doses in the graft promote long-term survival, and have no impact on the incidence of severe acute or chronic graft-versus-host disease after in vivo T cell-depleted unrelated donor hematopoietic stem cell transplantation in children. *Biol Blood Marrow Transplant* 2010;16(10):1388-401.
- [12] Pichler H, Witt V, Winter E, et al. No impact of total or myeloid CD34+ cell numbers on neutrophil engraftment and transplantation-related mortality after allogeneic pediatric bone marrow transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;20(5):676-83.
- [13] Pulsipher MA, Chitphakdithai P, Logan BR, et al. Donor, recipient, and transplant characteristics as risk factors after unrelated donor PBSC transplantation: beneficial effects of higher CD34+ cell dose. *Blood* 2009;114(13):2606-16.
- [14] Gallo S, Woolfrey AE, Burroughs LM, et al. Marrow grafts from HLA-identical siblings for severe aplastic anemia: does limiting the number of transplanted marrow cells reduce the risk of chronic GvHD? *Bone Marrow Transplant* 51 (12), 2016 1573-1578.
- [15] Wang Y, Liu D-H, Xu L-P, et al. Prevention of relapse using granulocyte CSF-primed PBPCs following HLA-mismatched/haploidentical, T cell-replete hematopoietic SCT in patients with advanced-stage acute leukemia: a retrospective risk-factor analysis. *Bone Marrow Transplant* 2012;47(8):1099-104.
- [16] Boulanger F, Decot V, Bulliard G, et al. [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)]. *Bull Cancer* 2016;103(11S):S267-72.