

# Monitoring biologique des greffes de cellules souches hématopoïétiques

**Dr. A. Gothot, Laboratoire d'Hématologie, CHU Sart Tilman, Liège**

## Physiologie de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est un système clonal formant plusieurs compartiments cellulaires aux propriétés distinctes. Un premier compartiment est celui des cellules souches, cellules primordiales possédant deux caractéristiques principales:

- la capacité d'auto-renouvellement, ou la propriété de se reproduire identiques à elles-mêmes par division cellulaire et de perpétuer ainsi l'hématopoïèse au cours de la vie;
- la multipotentialité, c'est-à-dire la capacité de donner naissance à toutes les lignées de cellules sanguines et lymphoïdes.

Aux cellules souches succèdent les progéniteurs multipotentiels, cellules dépourvues d'auto-renouvellement mais possédant toujours des capacités différenciatives multiples. Celles-ci sont restreintes progressivement aux stades de progéniteurs oligo- puis unipotentiels. A la suite des progéniteurs apparaissent les précurseurs, où l'on retrouve les blastes de toutes les lignées (myéloblastes, lymphoblastes, érythroblastes...) et les stades plus différenciés jusqu'aux cellules sanguines et lymphoïdes terminales. Il est important de noter dès à présent, que seuls les précurseurs et leur descendance sont identifiables microscopiquement. En raison de leur faible nombre et de l'absence de caractéristiques distinctives, les progéniteurs et cellules souches ne peuvent être mis en évidence que par des méthodes indirectes, que nous allons détailler.

## Cultures clonogéniques

La mise en évidence de cellules souches vraies n'est réalisée que par transplantation à l'animal et n'est pas du ressort d'un laboratoire clinique. Des systèmes élaborés de coculture en présence de cellules stromales médullaires ont été développés pour identifier in vitro des cellules souches ou des progéniteurs multipotentiels. Ces techniques sont également du domaine du laboratoire de recherche et ne seront pas envisagées ici.

Les progéniteurs oligo- et unipotentiels sont énumérés par culture clonogénique en milieu semi-solide. Les cellules mononucléées provenant d'un

échantillon de moëlle ou de toute autre source de progéniteurs (voir plus loin) sont dispersées et immobilisées dans un milieu de culture gélifié. L'agent gélifiant est dans la majorité des cas de la méthylcellulose, mais le collagène ou l'agar peuvent être également utilisés dans ce but. Le milieu comprend un ensemble de nutriments et de stimulants optimisés pour la croissance des progéniteurs:

- un milieu de base, le milieu d'Iscove;
- du sérum de veau fœtal;
- des facteurs de croissance. Ceux-ci peuvent être présents sous la forme de milieux conditionnés, lymphocytaire ou placentaire par exemple, ou sous la forme de facteurs de croissance recombinants purifiés.

De l'ordre de 10.000 à 50.000 cellules mononucléées sontensemencées dans un ml de milieu en boîtes de Pétri de 35 mm en duplicates ou en triplicates. Dans un délai de 2 à 3 semaines, les progéniteurs présents dans la suspension cellulaire de départ donnent naissance à des colonies cellulaires identifiables au microscope inversé. Dans les milieux usuels, les colonies sont formées:

- soit de granulocytes et de macrophages: elles dérivent alors d'un progéniteur granulocyte macrophagique (granulocyte macrophage colony-forming cell: GM-CFC);
- soit d'érythroblastes: ceux-ci proviennent d'un progéniteur de la lignée rouge (erythroid burst forming cell: E-BFC). Dans de rares cas, une colonie peut comprendre simultanément des cellules de la lignée rouge et de la lignée blanche et signer alors la présence d'un progéniteur mixte. Après énumération des colonies par balayage visuel de l'ensemble de la boîte de culture, le nombre de progéniteurs est exprimé par rapport à un nombre défini de cellules initiales ou par unité de volume d'échantillon.

## Les limitations de cette technique sont les suivantes:

- bien que ne nécessitant pas d'équipement coûteux, il s'agit d'une procédure fastidieuse et non automatisable;
- le délai de deux à trois semaines nécessaire à la prolifération des progéniteurs limite son intérêt clinique pour l'évaluation extemporanée des greffons; elle garde néanmoins toute son utilité pour l'évaluation des greffons conservés par

- congélation (autogreffes, sangs de cordon);
- il existe une variabilité inter-laboratoire importante en raison d'une part, de la subjectivité inhérente à l'identification des colonies, et d'autre part, de l'absence de standardisation des milieux de culture utilisés;
- il ne s'agit que d'un reflet indirect des cellules souches régénératrices de l'hématopoïèse, lesquelles ne sont pas détectées dans ce type de culture.

Les cultures clonogéniques sont néanmoins irremplaçables pour évaluer fonctionnellement la qualité des progéniteurs présents dans les greffons et de ce fait, constituent un contrôle de qualité rétrospectif de l'ensemble des procédures de collecte, de sélection et de préservation des cellules souches dans les centres de transplantation.

### Numération des progéniteurs par cytométrie en flux

L'antigène CD34 a été décrit à l'origine comme un marqueur présent sur les blastes d'une lignée de leucémie myéloblastique aiguë. On a par la suite reconnu sa présence sur les progéniteurs hématopoïétiques normaux. Un anticorps anti-CD34 reconnaît environ 1.5% des cellules médullaires humaines. On a établi que l'antigène CD34 est exprimé par les cellules souches vraies et par les progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes. Il n'est pas présent à la surface de cellules plus différenciées telles que les précurseurs et les cellules sanguines et lymphoïdes terminales. La numération des cellules CD34+ s'effectue par cytométrie en flux à l'aide d'anticorps monoclonaux conjugués à des fluorochromes.

L'antigène CD34 est une protéine transmembranaire glycosylée et riche en acide sialique. Les épitopes reconnus par les divers anticorps monoclonaux anti-CD34 ont été classés en fonction de leur sensibilité enzymatique:

- épitopes de type III: résistants à la neuraminidase et la chymopapaïne (ex: HPCA-2);
- épitopes de type II: sensibles à la chymopapaïne (ex: QBEnd10);
- épitopes de type I: sensibles aux 2 enzymes.

Il n'est pas recommandé d'utiliser des anticorps de type I en raison de leur incapacité à détecter toutes les glycoformes du CD34, de leur avidité faible et de leur faible réactivité après conjugaison à des fluorochromes.

Les cellules porteuses de l'antigène CD34 sont présentes en très faible proportion dans des suspensions cellulaires comprenant notamment des érythrocytes lysés, des plaquettes et agrégats plaquettaires, des leucocytes ainsi que des débris et cellules mortes. Les procédures de numération s'efforcent d'identifier positivement les cellules CD34+ viables et d'exclure du comptage les éléments susceptibles de fixer de façon non spécifique les anticorps anti-CD34. Des

recommandations précises ont été publiées par l'International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE; J Hematother (1996) 5:213) et par le British Committee for Standards in Haematology (BCSH; Clin Lab Haematol (1999) 21:301). Le lecteur trouvera dans ces deux publications les meilleurs anticorps répertoriés ainsi que les protocoles d'analyse permettant de discriminer au mieux les cellules marquées spécifiquement.

L'intérêt de l'énumération des cellules CD34+ par cytométrie de flux réside dans sa rapidité (délai de réponse: environ une heure), compatible avec un monitoring "en direct" des récoltes de cellules souches. Signalons néanmoins que cette technique ne donne pas d'information fonctionnelle sur la qualité des progéniteurs, et, comme il a été précisé pour les cultures clonogéniques, identifie majoritairement des progéniteurs différenciés et non des cellules souches vraies.

### Les récoltes de cellules souches

Les cellules souches sont récoltées à partir de 3 sources différentes: moëlle osseuse, sang périphérique, sang de cordon ombilical.

#### A. Moëlle osseuse

Dans le cas d'une allogreffe, on recommande de récolter  $3 \times 10^8$  leucocytes/kg de poids du receveur; pour une autogreffe, la cible est de  $2 \times 10^8$  leucocytes/kg. Une contrôle extemporané du nombre de cellules collectées est généralement pratiqué après prélèvement de 500 ml de moëlle. Ces nombres doivent être adaptés en fonction des traitements ultérieurs du greffon, tels que déplétion lymphocytaire ou sélection des cellules CD34+ (voir plus loin). Le don de moëlle constitue par lui-même une hémorragie importante menant à une anémie, laquelle peut être prévenue par autotransfusion.

Les greffes de moëlle proprement dites sont de moins en moins fréquemment pratiquées en raison du développement des récoltes de cellules souches périphériques.

#### B. Cellules souches périphériques

Les greffes de cellules souches périphériques sont devenues prépondérantes en pratique clinique. Elles assurent une prise de greffe rapide et une reconstitution hématopoïétique durable, avec une meilleure tolérance pour le donneur. De très faibles quantités de cellules souches et de progéniteurs sont présentes dans le sang périphérique d'un sujet normal. En réponse à plusieurs stimuli, les cellules souches et progéniteurs sont relarguées ou "mobilisées" à partir de la moëlle et peuvent être recueillies par cytophérèse. Les récoltes de cellules souches périphériques s'effectuent en conditions ambulatoires, contrairement aux dons de cellules médullaires qui nécessitent une anesthésie générale. La mobilisation des cellules souches est réalisée par:

- chimiothérapie (par exemple: cyclophosphamide): après une phase de leucopénie survient un effet "rebond" et un passage de cellules souches et de progéniteurs en périphérie; cette modalité est bien entendu réservée aux autogreffes et intégrée dans le traitement de la maladie cancéreuse primitive;
- facteurs de croissance: le plus utilisé est le granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF, plusieurs formulations disponibles) qui a pour effet d'induire dans un délai de quatre à cinq jours une mobilisation massive; le G-CSF est utilisé aussi bien en autogreffe qu'en allogreffe;
- dans le cas des autogreffes, on peut combiner pour une efficacité maximale, chimiothérapie et G-CSF.

Dans les effets secondaires du don de cellules souches périphériques, on doit distinguer l'action du G-CSF et les répercussions de la cytophèrese elle-même. Le G-CSF induit une leucocytose avec déviation à gauche, une hypoproduction plaquettaire centrale légère, mais pas de modifications des populations lymphocytaires. Aucun effet à long terme (en particulier néoplasique) du G-CSF n'a été décrit à ce jour. Il ne semble pas non plus qu'il y ait de risque d'épuisement des cellules souches. La cytophèrese entraîne une perte de 30 à 50% des plaquettes circulantes, une thrombopénie ( $<70.000/\mu\text{l}$ ) constituant une contre-indication à la procédure. La cytophèrese produit également une diminution transitoire des taux de lymphocytes et de granulocytes circulants.

Les récoltes de cellules souches périphérique sont planifiées en fonction du taux circulant de cellules CD34+ atteint par mobilisation. Un minimum de 10 à 20 cellules CD34+/ $\mu\text{l}$  de sang périphérique est recommandé avant d'entamer les séances de cytophèrese. Le nombre total de cellules à récolter doit atteindre un seuil de  $2 \times 10^6$  cellules CD34+/kg, une dose de  $5 \times 10^6$  cellules CD34+/kg assurant une prise de greffe rapide. Ces paramètres sont contrôlés "en temps réel" par numération des cellules CD34+ par cytométrie de flux de façon, à adapter la durée et la répétition des séances de cytophèrese.

### C. Sang de cordon ombilical

Le sang de cordon ombilical refluant du placenta après la naissance est riche en progéniteurs et cellules souches hématopoïétiques. Plusieurs centres de transplantation ont entrepris d'établir des banques de sangs de cordon, prélevés systématiquement après tout accouchement et conservés par congélation, de façon à constituer un pool de greffons disponibles pour des allogreffes. La greffe de sang de cordon constitue une alternative intéressante dans les cas où il n'existe pas de donneur HLA-compatible. Chez les receveurs pédiatriques, les greffes de sang de cordon donnent des résultats semblables aux allogreffes de moëlle. Chez l'adulte, le nombre critique de cellules souches et de progéniteurs n'est pas toujours atteint et les résultats dépendent avant tout de l'adéquation entre la richesse

du greffon et le poids du receveur.

Les greffons ombilicaux sont soumis à une série de tests comprenant un typage HLA, un contrôle bactériologique et virologique, une numération des cellules nucléées totales, une numération des cellules CD34+ par cytométrie de flux et une culture des progéniteurs clonogènes.

### La place des typages lymphocytaires dans le contrôle biologique des allogreffes

Les greffons de cellules souches, que ce soit de moëlle ou de sang périphérique, comprennent des quantités importantes de lymphocytes CD4+ et CD8+. Ceux-ci sont à l'origine d'effets néfastes et d'effets bénéfiques. Tout d'abord, ils provoquent la maladie du greffon contre l'hôte (graft-versus-host, GVH), complication redoutable des allogreffes. Celle-ci peut être prévenue par déplétion des lymphocytes ou par sélection des cellules CD34+ du greffon. Ces procédures permettent effectivement de réduire l'incidence de GVH lorsque la dose de lymphocytes infusés est inférieure à 105/kg. Par contre, l'incidence de rechute est accrue par perte de l'effet graft-versus-leukemia (GVL), élimination des cellules leucémiques par les lymphocytes du donneur. Ceci est la preuve a contrario de l'importance des réactions immunologiques dans le bénéfice des allogreffes, en particulier dans le contrôle des néoplasies hématologiques chroniques. Des développements importants sont à attendre pour tenter de dissocier l'effet GVH de l'effet GVL. Il semble que l'infusion de faibles doses ( $<108/\text{kg}$ ) de lymphocytes T allogéniques (donor lymphocyte infusion, DLI) puisse déclencher un effet GVL sans provoquer d'effet GVH. De plus, la déplétion spécifique des lymphocytes CD8+ présents dans une allogreffe permettrait de maintenir un effet GVL et de réduire l'incidence de GVH. La numération des différentes populations lymphocytaires représentées dans les greffons permet de mieux préciser l'importance de ces réactions immunologiques, et, si possible, d'établir des critères prédictifs de GVL ou de GVH.

### Conclusions

Le contrôle biologique des greffes de cellules souches s'est principalement intéressé à quantifier les cellules responsables de la régénération hématopoïétique du receveur et à apporter des critères prédictifs sur le succès de la greffe. Une standardisation accrue, aussi bien des techniques reposant sur la cytométrie en flux que sur les cultures cellulaires, est une préoccupation constante des centres de transplantations et des fabricants de réactifs et/ou d'équipement. Des développements importants sont à attendre dans le contrôle des réactions immunologiques accompagnant les allogreffes.