

TABLE DES MATIERES

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| LISTE DES ABREVIATIONS | 15 |
| LISTE DES FIGURES..... | 17 |
| LISTE DES TABLES | 18 |
| INTRODUCTION | 19 |
| 1 PROCESSUS DE PRODUCTION D'UN PRODUIT DE THÉRAPIE CELLULAIRE : LA GREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES.... | 22 |
| 1.1 Les différents types de greffes de cellules souches hématopoïétiques..... | 23 |
| 1.1.1 Les greffes de cellules souches hématopoïétiques autologues..... | 24 |
| 1.1.2 Les greffes de cellules souches hématopoïétiques allogéniques..... | 25 |
| 1.2 Collecte des cellules souches hématopoïétiques dans le sang périphérique : le principe de cytophérèse | 30 |
| 1.2.1 Les greffons d'origine périphérique constituent la source majoritairement utilisée..... | 30 |
| 1.2.2 La mobilisation des CSH dans le sang périphérique, un prérequis indispensable au prélèvement sanguin. | 32 |
| 1.2.3 Le principe de la cytophèrese : la séparation des composants du sang..... | 35 |
| 1.3 La composition du produit cellulaire prélevé a des conséquences sur les étapes ultérieures du processus. | 41 |
| 1.3.1 Composition en cellules CD34 positives et prise de greffe..... | 41 |
| 1.3.2 Cellules immunocompétentes du greffon | 42 |
| 1.3.3 Excès de PNN et Toxicité..... | 44 |
| 1.3.4 Erythrocytes et incompatibilité ABO..... | 46 |
| 2 CONTEXTE DE L'ETUDE..... | 47 |
| 3 MATERIELS ET METHODES..... | 51 |
| 3.1 L'étude | 52 |
| 3.2 Collecte des données | 52 |
| 3.3 Personnes prélevées..... | 53 |
| 3.4 Procédures d'aphérèse..... | 55 |
| 3.5 Détermination du nombre de cellules CD34+ | 57 |
| 3.6 Collection Efficiency..... | 58 |

| | | |
|-------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.7 | Analyse statistique | 59 |
| 4 | RESULTATS | 61 |
| 4.1 | La valeur médiane du CE et sa dispersion sont différentes en fonction du type de greffe..... | 62 |
| 4.2 | Le type de séparation et l'opérateur n'ont pas d'impact sur la valeur du CE..... | 63 |
| 4.3 | De nombreuses variables biologiques ont un effet sur la valeur du CE (résultats de l'analyse univariée) | 64 |
| 4.3.1 | Etude de la population générale | 64 |
| 4.3.2 | Etude des sous-populations « Allogénique » et « Autologue »..... | 66 |
| 4.4 | Les analyses multivariées confirment l'importance des paramètres biologiques comme principaux facteurs prédictifs de la valeur du CE | 68 |
| 4.4.1 | Le type de greffe n'est pas un facteur prédictif de la valeur du CE dans la population générale | 68 |
| 4.4.2 | Analyses en sous-groupes | 68 |
| 4.5 | Etude des prélèvements dont la valeur du CE est inférieure à 30% | 71 |
| | DISCUSSION | 75 |
| | CONCLUSION | 80 |
| | BIBLIOGRAPHIE | 82 |
| | ANNEXES | 94 |
| | SERMENT DE GALIEN | 99 |

LISTE DES ABREVIATIONS

| | |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
| AMM | Autorisation de mise sur le marché |
| ANSM | Agence nationale du médicament et des produits de santé |
| CD | <i>Cluster of differentiation</i> |
| CE | <i>Collection Efficiency</i> ou Efficacité de collecte |
| CMH | Complexe majeur d'histocompatibilité |
| CSH | Cellules souches hématopoïétiques |
| dL | Décilitre |
| DIP | Déficits immunitaires primitifs |
| EPO | Erythropoïétine |
| FITC | Isothiocyanate de fluorescéine |
| fL | Femt litre |
| G | Giga |
| g | Gramme |
| G-CSF | Facteur de croissance granulocytaire (<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>) |
| GH | Hormone de croissance recombinante |
| GVH | Réaction du greffon contre l'hôte (<i>Graft versus Host</i>) |
| GVL | Effet greffe contre leucémie (<i>Graft versus Leukemia</i>) |
| GVT | Effet greffe contre tumeur (<i>Graft versus Tumor</i>) |
| HLA | <i>Human Leukocyte Antigen</i> |
| IC | Intervalle de confiance |
| IMC | Indice de masse corporelle |
| IPC | Institut Paoli-Calmettes |
| L | Litre |
| LAM | Leucémie aigue myéloblastique |
| LAL | Leucémie aigue lymphoblastique |
| Log | Logarithme |
| µL | Microlitre |
| mL | Millilitre |
| MAI | Maladies auto-immunes |
| MTI | Médicaments de thérapie innovante |
| NFS | Numération formule sanguine |
| PE | Phyco-érythrine |
| PNB | Polynucléaires neutrophiles |
| PNE | Polynucléaires éosinophiles |
| PNN | Polynucléaires neutrophiles |
| PTH | Parathormone |
| PUI | Pharmacie à usage intérieur |
| SDF-1 | Facteur dérivé des cellules stromales-1 alpha |

| | |
|------------|---------------------------------------------|
| T | Tera |
| UBM | Unité de biostatistiques et de méthodologie |
| USP | Unité de sang placentaire |
| VIH | Virus de l'immunodéficience humaine |
| VGM | Volume globulaire moyen |

LISTE DES FIGURES

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Répartition des indications d'autogreffes en France en 2015 chez l'adulte. | 25 |
| Figure 2 : Arbre décisionnel d'un projet d'allogreffe. | 27 |
| Figure 3 : L'effet anti-leucémiques (GVL) et la maladie du greffon contre l'hôte (GVH), des acteurs moléculaires communs les rendant peu dissociables. | 29 |
| Figure 4 : Evolution au cours du temps de l'usage relatif des différents types de greffons hématopoïétiques pour les greffes de CSH allogéniques. | 31 |
| Figure 5 : La mobilisation des cellules souches hématopoïétiques par le G-CSF.. | 33 |
| Figure 6 : Séparation des composants du sang par centrifugation. | 36 |
| Figure 7 : Vitesse de centrifugation et efficacité de séparation. | 37 |
| Figure 8 : La chambre de centrifugation d'un séparateur de cellule. | 38 |
| Figure 9 : Illustration d'un port de collecte. | 38 |
| Figure 10 Comparaison entre le rendement en cellules nucléées totales post – décongélation et le taux initial de polynucléaires neutrophiles. | 44 |
| Figure 11 : Le contenu en polynucléaires dans le produit de cytophérèse est corrélé à la survenue d'effets indésirables post greffe chez le patient..... | 45 |
| Figure 12 : Répartition du type de greffe dans le groupe « Allogénique » et de l'indication de greffe dans le groupe « Autologue ». | 55 |
| Figure 13 : Distribution des valeurs du CE en fonction du type de greffe | 62 |
| Figure 14 : Distribution des valeurs du CE en fonction de l'opérateur..... | 64 |
| Figure 15 : Distribution des valeurs de CE en fonction du sexe. | 65 |
| Figure 16 : Proportion de prélèvement dont la valeur du CE est inférieure à 30% dans la population générale ainsi que dans les sous-population « Allogénique » et « Autologue ». | 72 |
| Figure 17 : Taux de cellules CD34+/ μ L de sang dans la population « Autologue » en fonction de l'efficacité de collecte. | 74 |

LISTE DES TABLES

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau I : Effets indésirables survenus post- autogreffe..... | 45 |
| Tableau II : Caractéristiques des personnes prélevées..... | 54 |
| Tableau III : Caractéristiques des prélèvements inclus dans l'étude..... | 57 |
| Tableau IV : Effets des variables étudiées sur la valeur du CE log-transformée par analyse univariée..... | 67 |
| Tableau V : Effet indépendant des facteurs de confusion évalué par analyse multivariée..... | 70 |
| Tableau VI : Caractéristiques des patients et des prélèvements dont le rendement de collecte est faible. | 73 |

Rapport-Gratuit.com

INTRODUCTION

La thérapie cellulaire consiste en l'administration de cellules vivantes à un individu afin de restaurer la fonction d'un tissu ou d'un organe. Elle implique des produits et des procédés utilisés pour trier, sélectionner ou modifier les cellules afin de leur conférer un effet thérapeutique. Parmi les nombreux types cellulaires potentiellement utilisables, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) constituent la forme de thérapie cellulaire la plus utilisée. En 2015, plus de 50 ans après les premiers essais cliniques, plus de 5 000 greffes de CSH ont ainsi été recensées en France par l'Agence de la Biomédecine, principalement dans le cadre du traitement de pathologies onco-hématologiques.

L'essor des thérapies cellulaires relève de nombreux enjeux en raison de leur nature biologique. Contrairement aux médicaments classiques, issus de produits de synthèse et dont les procédés nécessaires à leur fabrication sont capables d'un haut degré de reproductibilité, l'ensemble des étapes nécessaires à la mise à disposition d'un produit de thérapie cellulaire est soumis à de nombreux facteurs de variabilité pouvant largement compromettre l'efficacité, la sécurité et la qualité du produit final.

Parmi ces étapes, le prélèvement du produit biologique constitue un élément critique et primordial. De la capacité à prélever les cellules d'intérêt va dépendre la composition du greffon et, *in fine*, l'efficacité du produit administré au patient. Dans le cas de la greffe de CSH, les cellules sont principalement collectées au niveau périphérique grâce à un procédé de séparation des composants du sang appelé cytaphérèse. La qualité du prélèvement par cytaphérèse peut être évaluée par l'étude d'un paramètre appelé « efficacité de collecte ». Il correspond à la capacité du séparateur à collecter les cellules thérapeutiques d'intérêt contenues dans le compartiment sanguin.

Ce travail étudie ainsi l'ensemble des facteurs biologiques, matériels et opérationnels impactant l'efficacité de collecte des CSH, dans le cadre exclusif de la cytaphérèse. Cette étude rétrospective a été menée au sein du Centre de Thérapie Cellulaire et Génique de l'Institut Paoli-Calmettes (IPC) sur l'ensemble des actes de cytaphérèse réalisés au cours de l'année 2016.

Face aux promesses représentées par les thérapies cellulaires, il serait dommageable que ces dernières courent le risque de perdre une partie de leur crédibilité médicale et scientifique par négligence de leur qualité d'obtention. Dans une optique prospective, la finalité de ce travail – restreint aux CSH – pourra intégrer plus largement les produits dont la matière première est obtenue par cytophérèse comme les *CAR T-cells*, médicament de thérapie innovante (MTI) issu de l'ingénierie des lymphocytes T.

1 PROCESSUS DE PRODUCTION D'UN PRODUIT DE THÉRAPIE CELLULAIRE : LA GREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES

1.1 Les différents types de greffes de cellules souches hématopoïétiques.

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont des cellules multipotentes présentes dans la moelle osseuse chez l'Homme adulte. Ces cellules ont la possibilité de se différencier et de donner naissance à l'ensemble des éléments figurés du sang (hématies, leucocytes et plaquettes).

Les greffes de CSH sont utilisées pour des patients dont la moelle osseuse est détruite, endommagée ou dysfonctionnelle. Après transplantation par voie périphérique, les cellules progénitrices peuvent regagner le compartiment médullaire par leur capacité de « *homing* » et participer à la reconstitution hématologique du patient. Les premiers succès thérapeutiques ont été rapportés, chez l'Homme, à la fin des années 1950. Après irradiation corporelle totale, Thomas et *al* ont démontré que la transplantation de CSH prélevées chez un jumeau homozygote permettait de reconstituer le système hématologique du patient et, *in fine*, de prolonger sa durée de vie¹. En 1958, Georges Mathé réalise les premières greffes non apparentées de moelle osseuse chez des physiciens victimes d'un accident nucléaire en Yougoslavie; sur 6 patients greffés, 4 survivront².

En 2015, soit plus de quarante ans après les premiers essais cliniques, l'Agence de la biomédecine a recensé près de 5 000 greffes de CSH en France, principalement dans le cadre de pathologies onco-hématologiques³. Deux types de greffes sont distingués en fonction de la nature du donneur :

- les greffes autologues (le patient reçoit ses propres CSH) ;
- les greffes allogéniques (le patient reçoit des CSH d'un individu différent appelé donneur).

Selon ce même rapport, 61% des greffes étaient de nature autologue contre 39% de greffes allogéniques⁴.

1.1.1 Les greffes de cellules souches hématopoïétiques autologues

On parle de greffe autologue ou autogreffe lorsque les tissus ou cellules proviennent du « soi » ; le patient est donc son propre donneur.

L'indication principale des autogreffes est la reconstitution hématologique du patient suite à l'administration de chimiothérapie(s) à haute dose (ou intensification thérapeutique). Ces chimiothérapies utilisent un ou une combinaison d'agents cytotoxiques, tels que les alkylants (cyclophosphamide, alkéran, busulfan, thiotépa...), dont la principale toxicité est hématologique (myélotoxicité). Effet indésirable redouté de ces traitements intensifs, la destruction prolongée de la moelle osseuse est à l'origine d'un risque infectieux, anémique et hémorragique. En vue de palier à ce risque d'aplasie et à la forte morbi-mortalité qui lui est associée, les traitements de chimiothérapie haute dose sont associés à une autogreffe de CSH ; la greffe joue alors le rôle de support de l'hématopoïèse. Concrètement, chez un patient où une intensification thérapeutique est envisagée, les CSH sont prélevées en amont du traitement, au moment où la pathologie est la moins active, puis conservées par cryopréservation^a. En aval de la chimiothérapie haute dose, d'usage après un délai de 48 heures, les CSH sont décongelées, lavées et administrées au patient.

Les autogreffes de CSH sont principalement indiquées en onco-hématologie. En 2015, en France, 93,6% des autogreffes ont été réalisées pour des hémopathies malignes, les myélomes et les lymphomes représentant respectivement 52,4% et 41,9% des indications (Figure 1). L'utilisation des autogreffes dans le cadre des tumeurs solides reste marginale (6,1% des autogreffes totales). Le neuroblastome, les autres tumeurs du système nerveux et les tumeurs germinales (ovaires et testicules) en sont les principales indications chez l'adulte. Enfin, une part minime des autogreffes (0,3%) est réalisée dans le cadre des maladies auto-immunes (MAI) telle que la sclérose en plaque, la sclérodermie systémique ou encore la maladie de Crohn. Chez l'enfant, ce sont les tumeurs solides telles que le neuroblastome, le néphroblastome ou les tumeurs osseuses (sarcome d'Ewing) qui constituent les indications principales des autogreffes.

^a La cryopréservation consiste à congeler un greffon cellulaire, par baisse progressive et contrôlée de la température. Cette technique est utilisée de manière systématique dans le cas des greffes autologues.

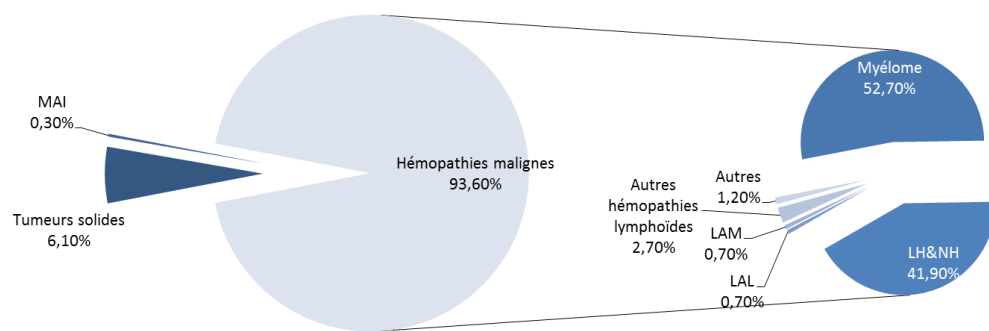


Figure 1 : Répartition des indications d'autogreffes en France en 2015 chez l'adulte.

Source : Rapport médical et scientifique de l'Agence de la biomédecine 2015 [LAL : leucémie aigue lymphoïde ; LAM : leucémie aigue myéloïde ; LH&NH : lymphome hogdkignien et non hogdkignien] (disponible sur www.agence-biomedecine.fr).

Les greffes autologues constituent les greffes de CSH les plus utilisées en France. La morbi-mortalité associée est faible ; peu d'effets indésirables imputables à l'autogreffe sont recensés et la mortalité est inférieure à 5%⁵. Les cellules provenant du patient lui-même, le risque de réaction immunologique ou de rejet de greffe est nul. Une des principales complications est le risque de rechute post greffe lié à la présence des cellules tumorales résiduelles chez le patient en dépit d'un traitement de chimiothérapie adéquat.

1.1.2 Les greffes de cellules souches hématopoïétiques allogéniques

Les greffes allogéniques désignent des greffes pour lesquelles le donneur et le receveur sont des personnes différentes. On parle de greffes apparentées lorsque le donneur et le receveur sont issus de la même famille et de greffes non apparentées dans le cas contraire. Le donneur est alors un donneur volontaire, extra-familial, enregistré sur les fichiers nationaux qui sont interconnectés afin de permettre la recherche d'un donneur international lorsque cela est nécessaire.

Les greffes allogéniques sont basées sur un principe de compatibilité immunologique entre donneur et receveur en ce qui concerne les molécules du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité ou HLA pour *Human Leukocyte Antigen*) :

c'est l'histocompatibilité. Ces molécules sont exprimées à la surface des cellules nucléées (CMH de classe I) ou des cellules présentatrices d'antigène (CMH de classe II) et participent à l'activation du système immunitaire⁶. Elles ont un rôle unique dans la reconnaissance du « soi », du « non soi » et dans l'initiation de la réponse immune, par présentation de peptides aux lymphocytes T.

Le système HLA, constitué de plus de 200 gènes et de 14 000 allèles portés au niveau du bras court du chromosome 6, est très polymorphe⁷. L'histocompatibilité des greffes allogéniques est basée sur l'étude de 5 gènes : HLA-A, B, C pour le CMH de classe I, DQ et DR pour le CMH de classe II. Pour chaque gène, un individu possède deux allèles exprimés en codominance ou haplotype. Lorsque les deux allèles de chaque gène sont identiques, on parle de compatibilité 10/10.

On distingue ainsi trois types de greffes allogéniques, classées ci-dessous par ordre d'intention :

- **les greffes géno-identiques** : ce sont des greffes intrafamiliales (10/10 ou 9/10). La transmission du CMH est mendélienne ; chaque enfant hérite d'un haplotype maternel et d'un haplotype paternel. Il en advient que parents et enfants ne peuvent être géno-identiques et que la probabilité de compatibilité entre un patient et sa fratrie est systématiquement de 25%. Dans le cas particulier des jumeaux homozygotes, on parle de greffe syngénique qui s'apparente alors à une autogreffe.
- **les greffes phéno-identiques** : elles sont réalisées en l'absence de donneur intrafamilial. Un donneur est alors recherché parmi les 200 000 donneurs recensés sur les registres nationaux et près de 14 millions dans les registres internationaux. Il est à noter que bien que le système HLA soit très polymorphe et que chaque individu possède un système qui lui est propre, la fréquence des gènes HLA est dépendante de l'origine géographique de l'individu⁸. Prendre en compte l'origine ethnique du patient et de la personne prélevée permet ainsi d'accroître la probabilité de trouver un donneur compatible⁹.

- les greffes haplo-identiques : ce sont des greffes intrafamiliales pour lesquelles il existe une compatibilité pour un seul haplotype (greffe 5/10). Chaque membre de la famille a 50% de chance de partager un haplotype avec le patient¹⁰. Les parents, les enfants, les frères et sœurs non géno-identiques mais également les cousins germains deviennent alors des donneurs potentiels.

En règle générale, la stratégie thérapeutique d'allogreffe de CSH repose sur un arbre décisionnel qui place le donneur HLA compatible comme tout premier choix. Ce n'est que s'il ne peut disposer d'un tel donneur, que le clinicien s'oriente vers une source alternative (Figure 2)¹¹. Ces standards évoluent aujourd'hui en particulier avec le repositionnement des greffes haplo-identiques. Elles sont de plus en plus utilisées compte-tenu :

- d'une réponse réelle en terme de recherche de donneur ;
- de la généralisation de cette pratique par administration de cyclophosphamide (ENDOXAN®) post-greffe ;
- de nombreuses preuves cliniques de leur tolérance et leur efficacité.

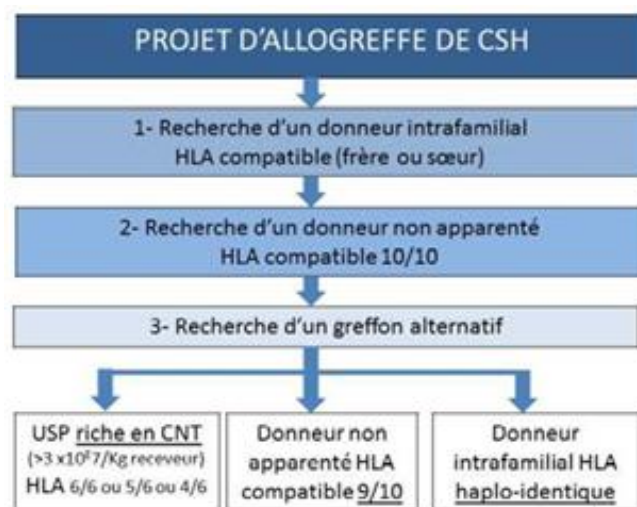


Figure 2 : Arbre décisionnel d'un projet d'allogreffe.

Source : plan greffe 2017-2021¹¹. [CNT : cellules nucléées totales ; USP: unité de sang placentaire].

En France en 2015, 53,2% des allogreffes réalisées étaient des greffes non apparentées, 32,2% des greffes géno-identiques, et 14,3% des greffes haplo-identiques (0,3% des greffes n'étant pas renseignées).

Au même titre que les autogreffes, les allogreffes participent à la reconstitution du système hématologique du receveur. Mais, à la différence des greffes autologues, les allogreffes disposent de propriétés justifiant leur utilisation comme immunothérapie cellulaire. En effet, les cellules immunocompétentes du greffon, en particulier les lymphocytes T et les cellules NK, exercent une activité anti-tumorale nommée effet « greffe contre leucémie » (GVL ou *Graft versus Leukemia*) ou « greffe contre tumeur » (GVT ou *Graft versus Tumor*)¹². Barnes a été le premier à démontrer, en 1956, dans un modèle murin, l'action anti-leucémique d'une moelle allogénique transplantée comme effet contributif à l'éradication de la maladie. En 1965, Mathé confirmera ces travaux chez des patients atteints de leucémie¹³. Cet effet GVL a été redémontré par de multiples observations chez l'Homme et justifie, à lui seul, l'indication de l'allogreffe dans de nombreuses pathologies malignes^{14,15}.

Tous types de compatibilité HLA confondus, les greffes allogéniques constituent le traitement de choix des hémopathies malignes (plus de 90% des indications) telles que la leucémie aigue myéloblastique (LAM), la myélodysplasie et la leucémie aigue lymphoblastique (LAL) (respectivement 34,1%, 15,4% et 13,4% des allogreffes en 2015). L'allogreffe est également indiquée dans les tumeurs solides, les formes graves d'hémoglobinoopathies (thalassémie, drépanocytose), les déficits immunitaires primitifs (DIP) ou les MAI.

En pratique clinique, l'effet GVL, anti-tumoral et bénéfique est difficile à dissocier d'un effet toxique, la réaction du greffon contre l'hôte ou GVH (*Graft versus Host*). La GVH traduit un problème de tolérance immunologique vis à vis de fragments peptidiques indépendants du système HLA, les gènes mineurs d'histocompatibilité, exprimés par de nombreux tissus sains. Ainsi, en cas de GVH, de nombreux organes peuvent être atteints, de façon aigue ou chronique, d'intensité modérée à sévère. Les atteintes les plus fréquemment retrouvées sont cutanées, digestives, pulmonaires et hépatiques¹².

La GVH est une complication fréquente, responsable de 15 à 40 % de mortalité au cours du premier trimestre suivant la prise de greffe et d'une importante morbidité, celle-ci pouvant atteindre 50%. Dissocier GVL et GVH apparaît primordial afin de garantir l'efficacité anti-tumorale de la greffe tout en garantissant un faible niveau de

toxicité. La situation idéale en hématologie correspondrait ainsi à cibler les antigènes ayant une expression restreinte aux cellules de la lignée hématopoïétique ou tumorale, limitant ainsi les risques de réaction immune dirigée contre les tissus sains (Figure 3)¹⁶.

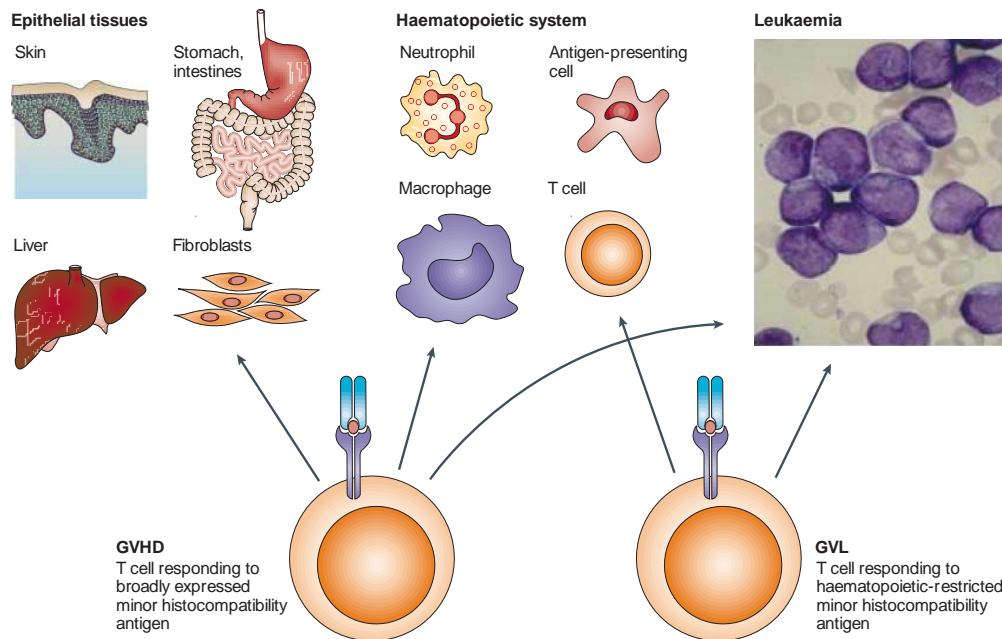


Figure 3 : L'effet anti-leucémiques (GVL) et la maladie du greffon contre l'hôte (GVH), des acteurs moléculaires communs les rendant peu dissociables.

Les lymphocytes T du donneur reconnaissent les antigènes mineurs d'histocompatibilité à l'origine d'une action cytotoxique envers les cellules tumorales mais également les cellules épithéliales des tissus sains. D'après Bleakley and Riddell¹². [Antigen-presenting cell : cellules présentatrices d'antigène ; Epithelial tissues : tissu épithélial ; Fibroblasts : fibroblastes ; GVHD : Maladie du greffon contre l'hôte ; Haematopoietic system : système hématopoïétique ; Intestines : intestin ; Leukemia : leucémie ; Liver : foie ; Neutrophil : PNN ; Skin : peau ; Stomach : Estomac ; T-cell ; lymphocyte T].

Outre ces principaux effets secondaires immunologiques, les infections représentent également des effets indésirables fréquents des allogreffes mais leur prise en charge est globalement mieux maîtrisée par antibiothérapie préventive. Enfin, les rejets de greffe de CSH sont particulièrement rares en raison de l'immunodépression profonde et préalable du patient par chimiothérapie.

1.2 Collecte des cellules souches hématopoïétiques dans le sang périphérique : le principe de cytaphérèse

1.2.1 Les greffons d'origine périphérique constituent la source majoritairement utilisée.

Il existe trois sources de CSH à l'origine de la constitution du greffon : la moelle osseuse, le sang périphérique et le sang de cordon ombilical. Le recours relatif à chacun de ces greffons a évolué au cours des dix dernières années, en parallèle des nombreuses découvertes scientifiques et notamment de la mise au point d'agents mobilisateurs.

Source historique de CSH, la moelle osseuse, située au centre des os (sternum, vertèbres, os iliaques, épiphyse des os longs), est prélevée en conditions opératoires, sous anesthésie générale, par insertion d'un trocart au niveau des crêtes iliaques postérieures. Aujourd'hui, la source médullaire reste utilisée dans les greffes allogéniques, notamment lorsque le receveur présente des risques accrus de GVH, pour des maladies non malignes où l'absence d'intérêt à un effet GVL ou GVT ne justifie pas le risque de GVH et dans les indications pédiatriques (Figure 4). En revanche, la part de greffons de moelle osseuse dans les greffes autologues adultes est aujourd'hui devenue négligeable.

Au niveau périphérique, les populations de CSH sont largement minoritaires (0,06% des cellules circulantes). Une faible augmentation de leur concentration sanguine peut être reliée au rythme circadien, bien qu'aucune cause évidente n'explique ce phénomène^{17,18}. Cette proportion cellulaire extrêmement faible rend inenvisageable leur collecte par prélèvement sanguin. L'avancée des connaissances en biologie cellulaire a permis de mettre en évidence que, sous l'action d'agents thérapeutiques, les CSH peuvent être « mobilisées » de la moelle osseuse vers le sang périphérique. Ainsi, la concentration des CSH au niveau périphérique augmente, et leur collecte peut s'effectuer par prélèvement sanguin : c'est la cytaphérèse.

L'essor de cette technique thérapeutique est plurifactoriel : développement général des techniques d'aphérèse pour des applications thérapeutiques variées, facilité du prélèvement périphérique, confort du patient, plus grande rapidité de prise de greffe

(en particulier pour les neutrophiles et les plaquettes) et diminution consécutive des risques liés à l'aplasie, diminution des coûts associés au traitement, moindre mobilisation des ressources hospitalières (difficulté d'accès aux blocs opératoires)^{19,20}. Ainsi, en 2015, 99.9% des greffes autologues et 67% des greffes allogéniques ont font appel à des CSH prélevées au niveau périphérique (Figure 4)⁴. Son recours plus restreint dans le cas des greffes allogéniques s'explique par la plus grande complexité des conséquences immunologiques de l'administration d'un grand nombre d'effecteurs immuns présents au niveau périphérique mais également par le recours à un troisième type de greffe, le sang placentaire.

Le sang placentaire, prélevé au niveau du cordon ombilical dans les suites de l'accouchement, constitue une dernière source de CSH. Faiblement riche en ces cellules d'intérêt ($0,2 \times 10^6$ CD34+/kg), le sang placentaire présente comme principal avantage l'immaturité immunologique des effecteurs immuns du greffon, permettant de sélectionner une unité de sang placentaire (USP) partiellement HLA compatible. Ce type de greffe est indiqué chez l'enfant comme chez l'adulte. D'un point de vue éthique, le sang placentaire ne peut faire l'objet que d'un don et ne peut être utilisé dans un cadre autologue en France²¹.

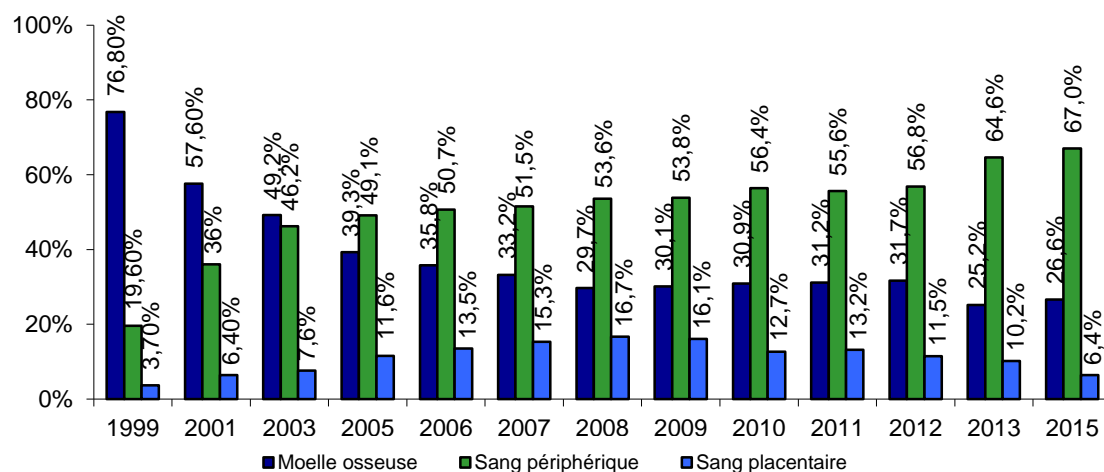


Figure 4 : Evolution au cours du temps de l'usage relatif des différents types de greffons hématopoïétiques pour les greffes de CSH allogéniques.

Source : rapports annuels de l'Agence de la biomédecine et Chabannon et al^{3,4}.

1.2.2 La mobilisation des CSH dans le sang périphérique, un prérequis indispensable au prélèvement sanguin.

Le terme de « mobilisation » est classiquement utilisé pour désigner le phénomène par lequel les CSH quittent transitoirement le compartiment médullaire pour circuler dans le compartiment sanguin³.

Acteurs moléculaires de la mobilisation.

Les CSH sont localisées au sein de niches hématopoïétiques endostéales (à proximité de l'os) ou vasculaires. En réponse à des situations de stress, des dommages tissulaires mais également dans les situations d'exercice physique, ces cellules quittent les niches médullaires et sont retrouvées au niveau périphérique²²⁻²⁵. La moelle osseuse n'est donc pas une résidence statique pour les CSH mais un organe dynamique capable de mobiliser ces cellules en fonction des besoins de l'organisme³.

La mobilisation des CSH est sous le contrôle de nombreuses interactions moléculaires. L'interaction entre SDF-1 et son récepteur CXCR-4 joue un rôle central dans ce phénomène et en a fait un cible intéressante pour le développement d'agents pharmacologiques³. La chimiokine SDF-1 (facteur dérivé des cellules stromales-1 alpha ou CXCL12) est sécrétée par les cellules stromales de la moelle osseuse. Elle se lie à son récepteur, CXCR-4, exprimé à la surface des CSH. L'interaction entre ces deux acteurs moléculaires séquestre les CSH dans le compartiment médullaire. En revanche, en cas de rupture de cet équilibre, les CSH franchissent la barrière endothéliale des sinusoides médullaires et rejoignent le compartiment sanguin (Figure 5).

Le G-CSF, gold standard pour la mobilisation des CSH.

Le premier agent thérapeutique ayant obtenu une Autorisation de mise sur le marché (AMM) dans la mobilisation des CSH est le facteur de croissance granulocytaire ou G-CSF (*Granulocyte-colony stimulating factor*). Cette glycoprotéine de 18,6 kDa composée de 174 acides aminés est sécrétée, dans sa forme endogène, par les cellules endothéliales, les macrophages et les fibroblastes et stimule

la différenciation, la prolifération et la maturation de la lignée granulocytaire. Sous son action, les précurseurs neutrophiles s'accumulent dans la moelle osseuse et sécrètent une grande quantité d'élastase, une enzyme exerçant une activité protéolytique sur SDF-1²⁶. La liaison SDF-1-CXCR4 est fragilisée, les CSH sont mobilisées dans le compartiment sanguin (Figure 5).

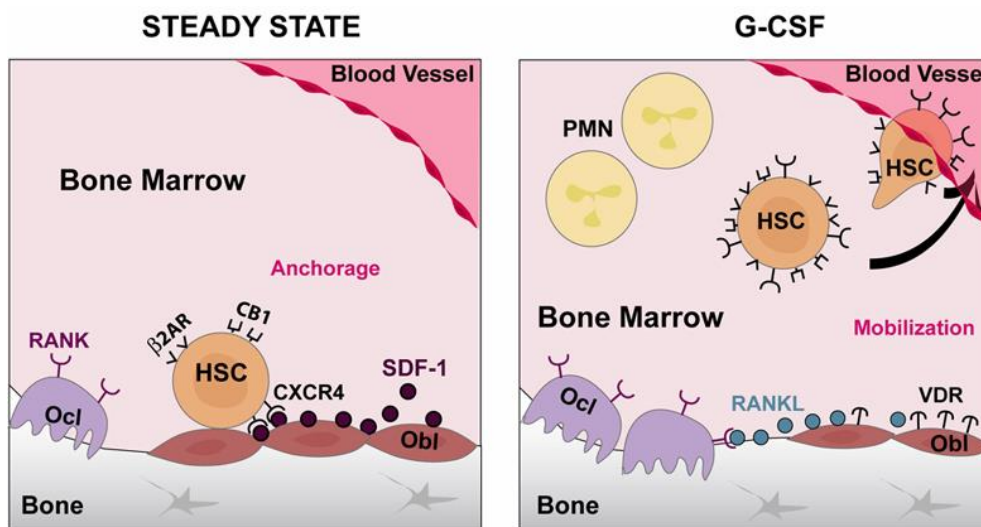


Figure 5 : La mobilisation des cellules souches hématopoïétiques par le G-CSF.

A l'état basal, les CSH sont séquestrées dans la moelle osseuse via une interaction CXCR4/SDF-1. Le G-CSF favorise la prolifération de la lignée granuleuse dans la moelle osseuse à l'origine de la rupture de la liaison CXCR4/SDF-1. Les CSH peuvent alors franchir la barrière endothéliale et rejoindre le compartiment sanguin²⁷. [Anchorage : ancrage ; Bone marrow : moelle osseuse ; Blood Vessel : vaisseau sanguin ; Mobilization : mobilisation ; PMN : polynucléaires neutrophiles ; Steady state : état basal].

D'un point de vue clinique, le G-CSF est utilisé sous une forme recombinante (rh-G-CSF), sous forme non glycosylée (filgrastim NEUPOGEN[®] mais également les biosimilaires^b NIVESTIM[®], TEVAGRASTIM[®], ZARZIO[®]) ou sous forme glycosylée (lénograstim, GRANOCYTE[®]). Il constitue le traitement de première intention pour la mobilisation des CSH dans le sang circulant chez les donneurs sains en vue d'une greffe allogénique (10 µg/kg/jour par voie sous-cutanée pendant 4 à 5 jours). Les effets indésirables les plus fréquents sont les céphalées et les douleurs osseuses, dont la survenue peut être anticipée par l'administration préventive de

^b Un médicament biosimilaire est similaire à un médicament biologique de référence qui a déjà été autorisé en Europe. Ce principe s'applique à tout médicament biologique dont le brevet est tombé dans le domaine public. D'après www.ansm.sante.fr

paracétamol, ainsi que les hyperleucocytoses. En cas de greffe autologue, le G-CSF peut être utilisé seul (10 µg/kg/jour par voie sous-cutanée pendant 4 à 6 jours) ou en association à une chimiothérapie (5 µg/kg/jour à partir de la fin de la chimiothérapie). Sur le plan moléculaire, l'administration d'une chimiothérapie préalablement à la mobilisation par G-CSF induit, au sein de la niche médullaire, un environnement hautement protéolytique à l'origine de la fragilisation de l'axe SDF-1/ CXCR-4. Son action se potentialise à celle du G-CSF conduisant à la migration des cellules et à l'optimisation de leur collecte ultérieure²⁸.

D'autres cytokines (GM-CSF ou SCF) mais également l'hormone de croissance recombinante (GH) et la parathormone (PTH) ont été proposées comme alternatives potentielles au G-CSF. Cependant, face à l'absence de supériorité thérapeutique au G-CSF, voire à la survenue d'effets indésirables sévères, ils n'ont pu constituer de réelles alternatives au traitement par G-CSF³.

Ajout de plerixafor pour les patients mauvais mobilisateurs.

15 à 30% des patients et pas plus de 2% des donneurs sains ne répondent pas au traitement par G-CSF : en dépit d'une posologie adaptée, le taux de CSH circulantes n'atteint pas une valeur compatible avec un prélèvement de qualité. Dans le cas des greffes autologues exclusivement, une co-administration G-CSF et plerixafor, MOZOBIL[®] peut alors être proposée au patient.

Le plerixafor est un antagoniste spécifique du récepteur CXCR-4. Indiqué initialement dans le traitement de l'infection acquise par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), son développement a été arrêté en raison de l'hyperleucocytose associée à l'administration chronique de cette molécule. De cet effet indésirable est née la possibilité d'utiliser le plerixafor comme agent de mobilisation. Injecté par voie sous-cutanée, il permet une mobilisation substantielle des CSH.

En raison de son coût élevé (5 482 euros hors taxes)²⁹, le plerixafor voit son AMM restreinte à la « *mobilisation des CSH dans le sang périphérique en association avec le G-CSF chez les patients atteints de lymphome ou de myélome dont les cellules*

se mobilisent mal »³⁰. La dose recommandée est de 0,24 mg/kg/jour, administrée 6 à 11 heures avant le début de la cytophérèse après 4 jours de traitement préalable par G-CSF.

Des valeurs seuils permettant d'obtenir un prélèvement de qualité.

Suite à l'administration d'agent mobilisateur selon des protocoles définis, un prélèvement sanguin est réalisé en vue de déterminer l'état de mobilisation de la personne prélevée. Chez le patient, un dosage des CSH périphériques pré-cytophérèse conditionnera le début de l'acte de prélèvement³¹⁻³³. En revanche, chez le donneur sain, le prélèvement débutera systématiquement quatre à cinq jours après le début du traitement de mobilisation ; le dosage des CSH s'effectuera alors en début d'acte de prélèvement afin de s'assurer qu'il n'y pas eu de défaut de mobilisation³³.

La quantité de CSH présentes au niveau périphérique est déterminé par détection du marqueur CD34 exprimé à la surface de ces cellules^{34,35}. Dans la suite de ce manuscrit, le terme de CSH sera ainsi confondu avec la dénomination de cellules CD34 positives (CD34+). En règle générale, un nombre minimal de 10 CD34+/ μ L de sang périphérique conditionne la faisabilité du bon recueil de CSH par cytophérèse³⁶.

1.2.3 Le principe de la cytophérèse : la séparation des composants du sang.

La cytophérèse est une procédure médicale consistant à séparer les divers composants du sang périphérique afin d'en extraire une population d'intérêt. Cette dernière est collectée au sein d'une poche de prélèvement tandis que les autres éléments du sang sont restitués à la personne prélevée.

La cytophérèse est un terme générique regroupant plusieurs techniques en fonction du type d'élément collecté (leucocytes, érythrocytes, plaquettes). Deux objectifs peuvent être distingués : la soustraction d'un élément pathologique ou la collecte de cellules thérapeutiques. Le premier objectif est illustré par la déplétion leucocytaire, la thrombocytophérèse, l'érythrocytophérèse, les échanges plasmatiques et l'aphérèse des LDL (lipoprotéines de faible densité). Ces procédures d'aphérèse

thérapeutique visent respectivement à diminuer la charge sanguine en leucocytes (en cas d'hyperleucocytose et de leucostase), en plaquettes, en érythrocytes (en cas de syndrome d'hyperviscosité sanguine), en auto-anticorps et allo-anticorps ou encore en cholestérol plasmatique³⁷. Le second objectif vise à collecter une population cellulaire d'intérêt ; c'est le cas du don par aphérèse et du recueil de CSH.

Principes physiques de séparation des composants du sang.

Deux techniques de séparation peuvent être utilisées en cytophérèse : la filtration sur membrane et la centrifugation. La filtration sur membrane permet d'isoler les protéines de haut poids moléculaire et d'obtenir un plasma acellulaire. Elle est principalement utilisée sur les appareils de dialyse ou d'hémofiltration. La centrifugation, quant à elle, permet de séparer les éléments sanguins en fonction de leur densité. Utilisée pour le recueil de CSH, seule cette technique sera développée dans cette partie.

Sous l'action de la force centrifuge, les composants du sang vont se concentrer au sein de différentes couches. Concrètement, le plasma, dépourvu d'éléments figurés du sang constituera la couche supérieure tandis que les éléments cellulaires composeront les couches inférieures. Si l'on considère le système comme un anneau, comme représenté dans la figure 6, le plasma se retrouve sur la face interne de l'axe de rotation et les éléments cellulaires, plus denses, seront présents du côté externe.

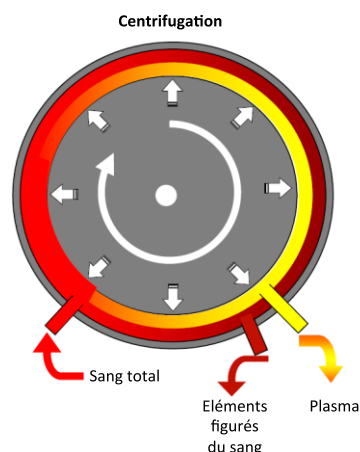


Figure 6 : Séparation des composants du sang par centrifugation.

D'après une présentation orale de Uwe H.Wallstab à l'IFSA en 2015. Sous l'effet de la centrifugation, le plasma, acellulaire, constituera la couche interne de l'anneau tandis que les éléments cellulaires constitueront les couches externes.

De la vitesse de centrifugation dépendra l'efficacité de séparation des différents éléments figurés du sang³⁸. Ainsi, lorsque la force de centrifugation augmente, les globules rouges, éléments les plus denses, vont constituer la couche la plus externe de l'anneau de centrifugation. Entre plasma et globules rouges, se forme alors une interface composée de cellules mononucléées (lymphocytes et monocytes), de polynucléaires et de plaquettes. Cette couche cellulaire est appelée couche leucocytaire ou « *buffy coat* » ou couche leuco-plaquettaire lorsque les plaquettes y sont associées (Figure 7).

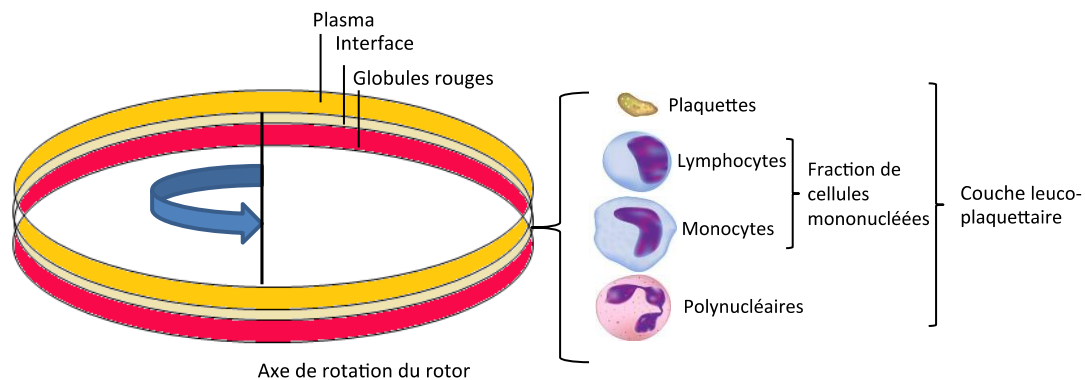


Figure 7 : Vitesse de centrifugation et efficacité de séparation.

L'augmentation de la vitesse de centrifugation permet de discriminer les différents éléments figurés du sang. Les érythrocytes, très denses, constituent la couche la plus externe. Entre érythrocytes et plasma, une interface se forme composée de cellules mononucléées, de plaquettes et de polynucléaires.

Principes de la cytaphérèse appliquée au recueil des CSH.

La collecte des CSH par cytaphérèse s'effectue par une circulation extracorporelle de sang (dont le volume est compris entre 150 et 350mL) au sein d'un dispositif médical stérile à usage unique. La méthode privilégiée pour l'accès veineux est la mise en place d'un cathéter périphérique, placé en général au niveau des membres supérieurs et dans de très rares cas au niveau fémoral. En cas d'accès veineux difficile, la mise en place d'un accès veineux central peut alors être requise. Par ce cathéter, la personne prélevée est reliée à l'appareil de cytaphérèse. Un système de pompes permet d'amorcer le sang dans le dispositif stérile à usage unique et de maintenir un débit sanguin régulier au cours de la collecte.

Le dispositif stérile à usage unique est composé d'un anneau de centrifugation. Il est inséré au sein d'une centrifugeuse dont la vitesse est maîtrisée et constante. L'ensemble est disposé au sein de la chambre de centrifugation de l'appareil de cytophérèse. Le système décrit est illustré au travers des photographies de la figure 8.

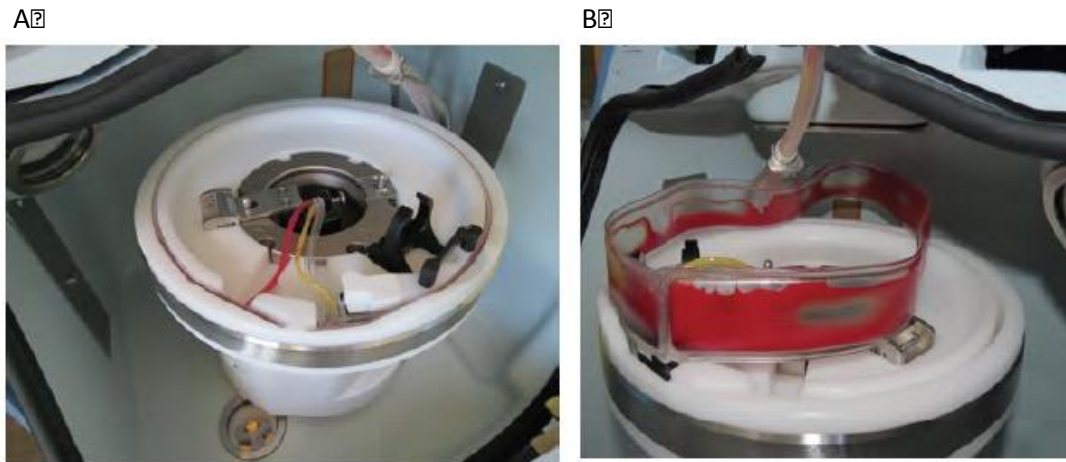


Figure 8 : La chambre de centrifugation d'un séparateur de cellule.

A : La centrifugeuse et son plateau dans lequel est déposé l'anneau de centrifugation. B : Le sang total est fractionné au sein de l'anneau de centrifugation.

Sous l'effet de la centrifugation, les CSH vont être distribuées au sein de la fraction de cellules mononuclées. A l'extrémité de l'anneau, un port de collecte permet d'isoler cette couche cellulaire d'intérêt et de la collecter au sein d'une poche de prélèvement. Les autres éléments du sang (globules rouges, plasma) sont, quant à eux, restitués à la personne prélevée (Figure 9).

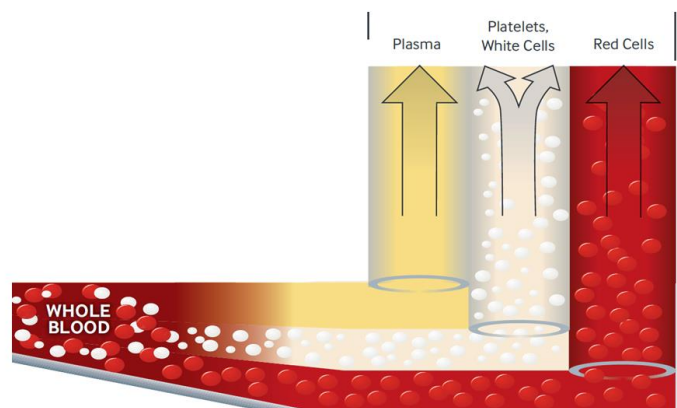


Figure 9 : Illustration d'un port de collecte.

Le port de collecte permet de prélever les différents composants du sang, séparés par cytophérèse. Dans le cas de la greffe de CSH, la fraction de cellules mononuclées sera collectée tandis que les autres composants seront re-administrés au patient.

Habituellement trois « masses » sanguines sont traitées (correspondant à 3 volumes corporels sanguins du patient) et la procédure totale dure 2 à 5 heures. On considère en général qu'il faut une heure et trente minutes pour collecter l'équivalent d'un volume sanguin.

La mortalité associée à cette pratique médicale est très faible, de l'ordre de 1,72 décès pour 10 000 actes et les morbidités sont peu nombreuses³⁹. La complication la plus fréquente est associée à l'administration de citrate, un anticoagulant utilisé pour limiter le risque de coagulation pendant le processus de cytophérèse. Bien qu'injecté dans le système, une faible quantité du produit peut parvenir au donneur. Par liaison au calcium sérique ionisé, sa toxicité se manifeste par une hypocalcémie à l'origine de dysesthésies, des nausées et des trémulations au niveau de la bouche, des mains et des pieds. Ces effets peuvent être corrigés par une supplémentation en Calcium au cours de la cytophérèse⁴⁰. Les effets indésirables propres à l'acte de cytophérèse incluent la thrombocytopénie et l'activation plaquettaire. Des complications de l'abord veineux (occlusions, hémorragies sur cathéter central ou très rarement infections) peuvent également être observées.

Différents types de séparateurs.

Contrairement aux premiers séparateurs utilisés pendant plus de 30 ans, les séparateurs actuels sont totalement automatisés. Les précédents séparateurs nécessitaient une surveillance optique voire une intervention manuelle d'un opérateur infirmier qualifié afin de s'assurer de la bonne collection des cellules d'intérêt. En fonction du flux sanguin du patient, la hauteur du port de collecte devait être réglée en permanence afin de prélever la couche de cellules mononuclées⁴¹. La qualité du matériel collecté était ainsi très fortement dépendante de l'expérience de l'opérateur, de sa capacité à visualiser les différentes interfaces et de régler les paramètres du séparateur⁴².

Afin de répondre aux biais opérateur-dépendants, un nouveau système a été développé où l'ensemble des étapes précédemment citées est réalisé de manière automatique. Des systèmes informatisés, basés sur des capteurs optiques et des ajustements du flux sanguin permettent de contrôler l'interface entre globules rouges

et plasma et de prélever la couche de cellules mononuclées. La fonctionnalité et la reproductibilité des séparateurs automatiques étant désormais reconnues, ils sont les seuls à être utilisés dans les centres de cytophérèse tant pour les prélèvements de greffons autologues qu' allogéniques⁴¹⁻⁴⁴.

Ces séparateurs fonctionnent selon deux principes distincts : une collecte discontinue ou continue des cellules mononuclées. Le système en flux discontinu traite le sang total de façon séquentielle. Pendant la centrifugation, la fraction de cellules mononuclées ainsi que les plaquettes sont collectées dans une chambre intermédiaire. Au sein de cette chambre, les différents éléments de la fraction prélevée vont être séparés par élutriation, une technique de purification basée sur la vitesse des cellules (rapport taille/densité). En particulier, les plaquettes vont être éluées de la chambre et réinjectées à la personne prélevée⁴². Les leucocytes, quant à eux, sont retenus dans la chambre. Dans un second temps, le contenu de la chambre de collecte intermédiaire est récolté dans la poche de collecte finale.

Dans le système en continu, la séparation plasmatique et la collection du greffon se font indépendamment d'une chambre intermédiaire de collecte. A concentration équivalente en cellules CD34+, le temps de la procédure et le volume sanguin traité sont significativement plus faibles que pour les systèmes discontinus^{45,46}. D'un point de vue biologique, le produit collecté contient significativement plus de leucocytes, de lymphocytes et de cellules mononuclées dans le système continu que dans le système discontinu. La déplétion plaquettaire est comparable^{45,46}. Enfin, aucune différence significative n'a été observée sur la collecte des cellules CD34 + quel que soit le système utilisé^{46,47}. La performance des machines est donc comparable et il n'est pas documenté la non-infériorité d'un système par rapport à l'autre.

A la fin du processus de cytophérèse, un volume d'environ 200mL de sang périphérique concentré en CSH est collecté. Le greffon est ensuite transféré dans les meilleurs délais en unité de thérapie cellulaire sous couvert d'une identification stricte, d'une traçabilité et d'une sécurité (tubulures scellées, emballage rigide et isotherme)⁴⁸.

1.3 La composition du produit cellulaire prélevé a des conséquences sur les étapes ultérieures du processus.

La composition du produit cellulaire collecté par cytophérèse est dépendante de facteurs inhérents à la personne prélevée et à l'acte de prélèvement. Comme illustré dans la partie précédente, les CSH sont présentes dans la couche de cellules mononuclées. La proportion de lymphocytes, de monocytes et de CSH au sein de cette fraction cellulaire est variable en fonction des conditions physiopathologiques (syndrome inflammatoire, protéine monoclonale, pathologie tumorale...) du patient ou du donneur. De même, en fonction de la qualité de l'acte de cytophérèse, les couches cellulaires bordant la couche d'intérêt peuvent être prélevées, modifiant la composition globale du greffon.

L'association de ces paramètres liés au patient et au prélèvement conditionne la qualité du greffon et le pronostic post-greffe. Au sein du laboratoire de thérapie cellulaire, la représentativité des différents éléments cellulaires contenus dans le greffon est évaluée par numération formule sanguine (NFS) et par cytométrie en flux et des techniques de centrifugation ou de lavages peuvent être réalisées en vue de diminuer la part relative de certains éléments cellulaires (en particulier pour les érythrocytes). Pour autant, ces manipulations du greffon restent minimales, non substantielles, et ne peuvent s'affranchir d'un prélèvement de qualité réalisé dans des conditions optimales.

1.3.1 Composition en cellules CD34 positives et prise de greffe

La composition du greffon en cellules CD34⁺ est l'un des paramètres gouvernant le succès de la greffe.

Pour autant, il n'existe pas de consensus concernant le nombre de cellules CD34⁺ à injecter au patient lors d'une greffe. Selon les données de la littérature, un greffon autologue capable de générer une reconstitution hématologique satisfaisante doit comporter au minimum 2.10^6 cellules CD34⁺/kg, une concentration de 5.10^6 CD34⁺/kg étant considérée comme optimale⁴⁹. En général, ces doses sont obtenues au décours de deux séances de cytophérèse. Pour les greffes allogéniques,

une valeur minimale de 4.10^6 CD34+/kg est requise⁵⁰. L'unité de poids se rapporte toujours au poids de receveur.

D'un point de vue qualitatif, un test fonctionnel peut également être réalisé. Il vise à évaluer la capacité des cellules CD34+ contenues dans le greffon à former des colonies : c'est la clonogénécité. Concrètement, les cellules CD34+ sontensemencées en milieu semi-solide riche en facteurs de croissance, en présence ou non d'érythropoïétine (EPO). Les colonies sont dénombrées et identifiées après 14 jours de culture. Les résultats sont présentés en nombre de colonies par unité de poids du receveur (CFU-GM/kg) ou en pourcentage de clonogénécité. Ce résultat ne constitue pas un critère libératoire mais en cas de clonogénécité trop faible (< 10%) ou trop importante (> 40%), il convient d'alerter le clinicien sur la qualité du greffon, selon les recommandations de l'agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM)⁵¹.

1.3.2 Cellules immunocompétentes du greffon

Les greffons de CSH contiennent également des cellules immunocompétentes (lymphocytes et cellules NK) présentes dans la fraction mononuclée prélevée par cytapphérèse.

Dans les situations autologues, de nombreuses études ont démontré que le taux de lymphocytes post-greffe joue un rôle important dans la survie du patient⁵²⁻⁵⁴. Dans une étude de 2013 regroupant plus d'une centaine de patients atteints de myélome multiple et éligibles à une autogreffe, la présence d'un taux sanguin de lymphocytes supérieur à 1.10^9 CD3+/L, trente jours après la greffe, est associé à une amélioration de la survie globale et de la survie sans rechute en comparaison aux patients dont le taux lymphocytaire sanguin reste inférieur à cette valeur (survie globale : 96 versus 48 mois, $p<0,005$ et survie médiane sans rechute : 43 versus 29 mois, $p=0,005$)⁵⁵. Dans cette étude, les auteurs ont émis l'hypothèse que la reconstitution immunologique précoce, permise par l'injection d'un greffon riche en lymphocytes, permettrait de limiter le risque de récurrence post-greffe, expliquant les résultats prometteurs sur la survie globale et la survie sans rechute. Pour autant, dans les greffes autologues, aucune transformation du produit n'est réalisée en fonction du taux de leucocytes.

Parmi les facteurs pouvant affecter le contenu du greffon en cellules lymphocytaires, la concentration lymphocytaire sanguine en amont du prélèvement, elle-même dépendante du type de traitement de mobilisation, est un élément important⁵⁶. Le nombre de cellules CD3+ contenues dans le greffon est corrélé à la concentration sanguine lymphocytaire. Concernant les traitements de mobilisation, l'administration de G-CSF augmente significativement la leucocytose sanguine en comparaison à une mobilisation par chimiothérapie seule⁵⁶. Le plerixafor permet également une meilleure mobilisation des lymphocytes⁵⁷.

Dans les situations allogéniques, les cellules immunocompétentes constituent les acteurs cellulaires de la GVL, effet anti-tumoral bénéfique et de la GVH, effet délétère envers les tissus sains. Les expériences de déplétion en cellules T se traduisent par une diminution de la fréquence et de la sévérité de la GVH mais également par une augmentation inacceptable de la fréquence de rechute⁵⁸. Ces déplétions ont été réalisées par des techniques d'agglutination (utilisation de lectine de soja) ou de reconnaissance antigène-anticorps (anticorps monoclonaux couplés à des billes immuno-magnétiques). En outre, les déplétions « pan » cellules T s'accompagnent d'une augmentation de l'incidence du rejet de greffe suggérant que les cellules T du donneur sont nécessaires pour contrebalancer le rejet de greffe induit par les cellules T résiduelles du receveur⁵⁹. Ainsi, les déplétions *ex-vivo* de l'ensemble des cellules T ne semblent pas être un choix optimal pour les greffes allogéniques. Des études actuelles visent à combiner des techniques de déplétion ciblées (et non « pan-T ») à des méthodes pharmacologiques post-greffe⁵⁹. Les effets liés à la GVH seront alors anticipés par administration préventive d'agents immunosuppresseurs tels que la ciclosporine (NEORAL[®], SANDIMMUN[®]) ou le tacrolimus (PROGRAF[®]).

1.3.3 Excès de PNN et Toxicité

Les poches de collecte vont également contenir une quantité variable de polynucléaires neutrophiles (PNN) susceptibles d'être à l'origine d'une toxicité sur le greffon, altérant ses capacités thérapeutiques, mais également sur le receveur.

Une étude rétrospective menée sur 952 greffes autologues de CSH, seules poches systématiquement congelées, a démontré que le taux de PNN dans le produit d'aphérèse est inversement corrélé au rendement post-décongélation des cellules nucléées totales (Figure 10)⁶⁰. En d'autres mots, plus la richesse du greffon en PNN est importante, moins les cellules composant le greffon résistent au processus de congélation et décongélation.

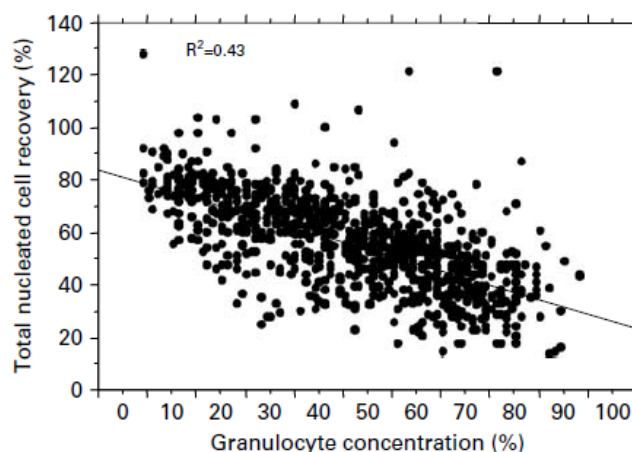


Figure 10 Comparaison entre le rendement en cellules nucléées totales post – décongélation et le taux initial de polynucléaires neutrophiles.

La richesse initiale du greffon en PNN conditionne le rendement post greffe en cellules nucléées totales. D'après Fois et al⁶⁰.

Mais le taux initial de PNN contenu dans le greffon est également corrélé à l'occurrence et à la sévérité des événements indésirables survenant après la greffe⁶¹. Les travaux de Calmels et *al*, regroupant 460 patients autogreffés, ont ainsi étudié la corrélation entre survenue d'effets indésirables post-greffe, leur gravité et la teneur initiale du greffon en PNN. Les effets indésirables survenant après la greffe sont classés du grade 0 (absence de survenue d'effet indésirable) au grade 4 (Tableau I).

Tableau I : Effets indésirables survenus post- autogreffe.

| Grade | Symptômes |
|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Irritation de la gorge ▪ Frissons ▪ Nausées ▪ Démangeaisons ▪ Vertiges ▪ Douleurs thoraciques |
| 2 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Vomissements ▪ Bouffées de chaleur ▪ Tremblement ▪ Etourdissement ▪ Douleurs abdominales ▪ Céphalées |
| 3 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Pertes de visions |
| 4 | <ul style="list-style-type: none"> ▪ Perte de conscience ▪ Arrêt cardiaque |

Chez les patients présentant des effets indésirables post-greffe de catégorie 1 ou 2, la quantité de PNN dans le greffon avant décongélation est trois fois plus élevée que chez les patients pour lesquels aucun effet indésirable n'est survenu (Grade 0). Chez les patients présentant des événements de grade 3 ou 4, la quantité de PNN est multipliée par sept (Figure 11).

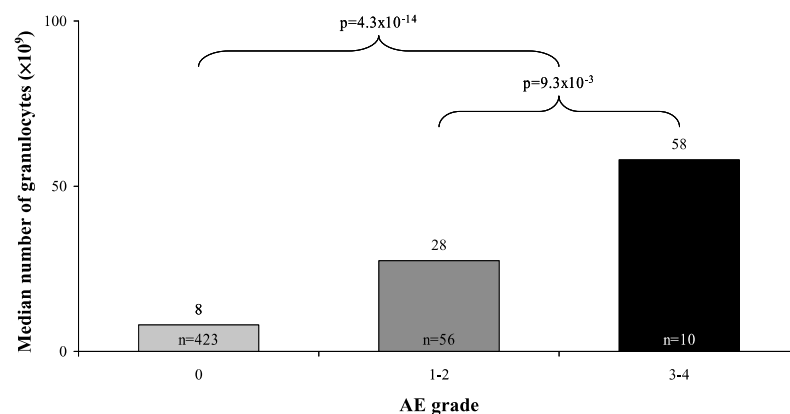


Figure 11 : Le contenu en polynucléaires dans le produit de cytophérèse est corrélé à la survenue d'effets indésirables post greffe chez le patient.

Les évènements indésirables sont décrits dans le tableau I. D'après Calmels et al⁶¹

La toxicité cellulaire post-décongélation ainsi que la survenue d'effets indésirables chez le receveur peuvent être expliqués par la faible résistance osmotique des PNN. Les granulocytes sont en effet des cellules peu résistantes au processus de

congélation et décongélation. Lors de la diminution progressive de la température, les PNN se lysent en raison de l'abondance des organites intracellulaires dont la membrane est fragile. Le contenu de ces cellules va être libéré dans la suspension cellulaire à l'origine d'un environnement délétère pour la survie des autres cellules composant le greffon⁶². De plus, ces toxines ne pourront être complètement éliminées lors du lavage post-décongélation et entraînent, lors de l'administration au receveur, des réactions inflammatoires tissulaires à l'origine des effets indésirables observés.

1.3.4 Erythrocytes et incompatibilité ABO

La présence d'érythrocytes dans les greffons collectés par cytophérèse est particulièrement rare. Ainsi, leur hématocrite moyen (volume de globules rouges/volume de sang total) est inférieur à 5%. Les procédures visant à limiter le risque d'incompatibilité ABO entre donneur et receveur ne sont pas applicables dans le cas de produits d'aphérèse. Elles sont principalement réalisées dans le cas des greffes de CSH allogéniques provenant de la moelle osseuse.

2 CONTEXTE DE L'ETUDE

Depuis le début des années 2000, les besoins en greffe de CSH ont cru considérablement, les indications se sont diversifiées et l'âge des patients éligibles a évolué. En outre, l'amélioration des pratiques, notamment pour les conditions de prélèvement, a contribué à la progression de l'accès à ce type de greffe⁶³.

Les pratiques de prélèvement et de greffe de CSH se doivent de respecter un cadre de qualité et de sécurité instauré par les directives européennes de 2004 et 2006⁶⁴. Ces directives ont été depuis transposées en droit français. Ces pratiques font également l'objet d'un plan national de santé publique dédié nommé « Plan pour la Greffe de Cellules Souches Hématopoïétiques » dont l'objectif est de « *promouvoir la greffe de CSH et d'en assurer l'accessibilité et la qualité sur l'ensemble du territoire* »¹¹.

De la qualité du prélèvement des CSH, quel qu'en soit la modalité (moelle osseuse ou cytophérèse), dépend la qualité de prise de greffe et le devenir des patients greffés¹¹. De façon plus précise, parmi l'ensemble des paramètres influant sur la qualité d'un greffon, la richesse du prélèvement en cellules CD34+ en est le déterminant le plus important^{63,65-67}.

Les procédures de cytophérèse sont aujourd'hui majoritairement utilisées pour la collecte des CSH tant pour les greffes autologues qu'allogéniques⁴. Parmi les facteurs susceptibles de modifier la quantité de cellules CD34+ contenues dans le greffon, trois principaux paramètres ont été mis en évidence dans la littérature : la concentration sanguine en CD34+ de la personne prélevée, le volume de sang traité et l'efficacité de la collecte (CE ou *Collection Efficiency*)⁶⁸.

Comme attendu, la quantité de cellules CD34+ dans la poche de collecte est corrélée à la capacité de mobilisation de la personne prélevée ainsi qu'au volume de sang traité⁶⁹⁻⁷¹. En revanche, l'efficacité de collecte (ou rendement de collecte) constitue un paramètre pouvant être variable et ainsi compromettre le contenu du greffon en cellules CD34+ d'une procédure de cytophérèse à une autre⁶⁸. Or, la plupart des démarches qualité entreprises aujourd'hui dans le domaine médical ont pour objectif de réduire la variabilité interindividuelle dans le résultat de diverses procédures thérapeutiques.

L'efficacité de collecte peut être définie comme la capacité du séparateur à collecter l'ensemble des cellules d'intérêt présentes dans le compartiment sanguin. En d'autres termes, le CE correspond à un rendement entre deux quantités : celle de cellules CD34+ présentes dans la poche de collecte rapportée à celle de cellules CD34+ présentes dans le compartiment sanguin. La relevance clinique de ce paramètre est ainsi particulièrement importante : pour une même concentration sanguine en cellules CD34+, plus le CE est élevé, plus la quantité de cellules CD34+ dans le greffon sera importante.

Un faible nombre d'études a cherché à définir des valeurs de référence du CE. Dès lors, si des valeurs de références sont attendues, l'étude du CE peut se révéler être un indicateur qualité important permettant d'évaluer de manière robuste la reproductibilité de la collecte des CSH, d'une personne à l'autre voire d'un acte de cytophérèse à l'autre chez une même personne prélevée. Il est, à ce stade, important de mentionner une des limites principales de l'étude du CE. Le calcul du rendement de collecte, mathématiquement très simple, néglige en effet un paramètre biologique peu quantifiable, la mobilisation des CSH au cours du procédé. En effet, le compartiment sanguin n'est pas un compartiment unique et fermé, mais un compartiment dynamique constamment alimenté en CSH par le compartiment médullaire. La quantité de cellules contenues dans le compartiment sanguin évolue ainsi au cours du prélèvement. Pour autant, cette mobilisation *in process* ne peut expliquer, à elle seule, la variabilité du CE d'une procédure à l'autre.

Dans cette étude, nous nous proposons d'étudier l'efficacité de collecte de l'ensemble des actes de cytophérèse réalisés à l'Institut Paoli-Calmettes (IPC) au cours de l'année 2016. Dans une démarche d'harmonisation et d'amélioration des pratiques, l'évaluation du CE pourrait s'avérer être un indicateur de la qualité du prélèvement effectué par cytophérèse. Il s'agirait d'en définir, à partir de cette étude, le seuil minimal acceptable dans le cas d'une collecte individuelle. Si tant est que la définition d'un seuil minimal soit envisageable, les procédures individuelles tombant en dessous de cette limite déterminée pourraient être enregistrées et étudiées à des fins d'assurance qualité.

Ainsi, le critère de jugement principal de l'étude est de déterminer les facteurs matériels, opérationnels et biologiques pouvant affecter l'efficacité de collecte des actes de cytaphérèse. Les prélèvements présentant une faible valeur de CE seront étudiés individuellement dans un second temps.

3 MATERIELS ET METHODES

3.1 L'étude

L'étude effectuée est rétrospective et mono-centrique. En ce sens, elle concerne l'ensemble des actes de cytophérèse effectués à l'IPC au cours de l'année 2016.

Parmi les 250 personnes prélevées dans cette étude, les patients pédiatriques ont été exclus de l'analyse en raison de :

- leur faible nombre (9 patients pour 17 prélèvements) ;
- leurs données biologiques, non comparables avec le restant de la cohorte et difficiles à recueillir (les procédures pédiatriques sont réalisées sur un autre site que l'IPC) ;
- l'absence de valeurs de CE obtenues inférieures à 30% (médiane = 47,0% [34,0% ; 84,0%]).

Notre population d'étude concerne donc 241 adultes prélevés au centre de cytophérèse de l'IPC, au cours de l'année 2016, pour un total de 367 actes effectués.

3.2 Collecte des données

Les données ont été recueillies d'après les dossiers médicaux des personnes prélevées, les formulaires de cytophérèse, les comptes rendus biologiques ainsi que les données de dispensation fournies par la pharmacie à usage intérieur (PUI) de l'Institut. Un consentement a été signé par chaque personne prélevée afin que les données les concernant soient utilisées à des fins de recherche biomédicale.

Au total, 24 variables ont été étudiées. Enumérées ci dessous, leur unité ou modalités sont précisées entre parenthèses.

- **Les caractéristiques physiopathologiques de la personne prélevée :** âge (*années*), sexe (*homme/femme*), IMC (kg/m^2).
 - Pour les autogreffes : le diagnostic du patient (*lymphome, myélome, tumeur solide, leucémie*).
 - Pour les allogreffes : le type de greffe (*géo, haplo ou phéno-identique*).

- **Les caractéristiques biologiques de la personne prélevée :** elles sont évaluées sur un prélèvement sanguin effectué avant l'acte de cytophérèse.
 - Numération Formule Sanguine : érythrocytes (*T/L*), hématocrite (%), hémoglobine (*g/dL*), volume globulaire moyen ou VGM (*fL*), leucocytes (*G/L*), plaquettes (*G/L*) ;
 - Formule leucocytaire : lymphocytes (*G/L*), monocytes (*G/L*), polynucléaires neutrophiles (PNN), éosinophiles (PNE) et basophiles (PNB) exprimés en *G/L*.

- **Les paramètres propres à l'acte de cytophérèse :** type de séparation (*discontinu ou continu*), nombre de masses sanguines traitées, volume de sang traité (*L*), type de traitement de mobilisation (*G-CSF seul ou G-CSF couplé à une chimiothérapie*), ajout éventuel de plerixafor (*Oui/Non*), type de greffe (*Allogénique ou Autologue*).

- **Les données relatives aux cellules d'intérêt :** cellules CD34+ dans le sang (exprimés en *CD34+/ μ L et pourcentage de cellules CD34+ parmi les cellules CD45+*).

3.3 Personnes prélevées

Parmi les 241 personnes prélevées, 99 étaient des donneurs sains (41,1%) et 142 étaient des patients (58,9%). Leurs caractéristiques sont représentées dans le ci-dessous (Tableau II).

- Caractéristiques physiologiques

Au total, parmi les 241 personnes incluses dans l'étude, on dénombre 141 hommes (58,5%) pour 100 femmes (41,5%). Ce sex-ratio reste stable si l'on considère individuellement les groupes « Allogénique » et « Autologue ». L'âge médian est de 52,3 ans [18,6 ; 70,4] au moment du prélèvement. L'âge est significativement différent entre le groupe « Allogénique », composé de donneurs jeunes, et le groupe « Autologue », composé de patients dont la médiane d'âge est de plus en plus élevée

(médiane $_{Allo}$ =42,4 ans ; médiane $_{Auto}$ =56,7 ans ; p Wilcoxon<0,001). L'IMC est identique quel que soit le groupe considéré.

- Caractéristiques biologiques

La grande majorité des paramètres biologiques considérés (érythrocytes, hématocrite, hémoglobine, VGM, leucocytes, plaquettes, lymphocytes, PNN et PNE) sont statistiquement différents entre les deux groupes comparés (p Wilcoxon>0,05). Ainsi, excepté pour les variables « monocytes » et « PNB », les patients présentent des caractéristiques biologiques différentes de celles des donneurs. Etudier les facteurs influençant le CE dans chacun de ces groupes, considérés à l'échelle individuelle, apparaît donc particulièrement pertinent.

Tableau II : Caractéristiques des personnes prélevées.

* : la p value du test de Wilcoxon (pour les variables continues) ou du test du χ^2 (pour les variables catégorielles) est significative (p<0,05). Lorsque les effectifs théoriques des sous-cohortes croisées avec les variables catégorielles seront trop faibles (n < 5), le test exact de Fisher est utilisé à la place du test du χ^2 .

| Tous les patients (n=241) | | | | Allogénique (n=99) | | Autologue (n=142) | |
|------------------------------|---------------|---------|-------------|-----------------------|-------------|----------------------|-------------|
| Paramètres physiologiques | | | | | | | |
| | | Nombre | Pourcentage | Nombre | Pourcentage | Nombre | Pourcentage |
| Sexe | Homme | 141 | 58,5 | 59 | 59,6 | 82 | 57,7 |
| | Femme | 100 | 41,5 | 40 | 40,4 | 60 | 42,2 |
| | | Médiane | Min-Max | Médiane | Min-Max | Médiane | Min-Max |
| Age* | | 52,3 | [18,6-70,4] | 42,4 | [18,6-70,2] | 56,7 | [21,5-70,4] |
| IMC | | 24,0 | [16,0-43,0] | 24,0 | [18,0-43,0] | 24,0 | [16,0-39,0] |
| Paramètres biologiques | | | | | | | |
| | | Médiane | Min-Max | Médiane | Min-Max | Médiane | Min-Max |
| NFS | Erythrocytes* | 4,10 | [2,40-49,6] | 4,70 | [3,10-5,90] | 3,80 | [2,40-49,6] |
| | Hématocrite* | 38,7 | [23,2-92,9] | 43,2 | [29,3-49,2] | 35,2 | [23,2-92,9] |
| | Hémoglobine* | 12,3 | [8,00-16,1] | 14,1 | [9,20-16,1] | 11,3 | [8,00-15,2] |
| | VGM* | 92,0 | [70,1-108] | 90,8 | [70,1-99,8] | 93,1 | [72,4-108] |
| | Leucocytes* | 39,7 | [1,00-102] | 42,8 | [14,1-85,5] | 36,1 | [1,00-102] |
| | Plaquettes* | 199 | [8,00-563] | 231 | [30,1-492] | 152 | [8,00-563] |
| Formule leuco-cytaire | Lymphocytes* | 3,20 | [0,20-12,1] | 3,80 | [1,70-6,80] | 1,80 | [0,20-12,1] |
| | Monocytes | 2,40 | [0,10-112] | 2,40 | [0,80-4,40] | 2,50 | [0,10-112] |
| | PNN* | 30,7 | [0,60-77,6] | 33,5 | [15,9-70,1] | 25,5 | [0,60-77,6] |
| | PNB | 0,01 | [0,00-89,9] | 0,02 | [0,00-0,80] | 0,00 | [0,00-89,9] |
| | PNE* | 0,32 | [0,00-11,7] | 0,46 | [0,00-2,40] | 0,09 | [0,00-11,7] |

Parmi les 99 greffes allogéniques, on dénombre 95 greffes intrafamiliales (96,0%) pour seulement 4 greffes provenant de donneurs inscrits sur les registres nationaux et internationaux (4,00%). Un peu plus des deux tiers des greffes intrafamiliales sont des greffes haplo-identiques (68,4%), la proportion restante étant des greffes géno-identiques (31,6%). Concernant les 142 patients prélevés dans le cas d'une autogreffe, 64 patients présentaient un myélome (45,1%), 62 un lymphome (43,7%), 15 une tumeur solide (6,2%) et 1 patient est traité dans le cadre d'une leucémie (0,70%). Ces résultats sont cohérents avec le rapport médical et scientifique de l'Agence de la biomédecine publié en 2015 et dont les principaux résultats sont exposés dans la première partie de ce manuscrit (Figure 12).

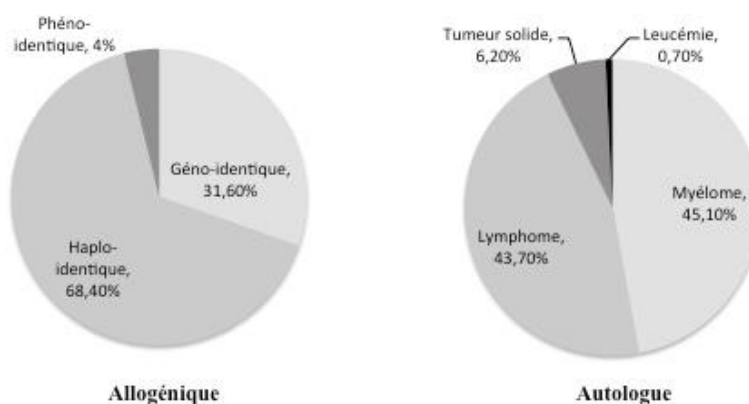


Figure 12 : Répartition du type de greffe dans le groupe « Allogénique » et de l'indication de greffe dans le groupe « Autologue ».

3.4 Procédures d'aphérèse

Pour des raisons d'analyse statistique, à une personne prélevée correspond un acte de prélèvement par cytaphérèse. La prise en compte de tous les prélèvements aurait été possible grâce à une analyse à données répétées à la condition qu'il soit prévu le même nombre de prélèvements pour chacun des patients. Or, le nombre d'actes de cytaphérèse étant déterminé par le nombre de cellules CD34 + collectées, l'hypothèse de « hasard des valeurs manquantes », indispensable à l'application de ce type d'analyse, n'est pas respectée. Ainsi, dans les cas de collectes multiples pour une même personne, seul le premier acte de cytaphérèse est pris en compte dans l'analyse.

Le traitement de mobilisation a été réalisé selon des modalités différentes entre donneurs sains et patients. Dans le cas de greffes allogéniques, l'ensemble des

donneurs ont reçu pour traitement de mobilisation, une injection de G-CSF, durant quatre jours consécutifs, à raison de 10 µg/kg/jour. Dans les situations autologues, deux types de traitement de mobilisation ont été prescrits ; l'injection de G-CSF seul ou en association à une chimiothérapie de mobilisation. Dans ce second cas, la dose de G-CSF était réduite à 5 µg/kg/jour. En cas d'échec de mobilisation chez ces patients, définie comme une concentration sanguine en cellules CD34+ comprise entre 5 et 15 éléments/µL de sang en dépit d'un traitement adapté, une modification du traitement de mobilisation est proposée par adjonction de plerixafor. Au total, 64 patients (45,1%) ont reçu un traitement de mobilisation par G-CSF seul et 78 en association à un traitement par chimiothérapie (54,9%). Parmi l'ensemble des patients, 33 (23,2%) ont présenté une mobilisation faible nécessitant l'ajout d'un traitement par plerixafor (Tableau III).

Les résultats de la mobilisation, évalués par la concentration en cellules CD34+/µL de sang périphérique montrent une valeur médiane de 51,6 éléments/µL. Les valeurs sont identiques entre le groupe « Allogreffe » et « Autogreffe ».

Pour chaque procédure, les paramètres spécifiques à l'acte de cytophérèse ont été étudiés. Des séparateurs Spectra Optia (Terumo BCT, Lakewood, USA) fonctionnant selon des principes de collecte continu ou discontinu ont été utilisés. La séparation continue est utilisée de façon préférentielle à la séparation discontinue, notamment en raison de sa facilité d'utilisation ($P_{\text{CONTINU}} = 77,2\%$; $P_{\text{DISCONTINU}} = 22,8\%$). Le nombre de masses ainsi que le volume de sang traité par le séparateur ont été colligés au sein de la feuille de renseignement du prélèvement. Aucune différence significative n'est observée entre les groupes pour ces variables (Tableau III).

Tableau III : Caractéristiques des prélèvements inclus dans l'étude.

* : la p value du test de Wilcoxon (pour les variables continues) ou du test du Khi² (pour les variables catégorielles) est significative ($p < 0,05$). Lorsque les effectifs théoriques des sous-cohortes croisées avec les variables catégorielles seront trop faibles ($n < 5$), le test exact de Fisher est utilisé à la place du test du Chi².

| Tous les prélèvements (n=241) | | | | Allogénique (n=99) | | Autologue (n=142) | |
|-------------------------------------|--------------------------|---------|-------------|-----------------------|-------------|----------------------|-------------|
| Mobilisation | | | | | | | |
| | | Nombre | Pourcentage | Nombre | Pourcentage | Nombre | Pourcentage |
| Type de mobilisation | G-CSF seul* | 163 | 67,6 % | 99 | 100 % | 64 | 45,1% |
| | Chimiothérapie + G-CSF | 78 | 32,4 % | - | - | 78 | 54,9% |
| Ajout de plérixafor | Oui | 33 | 23,2 % | - | - | 33 | 23,2 % |
| | Non | 109 | 76,8 % | - | - | 109 | 76,8 % |
| Paramètres biologiques pré-aphérèse | | | | | | | |
| | | Médiane | Min-Max | Médiane | Min-Max | Médiane | Min-Max |
| Cellules CD34+ | Concentration (CD34+/μL) | 51,6 | [11,1-385] | 54,7 | [11,2-312] | 51,2 | [11,1-385] |
| | Pourcentage | 0,14 | [0,02-6,30] | 0,13 | [0,03-0,56] | 0,17 | [0,02-6,30] |
| Paramètres du prélèvement | | | | | | | |
| | | Nombre | Pourcentage | Nombre | Pourcentage | Nombre | Pourcentage |
| Type de séparation * | Continu | 173 | 77,2 % | 85 | 95,5 % | 88 | 65,2% |
| | Discontinu | 51 | 22,8% | 4 | 4,5 % | 47 | 34,8 % |
| | Données manquantes | 17 | - | 10 | - | 7 | - |
| | | Médiane | Min-Max | Médiane | Min-Max | Médiane | Min-Max |
| Nombre de masses | | 3,00 | [1,00-3,00] | 3,00 | [2,00-3,00] | 3,00 | [1,00-3,00] |
| Volume de sang traité | | 12,7 | [5,70-19,5] | 12,9 | [7,80-18,4] | 12,7 | [5,70-19,5] |

3.5 Détermination du nombre de cellules CD34+

La quantité de cellules CD34+ viables dans le sang périphérique de la personne prélevée ainsi que dans le produit collecté a été évaluée par cytométrie en flux simple plateforme (BD Biosciences, Meylan, France) par utilisation du kit SCE (*Stem Cell Enumeration* BD Biosciences, Meylan, France). Concrètement, 100μL de solution sont mis en présence d'anticorps CD45 FITC et CD34 PE ainsi que d'un marqueur de viabilité pendant 20 minutes à température ambiante. Le tube utilisé inclut un nombre déterminé et constant de microbilles, nécessaires à la numération absolue des cellules d'intérêt. Pour les échantillons sanguins, une lyse des globules rouges est réalisée par ajout de NH₄-Cl⁷².

La concentration sanguine en cellules CD34+ a été déterminée sur un prélèvement sanguin réalisé en amont de la cytophérèse. Le contenu en cellules CD34+ dans le greffon a, quant à lui, été évalué par un prélèvement sur la poche de

cytaphérèse, en amont de toute manipulation cellulaire ou d'étape de cryo-préservation.

3.6 Collection Efficiency

Le CE correspond au rapport du nombre de cellules collectées à l'issue du processus d'aphérèse sur le nombre de cellules traitées par la machine. Sa formule mathématique est représentée ci-dessous.

$$CE = \frac{\text{Nombre de cellules collectées}}{\text{Nombre de cellules traitées par le séparateur}} \times 100$$

Le CE se présente donc sous la forme d'un pourcentage. En d'autres mots, si dans le produit collecté 50 cellules sont dénombrées alors que 100 cellules ont été traitées par l'appareil, la valeur du CE est de 50%. Cette formule mathématique simple peut être appliquée à l'ensemble des procédés d'aphérèse, quel que soit le type de cellules collectées.

Appliquée aux CSH, cette formule peut être exprimée selon la formule suivante.

$$CE = \frac{\text{Nombre absolu de cellules CD34 positives dans la poche de collecte}}{\text{Nombre de cellules CD34 positives traitées par le séparateur}} \times 100$$

$$CE = \frac{\text{Nombre absolu de cellules CD34 positives dans la poche de collecte}}{\text{Concentration sanguine en CD34 positives} \times \text{Volume de sang traité}} \times 100$$

La concentration sanguine en CD34+ est évaluée avant l'acte de cytaphérèse et est exprimée en CD34+/μL. Le volume de sang traité, exprimé en mL est déterminé par le clinicien en fonction des caractéristiques physiologiques du patient (âge, taille, poids) comme représenté dans l'annexe 1.

Cette formule mathématique simple pour le calcul du CE est également appelée CE2. Elle est majoritairement appliquée dans la littérature pour l'étude de ce paramètre lors de la collecte des CSH⁷³. Une seconde formule du CE, CE1, utilise comme dénominateur, une moyenne entre le nombre de cellules CD34+ sanguines

avant et après l'acte de cytophérèse⁴⁶. Pour autant, ces cellules étant très rarement énumérées suite au processus de cytophérèse, ce calcul est peu utilisé en pratique.

3.7 Analyse statistique

Les analyses statistiques ont été réalisées par l'unité de biostatistiques et méthodologie (UBM) de l'IPC.

Les caractéristiques des personnes prélevées et des prélèvements sont résumées par une analyse descriptive. Les différences entre les sous-cohortes « Allogénique » et « Autologue » sont évaluées au moyen du test du Chi² pour les variables catégorielles et du test de Wilcoxon pour les variables continues. Lorsque les effectifs théoriques des sous-cohortes croisées avec les variables catégorielles sont trop faibles ($n < 5$), le test exact de Fisher est utilisé en remplacement de celui du Chi².

Concernant le taux de collecte ou CE, un test de différence de médiane (test de Wilcoxon) ainsi qu'un test des variances (test de Fisher-Snedecor) sont utilisés.

Des régressions linéaires univariées permettent d'évaluer la significativité de l'effet des différentes variables sur le CE, celui-ci étant préalablement log-transformé (log-CE) afin d'obtenir des résidus normalement distribués. Dans ces tests, seules les variables à deux modalités ont été intégrées (exclusion du paramètre « Opérateur »).

Les variables influant de manière indépendante sur le log-CE sont déterminées à l'aide d'une régression linéaire multivariée avec sélection « *stepwise* » : un seuil de 0,20 est fixé pour l'entrée des variables et celles-ci ne sont conservées qu'en cas de significativité. Ces analyses sont réalisées sur la population globale et sur les sous-groupes « Allogénique » et « Autologue ». Concernant l'analyse multivariée sur la population globale, la sélection « *stepwise* » est réalisée en forçant l'ajustement sur le type de greffe.

Enfin, l'estimation des moyennes de moindres carrés du CE chez les sous-groupes « Allogénique » et « Autologue » ainsi que leurs intervalles de confiance

(tous deux obtenus par transformation exponentielle) sont présentés avec et sans ajustement sur les variables sélectionnées par la méthode « *stepwise* ».

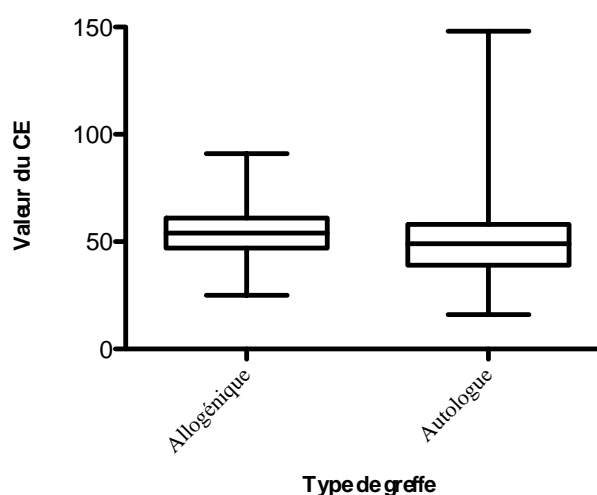
L'ensemble des analyses est réalisé avec le logiciel SAS version 9.3 (The SAS system, SAS Institute, Cary, NC, USA). Les tests statistiques réalisés sont tous bilatéraux, et le seuil de significativité fixé à 5%. En cohérence, les estimations sont fournies avec des intervalles de confiance (IC) à 95%.

4 RESULTATS

4.1 La valeur médiane du CE et sa dispersion sont différentes en fonction du type de greffe

La valeur médiane du CE, calculée selon la formule précédemment citée et évaluée sur 241 prélèvements adultes, est de 51,1% [15,6% ; 148%].

La valeur médiane du CE dans le groupe « Allogénique » (n=99) est de 54,1% [25,2% ; 91,0%] et celle du groupe « Autologue » (n=142) est de 48,7% [15,6% ; 148%]. Les médianes du taux de collecte sont significativement différentes entre ces deux groupes (p-Wilcoxon=0,001). En outre, la dispersion des valeurs du CE, évaluée par un test de Fischer-Snedecor est également significativement différente entre patients et donneurs sains (p-Fisher Snedecor=0,0001). Les données sont représentées dans la figure ci-dessous (Figure 13).



| Test | Statistiques | Tous les prélèvements (n=241) | Allogénique (n = 99) | Autologue (n = 142) | p-Wilcoxon | p-Fischer Snedecor |
|-----------------------|-------------------|-------------------------------|----------------------|---------------------|------------|--------------------|
| Collection Efficiency | Médiane [min-max] | 51,1 [15,6-148] | 54,1 [25,2-91,0] | 48,7 [15,6-148] | 0,001 | 0,0001 |

Figure 13 : Distribution des valeurs du CE en fonction du type de greffe

Afin de savoir si la valeur du CE est différente au sein même des sous-groupes « Allogénique » et « Autologue », des tests de comparaisons sont réalisés. Concernant le sous-groupe « Allogénique », il n'existe pas de différence significative de la valeur du CE en fonction du type de greffe (médiane $_{GENO}$ = 52,0 [39,0 ; 88,0] ; médiane

HAPLO = 54,0 [25,0 ; 91,0] ; médiane PHENO = 61,5 [57,0 ; 65,0] ; p=ns). De même, au sein du groupe « Autologue », aucune différence significative en fonction du type de pathologie n'est retrouvée (médiane MYELOME = 46,5 [24,0 ; 88,0] ; médiane LYMPHOME = 50,0 [16,0 ; 148] ; médiane TUMEUR SOLIDE = 47,0 [18,0 ; 58,0] ; médiane LEUCEMIE = 54,0 ; p=ns).

4.2 Le type de séparation et l'opérateur n'ont pas d'impact sur la valeur du CE

Parmi les 241 prélèvements, 51 ont été réalisés par séparation discontinue (21,2%) et 173 par séparation continue (71,8%). Cette donnée est manquante pour 17 prélèvements (7,10%). La valeur médiane du CE est de 51,0% dans le groupe « séparateur continu » tout comme dans le groupe « séparateur discontinu ». Aucune différence statistiquement significative n'a ainsi été observée en fonction du type de séparateur (p-Wilcoxon=0,07).

Concernant les opérateurs, 6 infirmiers sont habilités à réaliser les prélèvements au sein de l'Unité de Cytaphérèse de l'IPC. Afin de respecter leur anonymat, ils seront dénommés A, B, C, D, E et F. Le nombre de prélèvements réalisés est variable d'un opérateur à l'autre ($n_A = 39$; $n_B = 47$; $n_C = 110$; $n_D = 9$; $n_E = 29$; $n_F = 5$). Aucune différence significative pour la valeur médiane du CE n'est observée entre les différents opérateurs (Figure 14).

Ces résultats nous permettent de s'affranchir d'un biais lié à un dysfonctionnement « séparateur » ou d'une qualification insuffisante du personnel. En outre, ils fournissent des données de référence pour un séparateur mais également pour un opérateur pouvant constituer un indicateur de la qualité du prélèvement et du maintien des compétences au cours du temps pour les personnels intervenant en Unité de Cytaphérèse.

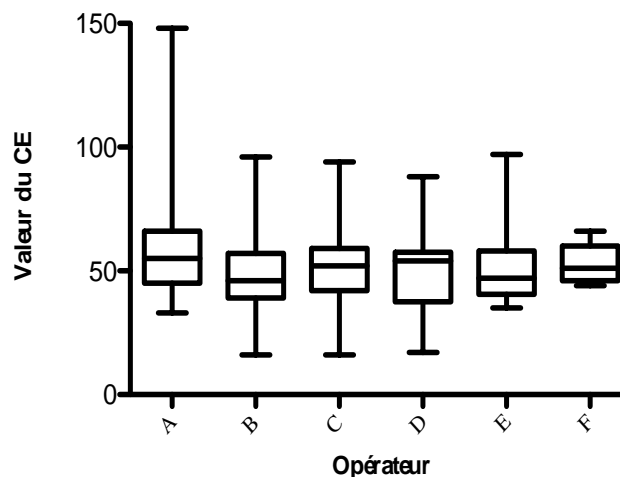


Figure 14 : Distribution des valeurs du CE en fonction de l'opérateur.

4.3 De nombreuses variables biologiques ont un effet sur la valeur du CE (résultats de l'analyse univariée)

4.3.1 Etude de la population générale

L'influence du type de greffe sur la valeur du CE est confirmée en analyse univariée. En effet, le type de greffe a un effet significatif sur le log de CE (estimation beta Autologue vs Allogénique [95%IC]=-0.125 [-0.205 ; -0.045], $p=0.0024$). Le rendement de collecte est significativement meilleur dans le groupe « Allogénique » que dans le groupe « Autologue ». On retrouve ainsi une moyenne de moindre carrés pour le CE de l'ordre de 53.3% (95%IC= [50.2 ; 56.7]) dans le groupe « Allogénique » et de 47.1% (95%IC= [47.7 ; 49.6]) dans le groupe « Autologue » (Tableau IV). Le type de mobilisation ou l'ajout éventuel de plerixafor n'a pas d'effet sur la valeur du CE.

Outre le type de greffe, 6 variables ont un effet significatif sur la valeur du CE en analyse univariée. Il s'agit du sexe, du volume de sang traité par le séparateur et de 4 paramètres biologiques (hématocrite, hémoglobine, leucocytes et PNN).

Concernant l'influence du sexe, la valeur du CE est significativement plus faible dans la population féminine que dans la population masculine (estimation beta



[95%IC]=-0.128 [-0.208 ; -0.048], $p=0.0018$; Figure 15). Les autres paramètres physiologiques tels que l'âge ou l'IMC n'affectent pas la valeur du rendement de collecte.

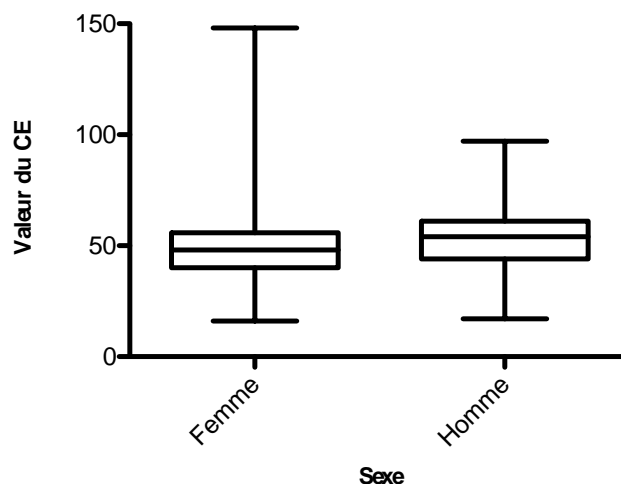


Figure 15 : Distribution des valeurs de CE en fonction du sexe.

Concernant les paramètres « prélèvement », plus le volume de sang traité est important, plus le CE est important (estimation beta [95%IC]=0,026 [0,0127; 0,0394], $p=0,0002$). L'analyse univariée confirme que le paramètre « séparateur », comme démontré dans la seconde partie des résultats, n'a pas d'effet significatif sur la valeur du CE ($p=0,2734$). La variable opérateur, concernant plus de deux modalités, n'a pu quant à elle être incluse dans cette analyse.

L'hématocrite et l'hémoglobine influent de façon positive sur la valeur du CE (respectivement estimation beta [95%IC]= 0,0081 [0,0024; 0,0139], $p=0,0058$ et estimation beta [95%IC]=0,039 [0,0186; 0,0594], $p=0,0002$). A l'inverse, les leucocytes et les PNN ont un impact négatif sur cette valeur. Plus ces paramètres biologiques sont représentés dans le sang, moins la valeur du CE est bonne (respectivement estimation beta [95%IC]= -0,004 [-0,007; -0,002], $p<0,0001$ et estimation beta [95%IC]= -0,004 [-0,007; -0,002], $p=0,0007$). La corrélation entre valeur du CE et leucocytes sanguins dans la population générale est représentée en annexe 2.

4.3.2 Etude des sous-populations « Allogénique » et « Autologue »

Si l'on réalise des analyses en sous-groupe, on retrouve un effet du sexe, identique à la population générale dans le groupe « Autologue » (estimation beta [95%IC]= -0,162 [-0,279 ; -0,044], $p=0,0073$). En revanche, cet effet n'est pas observé dans la population « Allogénique » (beta [95%IC]= -0,074 [-0,166 ; 0,0183], $p=0,1152$; Tableau IV).

Parmi la sous-population « Allogénique », seuls les paramètres biologiques ont un effet sur la valeur du CE. Il s'agit de l'hémoglobine, des leucocytes, des lymphocytes, des monocytes, des PNN et du pourcentage de cellules CD34+ dans le sang. L'hémoglobine a un effet bénéfique sur la valeur du rendement de collecte tandis que les différentes populations de globules blancs et le pourcentage de cellules CD34+ affectent négativement le CE.

Dans la population « Autologue », l'IMC, le volume de sang traité et les paramètres biologiques « leucocytes », « plaquettes », « PNN » et « pourcentage de cellules CD34 + » ont un impact sur la valeur du CE. Les populations de leucocytes, de PNN et de plaquettes ont un effet délétère sur la valeur du CE. En revanche, le rendement de collecte est d'autant meilleur que l'IMC, le volume de sang traité et le pourcentage de CD34 sanguins sont importants. Le type de traitement de mobilisation n'a ici pas d'effet significatif sur la valeur du CE.

En conclusion, l'analyse en sous-groupe montre que les variables ayant un impact sur la valeur du CE sont principalement représentées par des paramètres biologiques. En revanche, ces paramètres diffèrent en fonction du sous-groupe « Allogénique » ou « Autologue ». Des corrélations linéaires sont représentées en annexe 2.

RESULTATS

Tableau IV : Effets des variables étudiées sur la valeur du CE log-transformée par analyse univariée.

| Variable | Modalités | Tous les prélèvements (n = 241) | | | Allogénique (n = 99) | | | Autologue (n = 142) | | |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|-------------|----------------------|-------------------|-------------|---------------------|-------------------------------|--------|
| | | Estimation | IC ₉₅ | p | Estimation | IC ₉₅ | p | Estimation | IC ₉₅ | p |
| Age | NA | -0,003 | [-0,006 ; 0,0004] | 0,0850 | -37 ^E -5 | [-0,004 ; 0,0032] | 0,8396 | -86 ^E -5 | [-0,006 ; 0,0046] | 0,7540 |
| Sexe | <i>Femme vs Homme</i> | -0,128 | [-0,208 ; -0,048] | 0,0018 | -0,074 | [-0,166 ; 0,0183] | 0,1152 | -0,162 | [-0,279 ; -0,044] | 0,0073 |
| IMC | NA | 0,0079 | [-0,001 ; 0,0169] | 0,0833 | 0,0003 | [-0,011 ; 0,0118] | 0,9569 | 0,0129 | [0,0006 ; 0,0253] | 0,0406 |
| Type de greffe | <i>Auto vs Allo</i> | -0,125 | [-0,205 ; -0,045] | 0,0024 | - | - | - | - | - | - |
| Type de mobilisation | <i>Chimio + G-CSF vs G-CSF</i> | -0,014 | [-0,1 ; 0,0716] | 0,7423 | - | - | - | 0,0921 | [-0,026 ; 0,2107] | 0,1266 |
| Ajout de plerixafor | <i>Oui vs Non</i> | 0,0826 | [-0,058 ; 0,2228] | 0,2457 | - | - | - | 0,0826 | [-0,058 ; 0,2228] | 0,2457 |
| Nombre de masses | NA | 0,0963 | [-0,014 ; 0,2064] | 0,0862 | 0,0899 | [-0,05 ; 0,2294] | 0,2032 | 0,0931 | [-0,057 ; 0,2433] | 0,2220 |
| Volume de sang traité | NA | 0,026 | [0,0127 ; 0,0394] | 0,0002 | 0,0124 | [-0,006 ; 0,031] | 0,1924 | 0,0309 | [0,0131 ; 0,0487] | 0,0008 |
| Type de séparateur | <i>Discontinu vs Continu</i> | -0,056 | [-0,156 ; 0,0445] | 0,2734 | -0,216 | [-0,449 ; 0,0169] | 0,0686 | 0,0117 | [-0,118 ; 0,1413] | 0,8586 |
| Erythrocytes | NA | 0,0066 | [-0,007 ; 0,0199] | 0,3348 | 0,057 | [-0,04 ; 0,1535] | 0,2443 | 0,0037 | [-0,012 ; 0,0191] | 0,6309 |
| Hématocrite | NA | 0,0081 | [0,0024 ; 0,0139] | 0,0058 | 0,0154 | [0,0027 ; 0,028] | 0,0179 | 0,0027 | [-0,006 ; 0,0113] | 0,5425 |
| Hémoglobine | NA | 0,039 | [0,0186 ; 0,0594] | 0,0002 | 0,0525 | [0,0167 ; 0,0884] | 0,0045 | 0,0227 | [-0,017 ; 0,0621] | 0,2563 |
| VGM | NA | -0,002 | [-0,009 ; 0,0047] | 0,5640 | 0,0043 | [-0,005 ; 0,0137] | 0,3596 | -0,001 | [-0,01 ; 0,0083] | 0,8336 |
| Leucocytes | NA | -0,004 | [-0,007 ; -0,002] | < 0,0001 | -0,007 | [-0,011 ; -0,003] | 0,0002 | -0,005 | [-0,008 ; -0,002] | 0,0004 |
| Plaquettes | NA | -34 ^E -5 | [-76 ^E -5 ; 0,0001] | 0,1023 | -26 ^E -5 | [-0,001 ; 0,0006] | 0,5403 | -7 ^E -4 | [-0,001 ; 17 ^E -5] | 0,0097 |
| Lymphocytes | NA | -0,012 | [-0,034 ; 0,0095] | 0,2679 | -0,067 | [-0,105 ; -0,029] | 0,0007 | -0,025 | [-0,055 ; 0,0051] | 0,1033 |
| Monocytes | NA | -0,002 | [-0,008 ; 0,0034] | 0,4623 | -0,074 | [-0,128 ; -0,02] | 0,0078 | -0,001 | [-0,008 ; 0,0053] | 0,7283 |
| PNN | NA | -0,004 | [-0,007 ; -0,002] | 0,0007 | -0,009 | [-0,014 ; -0,005] | < 0,0001 | -0,005 | [-0,008 ; -0,002] | 0,0027 |
| PNB | NA | 0,0042 | [-0,003 ; 0,0112] | 0,2329 | -0,319 | [-0,67 ; 0,0319] | 0,0743 | 0,005 | [-0,003 ; 0,0129] | 0,2150 |
| PNE | NA | 0,0189 | [-0,026 ; 0,0641] | 0,4101 | 0,0042 | -0,111 ; 0,1191 | 0,9424 | 0,0181 | -0,036 ; 0,0717 | 0,5063 |
| % CD34 | NA | 0,0711 | [-0,005 ; 0,1468] | 0,0654 | -0,509 | -0,933 ; -0,086 | 0,0190 | 0,1044 | 0,0172 ; 0,1916 | 0,0194 |

4.4 Les analyses multivariées confirment l'importance des paramètres biologiques comme principaux facteurs prédictifs de la valeur du CE

4.4.1 Le type de greffe n'est pas un facteur prédictif de la valeur du CE dans la population générale

L'indépendance de l'effet « type de greffe » n'est pas confirmée par les résultats obtenus en analyse multivariée dans la population globale ($p=0,8378$; Tableau V). Les moyennes des moindres carrés estimées entre les deux sous-groupes « Allogénique » et « Autologue » sont similaires ($m_{\text{ALLOGENIQUE}} = 49,1 [46,2 ; 52,1]$; $m_{\text{AUTOLOGUE}} = 49,7 [45,9 ; 53,8]$) et confirment cette absence d'effet. Le type de greffe ne constitue donc pas un facteur explicatif de la valeur du rendement de collecte.

En revanche, les leucocytes représentent la variable explicative dont la significativité est la plus importante. Ainsi, l'analyse multivariée confirme un effet significativement délétère des leucocytes sur le rendement de collecte ($\text{beta} [95\% \text{IC}] = -0,024 [-0,034 ; -0,013]$, $p < 0,0001$).

Quatre autres variables sont explicatives de la valeur du CE : le volume de sang traité ($\text{beta} [95\% \text{IC}] = 0,0157 [0,0016 ; 0,0297]$, $p=0,0289$), le taux d'hémoglobine ($\text{beta} [95\% \text{IC}] = 0,0369 [0,0081 ; 0,0657]$, $p=0,0122$), le nombre d'hématies ($\text{beta} [95\% \text{IC}] = 0,0202 [0,0047 ; 0,0358]$, $p=0,0111$) et le taux de PNN ($\text{beta} [95\% \text{IC}] = 0,0222 [0,0099 ; 0,0345]$, $p=0,0005$). L'ensemble de ces variables exerce un effet bénéfique sur la valeur du CE.

4.4.2 Analyses en sous-groupes

Si le type de greffe ne semble pas avoir d'effet sur l'efficacité de collecte, les analyses en sous-groupe montrent que cette efficacité dépend de variables différentes entre le groupe « Allogénique » et « Autologue » (Tableau V).

Un seul paramètre biologique influe de manière commune quel que soit le groupe considéré. Ce paramètre, les leucocytes sanguins, exerce un effet délétère sur le rendement de collecte (respectivement $\text{beta}_{\text{ALLOGENIQUE}} [95\% \text{IC}] = -0,006 [-0,01 ; -$

0,002], $p = 0,0049$ et $\text{beta}_{\text{AUTOLOGUE}} [95\% \text{IC}] = -0,028 [-0,04 ; -0,016]$, $p < 0,0001$; Table 5).

Dans le groupe « Allogénique », trois variables, autre que les leucocytes, ont un effet indépendant sur la valeur du CE : le type de séparateur utilisé, le pourcentage de CD34+ dans le sang et le taux d'hémoglobine.

Concernant le type de séparateur utilisé, l'utilisation d'un séparateur continu permet d'obtenir un meilleur rendement de collecte ($p=0,0421$). Cependant, ce résultat est limité compte-tenu du faible effectif considéré. En effet, seules 4 personnes ont été prélevées à l'aide d'un séparateur discontinu dans le sous-groupe « Allogénique » tandis que 95 donneurs ont été prélevés à l'aide d'un séparateur continu. En terme de taille, les groupes sont donc difficilement comparables et une analyse sur des échantillons plus importants pourrait remettre en cause la significativité de cette variable. En outre, si l'on élimine cette variable de l'analyse multivariée, en raison de sa faible pertinence dans le groupe « Allogénique », les mêmes variables significatives sont retrouvées (annexe 3).

Ainsi, les deux paramètres explicatifs de la valeur du CE dans la population « Allogénique » sont des paramètres biologiques. En premier lieu, concernant le taux d'hémoglobine, plus il est important, meilleur sera le rendement de collecte. Le second paramètre est le pourcentage de cellules CD34+ parmi les cellules CD45+. Etonnement, plus la valeur du pourcentage de cellules CD34+ parmi les CD45+ est important, moins le rendement de collecte est bon.

Concernant la population « Autologue », le type de traitement de mobilisation n'a pas d'impact sur la valeur du CE. En revanche, l'ajout de plerixafor augmente significativement et de manière indépendante la valeur du CE. Enfin, deux variables biologiques, les PNN et l'hématocrite ont un effet bénéfique sur la valeur du CE.

RESULTATS

Tableau V : Effet indépendant des facteurs de confusion évalué par analyse multivariée.

Les facteurs de confusion inclus dans les analyses multivariées sont sélectionnés par la méthode « stepwise » (p-valeur d'entrée<0,2, p-valeur de sortie >0,05) pour chaque population. Pour la population globale, le type de greffe est inclus de manière forcée dans la régression. Les champs correspondant à des blancs dans le tableau signifient que les variables n'ont pas été sélectionnées par la méthode « stepwise » et ne font donc pas partie de la régression.

| | | Tous les prélèvements (n = 241) | | | Allogénique (n = 99) | | | Autologue (n = 142) | | |
|-------------------------------------|-----------------------|---------------------------------|--------------------|---------|----------------------|-------------------|--------|---------------------|-------------------|---------|
| Variable | Modalités | Estimation | IC ₉₅ | p | Estimation | IC ₉₅ | p | Estimation | IC ₉₅ | p |
| Paramètres physiologiques | | | | | | | | | | |
| Type de greffe | Auto vs Allo | -0,012 | [-0,0125 ; 0,1017] | 0,8378 | - | - | - | - | - | - |
| Mobilisation | | | | | | | | | | |
| Ajout de mozobil | Oui vs Non | - | - | - | - | - | - | 0,1998 | [0,0504 ; 0,3492] | 0,0092 |
| Paramètres du prélèvement | | | | | | | | | | |
| Volume de sang traité | NA | 0,0157 | [0,0016 ; 0,0297] | 0,0289 | - | - | - | - | - | - |
| Type de séparateur | Discontinu vs Continu | - | - | - | -0,302 | [-0,593 ; -0,011] | 0,0421 | - | - | - |
| Paramètres biologiques pré-aphérèse | | | | | | | | | | |
| Erythrocytes | NA | 0,0202 | [0,0047 ; 0,0358] | 0,0111 | - | - | - | - | - | - |
| Hématocrite | NA | - | - | - | - | - | - | 0,0143 | [0,0044 ; 0,0243] | 0,0049 |
| Hémoglobine | NA | 0,0369 | [0,0081 ; 0,0657] | 0,0122 | 0,049 | [0,0122 ; 0,086] | 0,0098 | - | - | - |
| Leucocytes | NA | -0,024 | [-0,034 ; -0,013] | <0,0001 | -0,006 | [-0,01 ; -0,002] | 0,0049 | -0,028 | [-0,04 ; -0,016] | <0,0001 |
| PNN | NA | 0,0222 | [0,0099 ; 0,0345] | 0,0005 | - | - | - | 0,0251 | [0,0113 ; 0,0389] | 0,0004 |
| % CD34 | NA | - | - | - | -0,532 | [-1 ; -0,065] | 0,0262 | - | - | - |

4.5 Etude des prélèvements dont la valeur du CE est inférieure à 30%

Cette partie se focalise sur l'étude des valeurs extrêmes du CE, en particulier les valeurs basses. En effet, un faible rendement de collecte est associé à une altération de la qualité du greffon conduisant le plus souvent à l'organisation d'un second acte de collecte. Les valeurs extrêmes élevées ne seront pas étudiées dans cette partie. Une valeur de CE à 148% a été retrouvée dans notre étude. L'ensemble des paramètres entrant dans le calcul de cette valeur a été vérifié et aucune erreur n'a été retrouvée. La seule hypothèse pouvant expliquer cette valeur serait une forte mobilisation des CSH dans le compartiment sanguin lors de l'acte de cytophérèse. Dans la littérature, des valeurs supérieures à 100% sont également documentées et expliquées par la mobilisation intra-cytophérèse ou par le délai entre le prélèvement sanguin et le début de la cytophérèse⁷⁴.

Dans une logique mathématique, les valeurs extrêmes sont définies par la valeur moyenne ± 2 écarts types ; la valeur basse est, dans notre étude, de 20%. 5 prélèvements, soit 2,1% des prélèvements totaux, ont une valeur de rendement de collecte inférieure ou égale à 20%. En raison de la très faible représentativité de ces prélèvements, une valeur basse seuil de 30% a été fixée afin d'étudier plus largement les actes de cytophérèse présentant un faible rendement de collecte.

Les prélèvements dont la valeur du CE est inférieure à 30% représentent 15 prélèvements soit 6,2% des prélèvements totaux (Figure 16). Parmi ces 15 prélèvements, les échecs de collecte concernent majoritairement la population « Autologue » (13 prélèvements soit 9,2% des actes autologues). La population « Allogénique », quant à elle, présente des valeurs de rendement inférieures à 30% de manière exceptionnelle (2 prélèvements soit 2% des actes allogéniques).

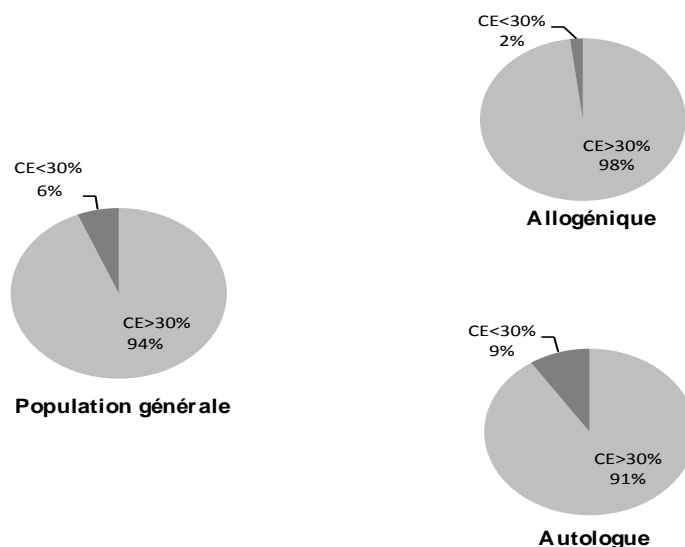


Figure 16 : Proportion de prélèvement dont la valeur du CE est inférieure à 30% dans la population générale ainsi que dans les sous-population « Allogénique » et « Autologue ».

Afin d'étudier les caractéristiques des prélèvements dont la valeur du CE est considérée comme faible, seule la population « Autologue » est considérée. En effet, les variables définissant la valeur du CE étant principalement d'ordre biologique et ces variables étant significativement différentes entre les sous-populations « Autologue » et « Allogénique », il est nécessaire de considérer ces deux populations de façon distinctes. En outre, la très faible représentativité des prélèvements dont le CE est inférieur à 30% dans le groupe « Allogénique » ne permet pas de considérer cette population comme significative et donc de l'étudier dans l'analyse suivante.

Les caractéristiques des 15 prélèvements autologues présentant un rendement de collecte inférieur à 30% sont représentées dans le tableau ci-dessous (Tableau VI). Aucune différence significative n'est observée entre le groupe « Autologue avec un rendement de collecte inférieur à 30% » et « Autologue avec un rendement de collecte supérieur à 30% » à l'exception de la variable « taux de CD34+ sanguins ». En effet, chez les patients dont le CE est inférieur à 30%, la valeur médiane des CD34+ sanguin est de 120 éléments/ μ L de sang pour une valeur médiane de 50 CD34+/ μ L chez les patients dont le rendement de collecte est acceptable.

Tableau VI : Caractéristiques des patients et des prélèvements dont le rendement de collecte est faible.

* : la p value du test de Wilcoxon (pour les variables continues) ou du test du χ^2 (pour les variables catégorielles) est significative ($p < 0,05$). Lorsque les effectifs théoriques des sous-cohortes croisées avec les variables catégorielles seront trop faibles ($n < 5$), le test exact de Fisher est utilisé à la place du test du χ^2 .

| CE < 30 (n=13) | | | CE > 30 (n=129) | | |
|-------------------------------------|--------------------------|---------|-----------------|---------|---------------|
| Paramètres physiologiques | | | | | |
| | | Nombre | Pourcentage | Nombre | Pourcentage |
| Sexe | Homme | 4 | 30,8 % | 78 | 60,5 % |
| | Femme | 9 | 69,2 % | 51 | 39,5 % |
| | | Médiane | Min-Max | Médiane | Min-Max |
| Age | | 55,2 | [40,1 ; 67,1] | 56,7 | [21,5 ; 70,4] |
| IMC | | 23,0 | [18,0 ; 32,0] | 24,0 | [16,0 ; 39,0] |
| Paramètres biologiques | | | | | |
| | | Médiane | Min-Max | Médiane | Min-Max |
| NFS | Erythrocytes | 3,57 | [2,60 ; 5,69] | 3,80 | [2,45 ; 49,6] |
| | Hématocrite | 32,9 | [25,1 ; 42,5] | 34,8 | [26,5 ; 38,1] |
| | Hémoglobine | 10,8 | [8,60 ; 12,6] | 11,5 | [8,00 ; 15,2] |
| | VGM | 96,2 | [72,4 ; 100] | 92,7 | [79,1 ; 105] |
| | Leucocytes | 39,5 | [7,20 ; 102] | 35,3 | [1,00 ; 83,2] |
| | Plaquettes | 201 | [20,0 ; 563] | 142,5 | [8,00 ; 496] |
| Formule leucocytaire | Lymphocytes | 2,37 | [0,29 ; 12,1] | 1,14 | [0,22 ; 8,09] |
| | Monocytes | 3,07 | [1,44 ; 15,3] | 2,32 | [0,15 ; 5,81] |
| | PNN | 26,7 | [4,61 ; 77,6] | 25,4 | [0,60 ; 71,1] |
| | PNB | 0,36 | [0,13 ; 0,47] | 0,20 | [0,04 ; 0,81] |
| | PNE | 0,58 | [0,01 ; 2,04] | 0,38 | [0,08 ; 1,74] |
| Mobilisation | | | | | |
| | | Nombre | Pourcentage | Nombre | Pourcentage |
| Type de mobilisation | G-CSF seul | 7 | 53,9 % | 57 | 44,2 % |
| | Chimiothérapie + G-CSF | 6 | 46,1 % | 72 | 55,8 % |
| Ajout de mozobil | Oui | 2 | 15,4 % | 31 | 24,0 % |
| | Non | 11 | 84,6 % | 98 | 76,0 % |
| Paramètres biologiques pré-aphérèse | | | | | |
| | | Médiane | Min-Max | Médiane | Min-Max |
| Cellules CD34 + | Concentration (CD34/µL)* | 120 | [29, 0 ; 168] | 50 | [11,0 ; 385] |
| | Pourcentage | 0,25 | [0,07 ; 0,61] | 0,20 | [0,02 ; 6,3] |
| Paramètres du prélèvement | | | | | |
| | | Nombre | Pourcentage | Nombre | Pourcentage |
| Type de séparation | Continu | 9 | 69,2 % | 79 | 61,2 % |
| | Discontinu | 3 | 23,1 % | 44 | 34,1 % |
| | Données manquantes | 1 | 7,7 % | 6 | 4,65 % |
| | | Médiane | Min-Max | Médiane | Min-Max |
| Nombre de masses | | 3 | [2,00 ; 3,00] | 3 | [1,00 ; 3,00] |
| Volume de sang traité | | 11,0 | [8,30 ; 17,6] | 12,9 | [5,71 ; 19,5] |

La démonstration d'un taux élevé de CD34/ μ L de sang affectant négativement le rendement de collecte, pour les prélèvements dont le CE est inférieur à 30%, est recensé pour la première fois au travers de cette étude (Figure 17).

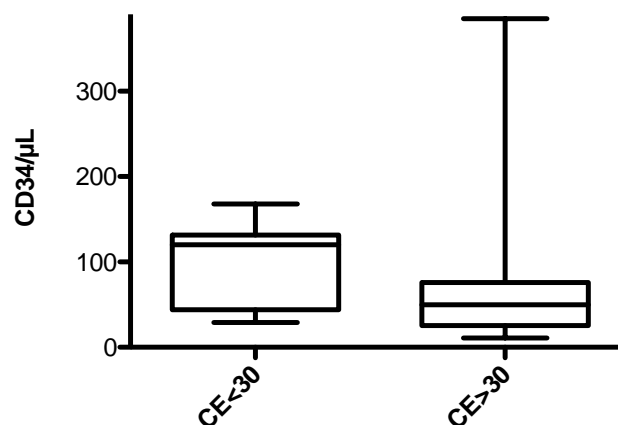


Figure 17 : Taux de cellules CD34+/ μ L de sang dans la population « Autologue » en fonction de l'efficacité de collecte.

Enfin, les variables affectant le rendement de collecte dans le sous-groupe « Autologue » ne sont pas retrouvés ici de manière significative. Ces résultats peuvent être expliqués par la très faible représentativité des actes dont le rendement est inférieur à 30%.

DISCUSSION

Au travers des 241 prélèvements inclus, cette étude rétrospective monocentrique a permis de mettre en évidence que les paramètres biologiques sanguins de la personne prélevée impactent de manière significative l'efficacité de collecte de l'acte de cytophérèse. Ces paramètres sont à considérer de manière différente en fonction des sous-cohortes de donneurs ou de patients

Le rendement de collecte correspond à la capacité de l'appareil de cytophérèse à extraire les cellules d'intérêt. Dans cette étude, sa valeur a été estimée à 51,1%, en adéquation -voire légèrement supérieure- avec les données précédemment répertoriées dans la littérature étudiant des cohortes de patients et de donneurs adultes : Verlinden *et al* (46%) et Ford *et al* (40%)^{68,75}. Une haute valeur de CE est le témoin direct d'une meilleure collection des cellules thérapeutiques d'intérêt contribuant à la diminution du nombre et de la durée des actes de cytophérèse. Les risques de complications pour la personne prélevée et les coûts associés à cette pratique médicale pourraient ainsi être réduits.

Le type de séparateur utilisé et l'expérience de l'opérateur sont deux paramètres pouvant influencer la valeur du rendement de collecte⁶⁸. Or, nous démontrons ici que le type de séparation - continue ou discontinue - ainsi que l'opérateur n'influent pas sur la valeur médiane du rendement de collecte. Cette étude s'affranchit ainsi de tout biais lié à un dysfonctionnement « séparateur » ou d'une qualification insuffisante du personnel.

La capacité du séparateur à prélever les cellules thérapeutiques d'intérêt nécessite une séparation distincte et stable des composants du sang.⁶⁸. A vitesse constante, cette séparation est dépendante de la représentativité de chacun des éléments figurés du sang⁷⁶. Afin de comprendre comment la composition sanguine pré-cytophérèse peut affecter l'efficacité de collecte, nous avons étudié la valeur du CE dans la population générale mais également dans les sous-populations de donneurs et de patients, compte-tenu que leur composition sanguine ne sont pas comparables.

La valeur du CE est significativement différente entre les sous-groupes « Allogénique » et « Autologue » : l'efficacité de collecte est meilleure et plus homogène chez les donneurs sains que chez les patients. A notre connaissance, il

s'agit de la première étude mettant en évidence une différence significative de la valeur du CE ainsi que de sa dispersion entre les groupes « Allogénique » et « Autologue ».

Pour autant, le type de greffe ne conditionne pas la valeur du CE. En effet, le caractère significatif de cette variable n'a pas été retrouvé en analyse multivariée menée sur l'ensemble de la population d'étude. En revanche, des paramètres biologiques s'individualisent auquel s'ajoute le volume de sang traité par le séparateur.

Le volume de sang traité impacte positivement la valeur du CE. En 2013, Verlinden et *al*, publiaient qu'une relation négative existait entre le volume de sang traité et la valeur du CE, les volumes variant de 4L à 35,1L⁶⁸. De ces résultats, les auteurs ont conclu que le volume optimal de sang traité par cytophérèse ne doit pas dépasser l'extraction de 3 masses sanguines pour obtenir un rendement de collecte adéquat. Au-delà de cette valeur, le rendement de collecte diminue. Dans notre étude, le nombre maximal de masses sanguines traitées est de 3 et le volume sanguin total varie de 5L à 19,5L. Nos résultats confirment ainsi que la valeur de CE est corrélée positivement au volume de sang traité dans la limite du traitement de 3 masses sanguines.

Concernant les données biologiques, le taux de leucocytes circulant pré-cytophérèse impacte de manière délétère la capacité de récupération des cellules CD34+ contenues dans le compartiment sanguin dans le groupe « Allogénique » et « Autologue ». La corrélation négative existant entre le CE et la concentration sanguine en leucocytes constitue la donnée la plus documentée de la littérature^{68,75,77,78}. La valeur du CE est également dépendante d'autres facteurs biologiques et tout particulièrement du nombre d'érythrocytes, de l'hémoglobine et de l'hématocrite. Dans la population de donneurs sains, plus le taux d'hémoglobine est important, plus le rendement de collecte sera élevé, en adéquation avec les travaux précédemment publiés⁷⁷. Dans le groupe « Autologue », c'est la valeur de l'hématocrite qui conditionne la valeur du CE. Il est à noter que les valeurs des érythrocytes, de l'hématocrite et de l'hémoglobine sont différentes entre les populations féminine et masculine. Ce biais a été exclu en analyse multivariée. En

outre, la proportion d'hommes et de femmes dans les groupes « Allogénique » et « Autologue » sont équivalentes. Un troisième paramètre biologique est constitué par les PNN. Plus la concentration de PNN est importante, meilleur sera le rendement de collecte. Cette relation est significative uniquement dans la population générale et la population « Autologue ».

Ces résultats démontrent ainsi que l'efficacité de collecte est dépendante de la représentativité de chacun des composants sanguins. La séparation des éléments figurés contenus dans le compartiment sanguin par centrifugation fait intervenir des principes physiques. Ainsi, lorsque la proportion de globules rouges diminue, celle de plasma augmente et les forces appliquées sur l'interface cellulaire entre globules rouges et plasma varient. Il en résulte une perturbation de la stabilité de la couche de cellules mononuclées contenant les cellules CD34+. La séparation des composants du sang n'est donc plus optimale diminuant de fait le rendement de collecte. Des interactions cellules-cellules peuvent également limiter les capacités de séparation⁷⁵. Cette hypothèse peut ainsi expliquer pourquoi l'hyperleucocytose peut limiter l'efficacité de récupération des cellules CD34+.

L'étude de la seule population « Autologue » montre que l'administration de plerixafor augmente le rendement de collecte. Ces résultats sont contradictoires avec l'étude de Shade *et al*, qui démontre que le traitement de mobilisation n'a pas d'impact sur la valeur du CE⁷⁹. Nous n'expliquons pas dans ce cas précis comment le plerixafor peut améliorer l'efficacité de collecte (différence de cinétique de mobilisation...). Pour autant, nos résultats et ceux de Schade *et al* démontrent que l'utilisation de plerixafor, ultime recours en cas d'échecs de mobilisation chez les patients, n'affecte pas négativement les capacités de prélèvements des cellules CD34+.

L'étude spécifique des prélèvements dont le rendement de collecte est faible a démontré la faible représentativité de ces cas dans notre étude ; 6,2% des actes totaux et 9,2% des actes autologues présentent une valeur de CE inférieure à 30%. Dans la population « Autologue », le seul paramètre biologique pouvant expliquer les échecs de collecte est la concentration de cellules CD34+/μL de sang. Une des première hypothèse expliquant un faible rendement de collecte malgré une mobilisation

adéquate pourrait être une réduction du volume de sang traité. En effet, selon les procédures internes de l'institut, lorsque la concentration sanguine en cellules CD34⁺ est supérieure à 60 éléments/ μ L, le nombre de masses sanguines peut être réduit à 2. Selon le tableau comparatif susmentionné (tableau VI), le nombre de masse ainsi que le volume de sang traité n'est pas significativement différent de la population ayant un bon rendement de collecte. Cette diminution du volume de sang traité n'est donc pas la cause de la diminution du CE. Une seconde hypothèse pourrait être que le port de collecte, situé à l'extrémité de l'anneau de séparation, ne puisse collecter l'intégralité de cette population cellulaire lorsqu'elle est majoritairement représentée⁷⁶. L'augmentation conjointe des leucocytes et des cellules CD34⁺ pourrait ainsi induire une saturation du port de collecte.

En conclusion, l'efficacité d'un séparateur à isoler les cellules d'intérêt dépend certes de paramètres matériels et opérationnels - dont nous nous sommes affranchis - mais surtout de paramètres biologiques. Ces derniers paramètres ne sont pas à considérer de manière individuelle mais plutôt comme un paramètre multifactoriel. Il en advient que, de la représentativité de l'ensemble des éléments nucléés du sang va dépendre la séparation des cellules mononuclées et l'efficacité de collecte.

Ces résultats interrogent sur les moyens d'optimiser le rendement de collecte par utilisation des paramètres biologiques pré-cytaphérèse afin d'obtenir des greffons satisfaisants en un minimum d'actes de cytapphérèse. Une des principales limites de cette étude est de négliger la potentielle mobilisation de cellules CD34⁺ *in process*. Ce paramètre, difficilement quantifiable, permettrait d'évaluer l'efficacité « réelle » de collecte d'un séparateur. Enfin, une étude permettant de comparer les paramètres impactant les échecs de collecte lors de deux cytapphérèses consécutives chez un même patient, par analyse appariée, permettraient de compléter ces résultats et d'appréhender les paramètres intra-individuels pouvant affecter le rendement de collecte.

CONCLUSION

Notre étude met en évidence que les paramètres biologiques de la personne prélevée conditionne l'efficacité de collecte de l'acte de cytophérèse et, *in fine*, la composition du produit final. A l'heure où les premiers *CAR-T cells*, sont autorisés par la FDA (*Food and Drug Administration*), l'étude des facteurs pouvant altérer la matière première, obtenue par cytophérèse, apparaît particulièrement pertinent⁸⁰. En outre, cette étude pourrait s'inscrire dans un cadre évolutif de la réglementation attenante à une partie des produits de thérapie cellulaire et dont l'ensemble des étapes, de la collecte à la distribution, se doivent désormais de répondre à des exigences de qualité, de sécurité et d'efficacité selon les normes européennes en vigueur^{64,81-83}.

BIBLIOGRAPHIE

1. Thomas, E. D., Lochte, H. L., Cannon, J. H., Sahler, O. D. & Ferrebee, J. W. SUPRALETHAL WHOLE BODY IRRADIATION AND ISOLOGOUS MARROW TRANSPLANTATION IN MAN*. *J. Clin. Invest.* **38**, 1709–1716 (1959).
2. Mathe, G. *et al.* [Transfusions and grafts of homologous bone marrow in humans after accidental high dosage irradiation]. *Rev. Fr. Etud. Clin. Biol.* **4**, 226–238 (1959).
3. Chabannon, C., Calmels, B., Habibi, S., Mohty, M. & Imbert, A.-M. [New molecular targets and new clinical practices for hematopoietic stem cell mobilization]. *Bull. Cancer (Paris)* **98**, 951–961 (2011).
4. Agence de la Biomédecine. Le rapport médical et scientifique de l'Agence de la biomédecine 2015.
5. Masson, E. Allogreffe et autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. *EM-Consulte* Available at: <http://www.em-consulte.com/article/677760/allogreffe-et-autogreffe-de-cellules-souches-hemat>. (Accessed: 18th July 2017)
6. Neefjes, J., Jongma, M. L. M., Paul, P. & Bakke, O. Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 823–836 (2011).
7. Robinson, J. *et al.* The IPD and IMGT/HLA database: allele variant databases. *Nucleic Acids Res.* **43**, D423–D431 (2015).
8. Pidala, J. *et al.* Race/ethnicity affects the probability of finding an HLA-A, -B, -C and -DRB1 allele-matched unrelated donor and likelihood of subsequent transplant utilization. *Bone Marrow Transplant.* **48**, 346–350 (2013).
9. Gragert, L. *et al.* HLA Match Likelihoods for Hematopoietic Stem-Cell Grafts in the U.S. Registry. *N. Engl. J. Med.* **371**, 339–348 (2014).

10. Castagna, L. & Blaise, D. Développement des greffes haplo-identiques chez l'adulte atteint d'une hémopathie maligne. */data/revues/00074551/v99i12/S0007455115303623/* (2015).
11. Plan 2017-2021 pour la greffe de cellules souches hématopoïétiques.
12. Bleakley, M. & Riddell, S. R. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 371–380 (2004).
13. Mathé, G., Amiel, J. L., Schwarzenberg, L., Cattani, A. & Schneider, M. Adoptive Immunotherapy of Acute Leukemia: Experimental and Clinical Results. *Cancer Res.* **25**, 1525–1531 (1965).
14. Horowitz, M. M. *et al.* Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* **75**, 555–562 (1990).
15. Maraninchi, D. *et al.* Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet Lond. Engl.* **2**, 175–178 (1987).
16. Chabannon, C., Blaise, D. & Olive, D. La greffe allogénique de progéniteurs hématopoïétiques comme modèle d'immunothérapie adoptive: mécanismes, applications et perspectives. *Hématologie* **3**, 13–23 (1997).
17. Fruehauf, S. *et al.* Peripheral blood progenitor cell (PBPC) counts during steady-state hematopoiesis allow to estimate the yield of mobilized PBPC after filgrastim (R-metHuG-CSF)-supported cytotoxic chemotherapy. *Blood* **85**, 2619–2626 (1995).
18. Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M. & Frenette, P. S. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* **452**, 442–447 (2008).

19. Jansen, J., Hanks, S., Thompson, J. M., Dugan, M. J. & Akard, L. P. Transplantation of hematopoietic stem cells from the peripheral blood. *J. Cell. Mol. Med.* **9**, 37–50 (2005).
20. Donating stimulated peripheral blood stem cells vs bone marrow: do donors experience the procedures differently? *Publ. Online 23 May 2001 Doi101038sjbmt1703011* **27**, (2001).
21. *LOI n° 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique. 2011-814* (2011).
22. Barrett, A. J., Longhurst, P., Sneath, P. & Watson, J. G. Mobilization of CFU-C by exercise and ACTH induced stress in man. *Exp. Hematol.* **6**, 590–594 (1978).
23. Zaldivar, F., Eliakim, A., Radom-Aizik, S., Leu, S.-Y. & Cooper, D. M. The effect of brief exercise on circulating CD34+ stem cells in early and late pubertal boys. *Pediatr. Res.* **61**, 491–495 (2007).
24. Kollet, O. *et al.* HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *J. Clin. Invest.* **112**, 160–169 (2003).
25. Gomes, A. L., Carvalho, T., Serpa, J., Torre, C. & Dias, S. Hypercholesterolemia promotes bone marrow cell mobilization by perturbing the SDF-1:CXCR4 axis. *Blood* **115**, 3886–3894 (2010).
26. Petit, I. *et al.* G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat. Immunol.* **3**, 687–694 (2002).
27. Canaani, J., Kollet, O. & Lapidot, T. Neural regulation of bone, marrow, and the microenvironment. *Front. Biosci. Sch. Ed.* **3**, 1021–1031 (2011).

28. Lévesque, J. P. *et al.* Mobilization by either cyclophosphamide or granulocyte colony-stimulating factor transforms the bone marrow into a highly proteolytic environment. *Exp. Hematol.* **30**, 440–449 (2002).
29. Base des Médicaments et Informations Tarifaires.
30. *Avis relatif au prix d'une spécialité pharmaceutique publié en application de l'article L. 162-16-6 du code de la sécurité sociale.*
31. Pérez-Simón, J. A. *et al.* Minimal number of circulating CD34+ cells to ensure successful leukapheresis and engraftment in autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Transfusion (Paris)* **38**, 385–391 (1998).
32. Basquiera, A. L. *et al.* The number of CD34(+) cells in peripheral blood as a predictor of the CD34(+) yield in patients going to autologous stem cell transplantation. *J. Clin. Apheresis* **21**, 92–95 (2006).
33. Hequet, O. [The methods used to collect hematopoietic stem cells]. *Transfus. Clin. Biol. J. Soc. Francaise Transfus. Sang.* **18**, 230–234 (2011).
34. Civin, C. I. *et al.* Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **133**, 157–165 (1984).
35. Chabannon, C. Joyeux anniversaire, CD34 ! (2005).
36. Howell, C. *et al.* Guideline on the clinical use of apheresis procedures for the treatment of patients and collection of cellular therapy products. British Committee for Standards in Haematology. *Transfus. Med. Oxf. Engl.* **25**, 57–78 (2015).
37. Ward, D. M. Conventional apheresis therapies: A review. *J. Clin. Apheresis* **26**, 230–238 (2011).

38. Wehrli, G. Therapeutic apheresis instrumentation. *J. Clin. Apheresis* **26**, 286–290 (2011).
39. Halter, J. *et al.* Severe events in donors after allogeneic hematopoietic stem cell donation. *Haematologica* **94**, 94–101 (2009).
40. Bolan, C. D. *et al.* Controlled study of citrate effects and response to i.v. calcium administration during allogeneic peripheral blood progenitor cell donation. *Transfusion (Paris)* **42**, 935–946 (2002).
41. Del Fante, C., Scudeller, L., Viarengo, G., Cervio, M. & Perotti, C. Mononuclear cell collection for extracorporeal photochemotherapy: a study comparing an automatic and a semiautomatic apheresis device. *Transfusion (Paris)* **53**, 2027–2033 (2013).
42. Brauninger, S., Bialleck, H., Thoraus, K., Seifried, E. & Bonig, H. Mobilized allogeneic peripheral stem/progenitor cell apheresis with Spectra Optia v.5.0, a novel, automatic interface-controlled apheresis system: results from the first feasibility trial. *Vox Sang.* **101**, 237–246 (2011).
43. Long, G. *et al.* Evaluation of the spectra Optia® mononuclear cell collection procedure in multiple myeloma patients. *J. Clin. Apheresis* **30**, 1–7 (2015).
44. Drezet, A., Granata, A., Lemarie, C., Calmels, B. & Chabannon, C. An intra-patient comparison of blood cell separators Spectra and Optia in patients and donors undergoing blood mononuclear cell collections at a single institution for subsequent autologous or allogeneic hematopoietic cell transplantation reveals comparable collection efficiencies. *Bone Marrow Transplant.* **51**, 1007–1009 (2016).

45. Westbrook, L. *et al.* Comparison of the Terumo BCT MNC and CmnC Protocols for Peripheral Blood Stem Cell Collections. *Blood* **128**, 5731–5731 (2016).
46. Sanderson, F. *et al.* Peripheral blood stem cells collection on spectra optia apheresis system using the continuous mononuclear cell collection protocol: A single center report of 39 procedures. *J. Clin. Apheresis* **32**, 182–190 (2017).
47. Lisenko, K. *et al.* Comparison between intermittent and continuous spectra optia leukapheresis systems for autologous peripheral blood stem cell collection. *J. Clin. Apheresis* **32**, 27–34 (2017).
48. Lefrère, F. La transfusion des produits de thérapies cellulaires en hématologie. *Hématologie* **18**, 59–66 (2012).
49. Villalón, L. *et al.* Autologous peripheral blood progenitor cell transplantation with $<2 \times 10^6$ CD34(+)/kg: an analysis of variables concerning mobilisation and engraftment. *Hematol. J. Off. J. Eur. Haematol. Assoc.* **1**, 374–381 (2000).
50. Törlén, J. *et al.* Low CD34 dose is associated with poor survival after reduced-intensity conditioning allogeneic transplantation for acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **20**, 1418–1425 (2014).
51. ANSM. RECOMMANDATIONS POUR LE TEST CLONOGENIQUE DES PROGÉNITEURS CFU-GM.
52. Gordan, L. N. *et al.* Correlation of early lymphocyte recovery and progression-free survival after autologous stem-cell transplant in patients with Hodgkin's and non-Hodgkin's Lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* **31**, 1009–1013 (2003).

53. Porrata, L. F. *et al.* Early lymphocyte recovery predicts superior survival after autologous stem cell transplantation in non-Hodgkin Lymphoma: a prospective study. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **14**, 807–816 (2008).
54. Joao, C. *et al.* Early lymphocyte recovery after autologous stem cell transplantation predicts superior survival in mantle-cell lymphoma. *Bone Marrow Transplant.* **37**, 865–871 (2006).
55. Hiwase, D. K., Hiwase, S., Bailey, M., Bollard, G. & Schwarzer, A. P. Higher infused lymphocyte dose predicts higher lymphocyte recovery, which in turn, predicts superior overall survival following autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **14**, 116–124 (2008).
56. Hiwase, D. K., Hiwase, S., Bailey, M., Bollard, G. & Schwarzer, A. P. The role of stem cell mobilization regimen on lymphocyte collection yield in patients with multiple myeloma. *Cytotherapy* **10**, 507–517 (2008).
57. Varmavuo, V. *et al.* Blood graft composition after plerixafor injection in patients with NHL. *Eur. J. Haematol.* **89**, 128–135 (2012).
58. Goldman, J. M. *et al.* Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia in chronic phase. Increased risk for relapse associated with T-cell depletion. *Ann. Intern. Med.* **108**, 806–814 (1988).
59. Saad, A. & Lamb, L. S. Ex vivo T-cell depletion in allogeneic hematopoietic stem cell transplant: past, present and future. *Bone Marrow Transplant.* (2017). doi:10.1038/bmt.2017.22
60. Foïs, E. *et al.* Recovery, viability and clinical toxicity of thawed and washed haematopoietic progenitor cells: analysis of 952 autologous

- peripheral blood stem cell transplantations. *Bone Marrow Transplant.* **40**, 831–835 (2007).
61. Calmels, 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 (Paris)* **47**, 1268–1275 (2007).
62. Rowley, S. D. Hematopoietic stem cell processing and cryopreservation. *J. Clin. Apheresis* **7**, 132–134 (1992).
63. SFGMTC, JACIE. Guide des indicateurs Qualité proposés dans le processus de greffe de cellules souches hématopoiétiques. (2015).
64. Directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules humains.
65. Weaver, C. H. *et al.* An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. *Blood* **86**, 3961–3969 (1995).
66. Shpall, E. J., Champlin, R. & Glaspy, J. A. Effect of CD34+ peripheral blood progenitor cell dose on hematopoietic recovery. *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* **4**, 84–92 (1998).
67. Ketterer, N. *et al.* High CD34(+) cell counts decrease hematologic toxicity of autologous peripheral blood progenitor cell transplantation. *Blood* **91**, 3148–3155 (1998).

68. Verlinden, A., Van de Velde, A., Verpooten, G. A. & Janssen van Doorn, K. Determining factors predictive of CD34+ cell collection efficiency in an effort to avoid extended and repeated apheresis sessions. *J. Clin. Apheresis* **28**, 404–410 (2013).
69. Elliott, C. *et al.* When to harvest peripheral-blood stem cells after mobilization therapy: prediction of CD34-positive cell yield by preceding day CD34-positive concentration in peripheral blood. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **14**, 970–973 (1996).
70. Schots, R. *et al.* The absolute number of circulating CD34+ cells predicts the number of hematopoietic stem cells that can be collected by apheresis. *Bone Marrow Transplant.* **17**, 509–515 (1996).
71. Smolowicz, A. G., Villman, K. & Tidefelt, U. Large-volume apheresis for the harvest of peripheral blood progenitor cells for autologous transplantation. *Transfusion (Paris)* **37**, 188–192 (1997).
72. Lemarie, C. *et al.* A new single-platform method for the enumeration of CD34+ cells. *Cytotherapy* **11**, 804–806, 806.e1 (2009).
73. Rosenbaum, E. R., O'Connell, B. & Cottler-Fox, M. Validation of a formula for predicting daily CD34(+) cell collection by leukapheresis. *Cytotherapy* **14**, 461–466 (2012).
74. Tiwari, A. K. *et al.* Autologous peripheral blood stem cell harvest: Collection efficiency and factors affecting it. *Asian J. Transfus. Sci.* **10**, 93–97 (2016).
75. Ford, C. D., Pace, N. & Lehman, C. Factors affecting the efficiency of collection of CD34-positive peripheral blood cells by a blood cell separator. *Transfusion (Paris)* **38**, 1046–1050 (1998).

76. Sarkodee-Adoo, C. *et al.* Influence of preapheresis clinical factors on the efficiency of CD34+ cell collection by large-volume apheresis. *Bone Marrow Transplant.* **31**, 851–855 (2003).
77. Pornprasertsud, N. *et al.* The use of hematocrit level for predicting the efficiency of peripheral blood CD34(+) cell collection after G-CSF Mobilization in Healthy Donors. *J. Clin. Apheresis* **30**, 329–334 (2015).
78. Gidron, A. *et al.* Can the stem cell mobilization technique influence CD34+ cell collection efficiency of leukapheresis procedures in patients with hematologic malignancies? *Bone Marrow Transplant.* **35**, 243–246 (2005).
79. Schade, H. *et al.* Similar dynamics of intraapheresis autologous CD34+ recruitment and collection efficiency in patients undergoing mobilization with or without plerixafor. *Transfusion (Paris)* **54**, 3131–3137 (2014).
80. Commissioner, O. of the. Press Announcements - FDA approval brings first gene therapy to the United States. Available at: <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm574058.htm>. (Accessed: 18th September 2017)
81. *Directive Européenne n°2003-94 du 8 octobre 2003 de la Commission établissant les principes et lignes directrices de bonnes pratiques de fabrication concernant les médicaments à usage humain et les médicaments expérimentaux à usage humain (texte présentant de l'intérêt pour l'EEE).*
82. *Directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain.*

83. Reglement européen n°1394/2007. Available at: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A32007R1394>.

(Accessed: 17th June 2017)

ANNEXES

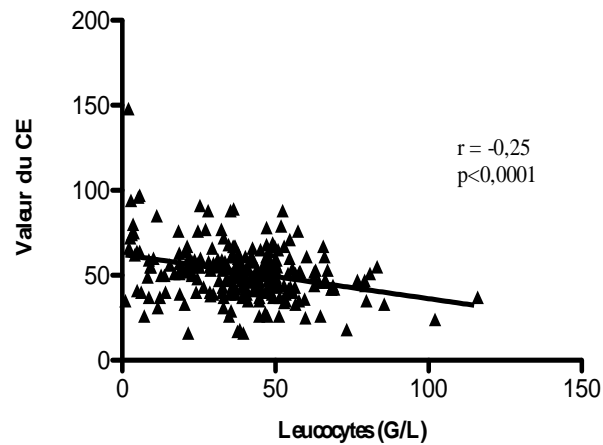
Annexe 1 : Estimation du volume sanguin en fonction des paramètres patients.*D'après les règles de Gilcher.*

| | Volume sanguin (mL/kg de poids corporel) | | | |
|--------|------------------------------------------|--------|--------|------------|
| | Obèse | Maigre | Normal | Athlétique |
| Homme | 60 | 65 | 70 | 75 |
| Femme | 55 | 60 | 65 | 70 |
| Enfant | -- | | 80-70 | - |

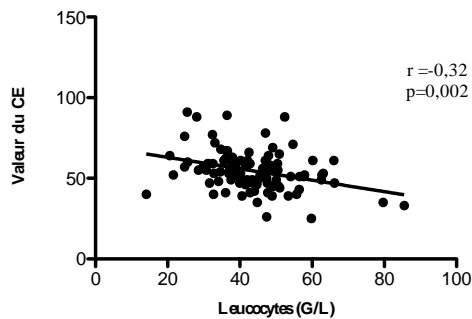
Annexe 2 : Corrélations linéaires entre valeur du Collection Efficiency et paramètres biologiques.

La valeur de r représente la valeur du coefficient de corrélation de Pearson.

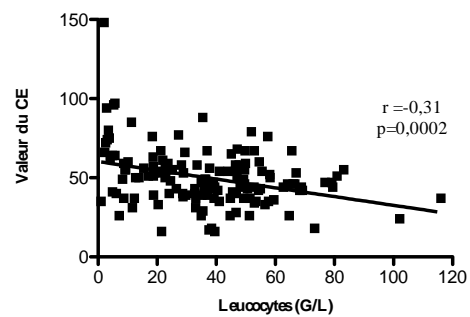
A. Leucocytes sanguins et valeur du CE dans la population globale



B. Leucocytes sanguins et valeur du CE dans les sous-groupes « Allogénique » et « Autologue ».

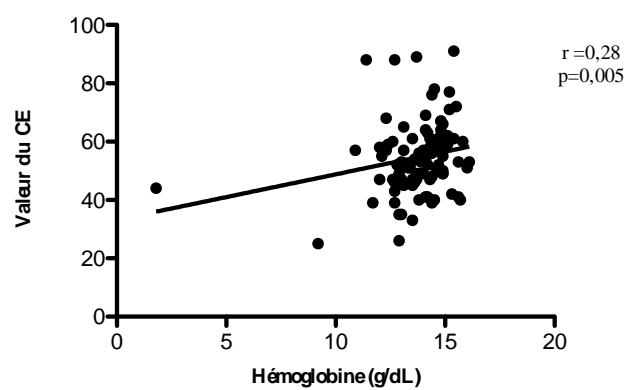


ALLOGENIQUE



AUTOLOGUE

C. Hémoglobine et valeur du CE dans le sous-groupe « Allogénique »



Annexe 3 : Effet indépendant des facteurs de confusion évalué par analyse multivariée (version 2).

Les facteurs de confusion inclus dans les analyses multivariées sont sélectionnées par la méthode « stepwise » (p-valeur d'entrée<0,2, p-valeur de sortie >0,05) pour chaque population. Pour la population globale, le type de greffe est inclus de manière forcée dans la régression. Les champs correspondant à des blancs dans le tableau signifient que les variables n'ont pas été sélectionnées par la méthode « stepwise » et ne font donc pas partie de la régression.

| Variable | | Modalités | | Tous les prélèvements (n = 241) | | | Allogénique (n = 99) | | | Autologue (n = 142) | | |
|-------------------------------------|--------------|------------|--------------------|---------------------------------|------------|-------------------|----------------------|------------|-------------------|---------------------|--|--|
| | | Estimation | IC ₉₅ | p | Estimation | IC ₉₅ | p | Estimation | IC ₉₅ | p | | |
| Paramètres physiologiques | | | | | | | | | | | | |
| Type de greffe | Auto vs Allo | -0,012 | [-0,0125 ; 0,1017] | 0,8378 | - | - | - | - | - | - | | |
| Mobilisation | | | | | | | | | | | | |
| Ajout de mozobil | Oui vs Non | - | - | - | - | - | - | 0,1998 | [0,0504 ; 0,3492] | 0,0092 | | |
| Paramètres du prélèvement | | | | | | | | | | | | |
| Volume de sang traité | NA | 0,0157 | [0,0016 ; 0,0297] | 0,0289 | - | - | - | - | - | - | | |
| Paramètres biologiques pré-aphérèse | | | | | | | | | | | | |
| Erythrocytes | NA | 0,0202 | [0,0047 ; 0,0358] | 0,0111 | - | - | - | - | - | - | | |
| Hématocrite | NA | - | - | - | - | - | - | 0,0143 | [0,0044 ; 0,0243] | 0,0049 | | |
| Hémoglobine | NA | 0,0369 | [0,0081 ; 0,0657] | 0,0122 | 0,0568 | [0,0202 ; 0,093] | 0,0028 | - | - | - | | |
| Leucocytes | NA | -0,024 | [-0,034 ; -0,013] | <0,0001 | -0,006 | [-0,01 ; -0,002] | 0,0049 | -0,028 | [-0,04 ; -0,016] | <0,0001 | | |
| PNN | NA | 0,0222 | [0,0099 ; 0,0345] | 0,0005 | - | - | - | 0,0251 | [0,0113 ; 0,0389] | 0,0004 | | |
| % CD34 | NA | - | - | - | -0,509 | [-0,983 ; -0,035] | 0,0357 | - | - | - | | |