



HAL
open science

Prélèvement de sang placentaire pour la banque de sang placentaire allogénique du CHU de Nancy : analyse des causes de non inscription des unités de sang placentaire sur le registre national

Clotilde Molter

► To cite this version:

Clotilde Molter. Prélèvement de sang placentaire pour la banque de sang placentaire allogénique du CHU de Nancy : analyse des causes de non inscription des unités de sang placentaire sur le registre national. Sciences pharmaceutiques. 2014. hal-01732629

HAL Id: hal-01732629

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732629>

Submitted on 14 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE

2014

FACULTE DE PHARMACIE

T H E S E

Présentée et soutenue publiquement

Le 29 septembre 2014

Sur un sujet dédié au :

**PRELEVEMENT DE SANG PLACENTAIRE POUR LA
BANQUE DE SANG PLACENTAIRE ALLOGENIQUE DU
CHU DE NANCY : ANALYSE DES CAUSES DE NON
INSCRIPTION DES UNITES DE SANG PLACENTAIRE
SUR LE REGISTRE NATIONAL**

Pour obtenir

Le Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

Par **MOLTER Clotilde**

Née le 14 février 1987 à Metz (57)

Membres du Jury

Présidente : **Dr D. BENSOUSSAN**, Docteur en pharmacie, Professeur des Universités,
Praticien hospitalier, Responsable de la Banque
de Sang Placentaire au CHU de Nancy

Juges : **Dr S. BULTEL** Docteur en pharmacie,
Praticien hospitalier au CHU de Nancy

Dr A. KENNEL Docteur en pharmacie,
Praticien hospitalier au CHU de Nancy

Dr J. PERRIN Docteur en pharmacie, Maître de conférences,
Praticien hospitalier au CHU de Nancy

Dr P. JEANDAT Docteur en Pharmacie

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2014-2015**

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Brigitte LEININGER-MULLER

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Chantal FINANCE

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Responsable de la filière Officine :

Responsables de la filière Industrie :

Responsable de la filière Hôpital :

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :

Francine KEDZIEREWICZ

Béatrice FAIVRE

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Maurice HOFFMANN

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Lucien LALLOZ

Pierre LECTARD

Vincent LOPPINET

Marcel MIRJOLET

Maurice PIERFITTE

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

Blandine MOREAU

Dominique NOTTER

Christine PERDICAKIS

Marie-France POCHON

Anne ROVEL

Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE

Annie PAVIS

ENSEIGNANTSSection
CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

| | | |
|--------------------------------|----|--------------------------------------------------|
| Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ | 82 | Thérapie cellulaire |
| Chantal FINANCE | 82 | Virologie, Immunologie |
| Jean-Louis MERLIN | 82 | Biologie cellulaire |
| Alain NICOLAS | 80 | Chimie analytique et Bromatologie |
| Jean-Michel SIMON | 81 | Economie de la santé, Législation pharmaceutique |

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

| | | |
|-------------------------------|----|----------------------------------|
| Jean-Claude BLOCK | 87 | Santé publique |
| Christine CAPDEVILLE-ATKINSON | 86 | Pharmacologie |
| Raphaël DUVAL | 87 | Microbiologie clinique |
| Béatrice FAIVRE | 87 | Biologie cellulaire, Hématologie |
| Luc FERRARI | 86 | Toxicologie |
| Pascale FRIANT-MICHEL | 85 | Mathématiques, Physique |
| Christophe GANTZER | 87 | Microbiologie |
| Frédéric JORAND | 87 | Environnement et Santé |
| Isabelle LARTAUD | 86 | Pharmacologie |
| Dominique LAURAIN-MATTAR | 86 | Pharmacognosie |
| Brigitte LEININGER-MULLER | 87 | Biochimie |
| Pierre LEROY | 85 | Chimie physique |
| Philippe MAINCENT | 85 | Pharmacie galénique |
| Alain MARSURA | 32 | Chimie organique |
| Patrick MENU | 86 | Physiologie |
| Jean-Bernard REGNOUF de VAINS | 86 | Chimie thérapeutique |
| Bertrand RIHN | 87 | Biochimie, Biologie moléculaire |

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

| | | |
|-----------------|----|---------------------------------------------------|
| Béatrice DEMORE | 81 | Pharmacie clinique |
| Julien PERRIN | 82 | Hématologie biologique |
| Marie SOCHA | 81 | Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique |
| Nathalie THILLY | 81 | Santé publique |

MAITRES DE CONFÉRENCES

| | | |
|-------------------|----|----------------------------------------|
| Sandrine BANAS | 87 | Parasitologie |
| Xavier BELLANGER | 87 | Parasitologie, Mycologie médicale |
| Emmanuelle BENOIT | 86 | Communication et Santé |
| Isabelle BERTRAND | 87 | Microbiologie |
| Michel BOISBRUN | 86 | Chimie thérapeutique |
| François BONNEAUX | 86 | Chimie thérapeutique |
| Ariane BOUDIER | 85 | Chimie Physique |
| Cédric BOURA | 86 | Physiologie |
| Igor CLAROT | 85 | Chimie analytique |
| Joël COULON | 87 | Biochimie |
| Sébastien DADE | 85 | Bio-informatique |
| Dominique DECOLIN | 85 | Chimie analytique |
| Roudayna DIAB | 85 | Pharmacie galénique |
| Natacha DREUMONT | 87 | Biochimie générale, Biochimie clinique |
| Joël DUCOURNEAU | 85 | Biophysique, Acoustique |

| ENSEIGNANTS (suite) | Section CNU* | Discipline d'enseignement |
|-------------------------|-----------------|---------------------------------------|
| Florence DUMARCAY | 86 | Chimie thérapeutique |
| François DUPUIS | 86 | Pharmacologie |
| Adil FAIZ | 85 | Biophysique, Acoustique |
| Anthony GANDIN | 87 | Mycologie, Botanique |
| Caroline GAUCHER | 85/86 | Chimie physique, Pharmacologie |
| Stéphane GIBAUD | 86 | Pharmacie clinique |
| Thierry HUMBERT | 86 | Chimie organique |
| Olivier JOUBERT | 86 | Toxicologie, Hygiène sanitaire |
| Francine KEDZIEREWICZ | 85 | Pharmacie galénique |
| Alexandrine LAMBERT | 85 | Informatique, Biostatistiques |
| Julie LEONHARD | 86 | Droit en Santé |
| Faten MERHI-SOUSSI | 87 | Hématologie |
| Christophe MERLIN | 87 | Microbiologie |
| Maxime MOURER | 86 | Chimie organique |
| Coumba NDIAYE | 86 | Epidémiologie et Santé publique |
| Francine PAULUS | 85 | Informatique |
| Caroline PERRIN-SARRADO | 86 | Pharmacologie |
| Virginie PICHON | 85 | Biophysique |
| Sophie PINEL | 85 | Informatique en Santé (e-santé) |
| Anne SAPIN-MINET | 85 | Pharmacie galénique |
| Marie-Paule SAUDER | 87 | Mycologie, Botanique |
| Rosella SPINA | 86 | Pharmacognosie |
| Gabriel TROCKLE | 86 | Pharmacologie |
| Mihayl VARBANOV | 87 | Immuno-Virologie |
| Marie-Noëlle VAULTIER | 87 | Mycologie, Botanique |
| Emilie VELOT | 86 | Physiologie-Physiopathologie humaines |
| Mohamed ZAIYOU | 87 | Biochimie et Biologie moléculaire |
| Colette ZINUTTI | 85 | Pharmacie galénique |
| PROFESSEUR ASSOCIE | | |
| Anne MAHEUT-BOSSER | 86 | Sémiologie |
| PROFESSEUR AGREGE | | |
| Christophe COCHAUD | 11 | Anglais |

*Disciplines du Conseil National des Universités

:

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

32 : Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

Remerciements

A Madame Danièle BENSOUSSAN,

Merci d'avoir accepté de diriger et de présider cette thèse. J'ai eu beaucoup de plaisir à travailler avec vous sur ce sujet. J'espère que ce travail sera à la hauteur de vos espérances. Merci pour votre disponibilité, votre écoute, vos conseils et surtout votre patience. Soyez assurée de mon profond respect et de ma reconnaissance.

A Madame Stéphanie BULTEL,

Merci de votre aide et votre disponibilité lors de la rédaction de cette thèse. Merci également d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A Madame Anne KENNEL,

Merci d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Veuillez trouver ici le témoignage de mon plus profond respect.

A Monsieur Julien PERRIN,

Merci d'avoir accepté de juger ce travail. Veuillez trouver ici, l'expression de mon respect et de ma gratitude.

A Monsieur Pascal JEANDAT,

Merci pour ton soutien, tes conseils et ta patience lors de mon stage de 6^{ème} année. Merci également d'avoir accepté de faire partie de ce jury.

A mes parents, Laurence et Paul

Merci de m'avoir donné l'opportunité et les moyens de faire ces études qui se clôturent aujourd'hui avec cette thèse. Merci de m'avoir guidée et soutenue tout au long de ces années.

A mes grands-parents, Thérèse, Marie, Germain et Albert

Merci pour votre soutien et vos encouragements. Merci pour toute l'affection et pour toutes les valeurs que vous m'avez transmises.

A mes frères, Romain et Alexis

Merci pour votre soutien et vos encouragements. Merci d'avoir toujours cru en moi.

A Ludovic,

Merci pour ta confiance, ton attention, ton amour et ton soutien au quotidien.

A l'ensemble de ma famille, mes oncles et tantes, cousins, cousines et à l'ensemble de la famille de Ludovic,

Merci pour vos encouragements tout au long de mon parcours et votre présence malgré parfois la distance. Merci également à Michael qui fait un peu partie de cette famille.

A mes amis d'enfance,

Romina, Audrey, Sarah, Alexandre, après toutes ces années, c'est toujours un plaisir de vous retrouver.

A mes amis du lycée Fabert,

Marie, Héloïse, Laurent, Xavier, Nicolas, Charlotte, Tristan, Stéphane, Ophélie, merci à tous pour tous ces bons moments partagés ensemble.

A mes amies de la faculté de pharmacie,

Amélie, Hélène, Emilie, Clémence, Lucie, Madeline, Clarisse,
Charlène, Adeline, Laetitia, Anne-Sophie, Florence, Morgane,
merci à toutes pour votre bonne humeur durant toutes ces
années passées ensemble en cours, en TP et en soirées. Merci
également à Romina et Héloïse que j'ai eu le plaisir de
retrouver à la faculté de pharmacie après l'école primaire ou le
lycée.

Aux membres de la pharmacie Guittin à Mars-la-Tour,

Merci de m'avoir offert mon premier travail en officine. Merci à
toute l'équipe officinale pour leurs enseignements et leurs
conseils.

Aux membres de la pharmacie Martin à Ludres,

Merci à toute l'équipe officinale de m'avoir accueilli aussi
chaleureusement. Mon stage de 6^{ème} année reste un très bon
souvenir.

Aux membres de la pharmacie Bertrand à Thaon-les-Vosges,

Merci à tous pour votre soutien et votre confiance.

Table des matières

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|----|
| Table des figures | 6 |
| Table des tableaux..... | 7 |
| Abréviations | 8 |
| Introduction | 10 |
| 1. Le sang, rappel bibliographique | 11 |
| 1.1 L'hématopoïèse | 11 |
| 1.1.1 Période pré-hépatique..... | 12 |
| 1.1.2 Période hépato-splénique | 12 |
| 1.1.3 Période lympho-médullaire..... | 12 |
| 1.1.4 Après la naissance..... | 13 |
| 1.2 Les cellules souches..... | 14 |
| 1.2.1 Totipotence | 14 |
| 1.2.2 Pluripotence et multipotence | 14 |
| 1.3 De la cellule souche hématopoïétique (CSH) aux cellules matures | 16 |
| 1.3.1 Les cellules souches multipotentes | 17 |
| 1.3.1.1 Propriétés | 17 |
| 1.3.1.2 Expérience de Till et McCulloch..... | 18 |
| 1.3.1.3 Clusters de différenciation | 18 |
| 1.3.2 Les progéniteurs | 19 |
| 1.3.2.1 Les progéniteurs érythroïdes | 21 |
| 1.3.2.2 Les progéniteurs des neutrophiles et des macrophages..... | 21 |
| 1.3.2.3 Les progéniteurs des éosinophiles et des basophiles | 21 |
| 1.3.2.4 Les progéniteurs mégacaryocytaires | 21 |
| 1.3.2.5 Les progéniteurs lymphoïdes..... | 22 |
| 1.3.3 Les précurseurs | 22 |
| 1.3.4 Les cellules matures..... | 23 |
| 1.4 Le micro-environnement hématopoïétique..... | 25 |
| ~ La moelle rouge | 25 |
| ~ La moelle jaune..... | 25 |
| 1.4.1 Les cellules stromales | 26 |
| 1.4.2 La matrice extracellulaire | 26 |

| | | |
|---------|-----------------------------------------------------|----|
| 1.5 | La niche hématopoïétique..... | 27 |
| 1.5.1 | La notion de niche..... | 27 |
| 1.5.2 | Migration des cellules ou « homing » | 27 |
| 1.6 | Fonctions des cellules sanguines | 29 |
| 1.6.1 | Les hématies ou globules rouges..... | 29 |
| 1.6.2 | Les granulocytes ou polynucléaires..... | 29 |
| 1.6.3 | Les plaquettes (ou thrombocytes) | 29 |
| 1.6.4 | Les monocytes | 30 |
| 1.6.5 | Les lymphocytes | 30 |
| 1.7 | La régulation de l'hématopoïèse | 31 |
| 1.7.1 | Régulation positive..... | 32 |
| 1.7.1.1 | Facteurs types CSF..... | 32 |
| 1.7.1.2 | Facteurs synergiques | 32 |
| 1.7.2 | Régulation négative..... | 32 |
| 2. | Le sang placentaire..... | 34 |
| 2.1 | Les cellules du sang placentaire..... | 34 |
| 2.2 | La prolifération des cellules | 34 |
| 2.3 | Les caractéristiques immunitaires..... | 35 |
| 2.4 | La quantité de sang placentaire..... | 35 |
| 3. | La greffe de cellules souches..... | 36 |
| 3.1 | Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) | 36 |
| 3.1.1 | Les antigènes HLA de classe I | 37 |
| 3.1.2 | Les antigènes HLA de classe II | 38 |
| 3.1.3 | Les antigènes HLA de classe III | 38 |
| 3.2 | Les réactions allogéniques après la greffe..... | 40 |
| 3.2.1 | La maladie du greffon contre l'hôte (GVH) | 40 |
| 3.2.2 | L'effet du greffon contre la leucémie (GVL) | 42 |
| 3.2.3 | Le rejet de la greffe par le receveur (HVG)..... | 42 |
| 3.3 | Les différents types de greffe..... | 43 |
| 3.3.1 | Auto-greffe | 43 |
| 3.3.2 | Greffe syngénique ou isogénique | 43 |
| 3.3.3 | Greffe allogénique..... | 43 |

| | | |
|---------|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.3.3.1 | Donneur géno-identique : | 43 |
| 3.3.3.2 | Donneur non apparenté : | 44 |
| 3.3.3.3 | Donneur haplo-identique : | 44 |
| 3.3.4 | Les sources de CSH | 44 |
| 3.4 | Greffe de moelle osseuse | 45 |
| 3.5 | Greffe de cellules souches périphériques | 47 |
| 3.6 | Greffe de sang placentaire..... | 50 |
| 3.6.1 | Le sang placentaire | 50 |
| 3.6.2 | Avantages | 50 |
| 3.6.2.1 | Pas de risque au moment du prélèvement..... | 50 |
| 3.6.2.2 | Simplicité d'obtention..... | 50 |
| 3.6.2.3 | Un nombre de donneur potentiellement plus élevé grâce à une tolérance HLA | 50 |
| 3.6.2.4 | Une plus faible incidence et sévérité de GVH | 50 |
| 3.6.2.5 | Peu de risque de transmission de maladies infectieuses | 51 |
| 3.6.2.6 | Disponibilité rapide | 51 |
| 3.6.2.7 | Meilleure représentation des minorités | 51 |
| 3.6.2.8 | Excellentes capacités prolifératives | 52 |
| 3.6.3 | Inconvénients | 52 |
| 3.6.3.1 | Quantité de cellules limitées | 52 |
| 3.6.3.2 | Pas de complément possible | 52 |
| 3.6.3.3 | Retard dans la prise de la greffe..... | 53 |
| 3.6.3.4 | Risque potentiel de transmission de maladie génétique | 53 |
| 3.6.3.5 | Diminution possible de l'effet anti- leucémique | 53 |
| 3.6.4 | De la première greffe à nos jours | 53 |
| 4. | L'étude | 60 |
| 4.1 | Objectif de l'étude..... | 60 |
| 4.2 | Matériel et méthodes | 60 |
| 4.2.1 | Type d'étude | 60 |
| 4.2.2 | Population | 60 |
| 4.2.3 | Recueil des données..... | 61 |
| 4.2.4 | Référentiels | 61 |
| 4.2.5 | Période d'étude | 61 |
| 4.2.6 | Critères de qualité | 61 |

| | | |
|---------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.6.1 | Critères de conformité des USP à la réception à l'UTCT | 62 |
| 4.2.6.2 | Spécifications des USP après miniaturisation et avant la congélation.. | 62 |
| 4.2.6.3 | Critères de conformité des marqueurs biologiques | 62 |
| 4.2.7 | Critères de prélèvement | 63 |
| 4.2.7.1 | La maternité et la banque de sang placentaire | 63 |
| 4.2.7.2 | Le consentement et l'entretien médical prénatal | 63 |
| 4.2.7.3 | Les préleveurs | 64 |
| 4.2.7.4 | Le prélèvement..... | 64 |
| 4.2.7.5 | Réception de l'USP à la BSP | 65 |
| 4.2.7.6 | L'enfant | 66 |
| 4.2.7.7 | La mère | 67 |
| 4.2.7.8 | Cession d'une USP | 67 |
| 4.2.8 | Analyse statistique | 67 |
| 5. | Résultats | 69 |
| 5.1 | Etat des USP prélevées..... | 69 |
| 5.1.1 | USP détruites à la réception | 69 |
| 5.1.2 | USP détruites après préparation | 69 |
| 5.1.3 | USP congelées | 69 |
| 5.1.4 | USP utilisée pour la greffe..... | 69 |
| 5.2 | Délai de réception des USP | 70 |
| 5.3 | Délai de congélation des USP | 71 |
| 5.4 | Causes de destruction des USP | 72 |
| 5.4.1 | Volume de l'USP trop faible..... | 72 |
| 5.4.2 | CNT < $1,4 \cdot 10^9$ à la réception | 73 |
| 5.4.3 | CNT < $1,0 \cdot 10^9$ au moment de la congélation | 74 |
| 5.4.4 | Cellules CD34+ < $1,8 \cdot 10^6$ au moment de la congélation..... | 75 |
| 5.4.5 | Contaminations microbiennes de l'USP..... | 76 |
| 5.4.6 | Autres causes | 76 |
| 5.5 | Lien entre le volume et le nombre de CNT à la réception | 77 |
| 5.6 | Lien entre le nombre de cellules CD34+ à la congélation et le nombre de CNT à la réception | 78 |
| 5.7 | Hémoglobinopathies | 79 |

| | | |
|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 5.8 | Caractéristiques des 85 USP inscrites sur le registre en 2013 comparativement aux chiffres nationaux | 80 |
| 5.8.1 | Richesse en CNT et en cellules CD34+ à la congélation..... | 80 |
| 5.8.2 | Typage HLA | 82 |
| 6. | Discussion..... | 86 |
| 6.1 | Les causes de non inscription des USP sur le registre | 87 |
| 6.1.1 | Le volume de départ..... | 87 |
| 6.1.2 | Le taux de CNT | 87 |
| 6.1.3 | Le taux de CNT avant congélation | 88 |
| 6.1.4 | Le taux de cellules CD34+ | 88 |
| 6.1.5 | Le contrôle bactériologique | 89 |
| 6.2 | Intérêt des USP de la BSP de Nancy congelées en 2013 | 90 |
| 6.2.1 | HLA..... | 90 |
| 6.2.2 | La quantité de CNT | 91 |
| 6.3 | Evolutions et perspectives du RFSP et de BSP nationales | 91 |
| | Conclusion | 93 |
| | Bibliographie | 94 |
| | Annexes..... | 102 |
| | Annexe 1 : Information sur le don placentaire et consentement | 102 |
| | Annexe 2 : Fiche de qualification clinique néo-natale..... | 105 |
| | Annexe 3 : Fiche de qualification clinique post-natale | 106 |
| | Annexe 4 : Entretien médical | 107 |
| | Annexe 5 : Tests statistiques | 111 |
| | Annexe 5.1 | 111 |
| | Annexe 5.2 | 111 |
| | Annexe 5.3 | 112 |
| | Annexe 5.4 | 112 |
| | Annexe 5.5 | 113 |
| | Annexe 5.6 | 113 |
| | Annexe 5.7 | 114 |
| | Annexe 5.8 | 114 |
| | Annexe 6 : Les principales causes de destruction dans 10 BSP françaises..... | 115 |
| | Annexe 7 : Le coût d'une USP à la BSP de Nancy | 116 |
| | Résumé : | 118 |

Table des figures

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1 : Développement embryonnaire et fœtal de l'hématopoïèse..... | 13 |
| Figure 2 : La hiérarchie des cellules souches (Sieveking and Ng, 2009)..... | 15 |
| Figure 3 : Schéma de l'hématopoïèse | 24 |
| Figure 4 : Schéma général de la filiation des éléments des différents compartiments de l'hématopoïèse normal chez l'homme..... | 33 |
| Figure 5 : Organisation génomique de la région HLA sur le bras court du chromosome 6 | 39 |
| Figure 6 : Alloréactivité après greffe de cellules souches hématopoïétiques..... | 40 |
| Figure 7 : Évolution de la répartition des sources de greffons des cellules souches hématopoïétiques allogéniques (Bijou <i>et al.</i> , 2011) | 44 |
| Figure 8 : Prélèvement de moelle osseuse | 45 |
| Figure 9 : Prélèvement de cellules souches périphériques..... | 48 |
| Figure 10 : Évolution du nombre de prélèvements d'unités de sang placentaire au sein du Réseau français de sang placentaire (Rouard <i>et al.</i> , 2013)..... | 55 |
| Figure 11 : Situation du Réseau Français de Sang Placentaire en décembre 2012 (Le don, le prélèvement et la greffe de moelle osseuse - Agence de la biomédecine)..... | 59 |
| Figure 12 : Prélèvement du sang de cordon..... | 65 |
| Figure 13 : Logigramme du prélèvement à l'inscription de l'USP sur le registre national | 68 |
| Figure 14 : Répartition des USP : 4 états différents..... | 70 |
| Figure 15 : Nombre de CNT à la réception en fonction du délai de réception des prélèvements à la BSP..... | 71 |
| Figure 16 : Les causes de destruction et leurs pourcentages..... | 72 |
| Figure 17 : Nombre de CNT à la réception à la BSP en fonction du volume de l'USP | 77 |
| Figure 18 : Nombre de cellules CD34+ au moment de la congélation en fonction du nombre de CNT à la réception de l'USP | 78 |
| Figure 19 : Répartition des USP stockées en France en 2013 selon leur richesse cellulaire (CNT) | 80 |
| Figure 20 : Répartition des USP prélevées à Nancy en 2013 et inscrites selon leur richesse cellulaire (CNT) | 80 |
| Figure 21 : USP nationales ayant fait l'objet d'une demande en 2013..... | 81 |
| Figure 22 : USP nationales cédées en 2013 | 81 |

Table des tableaux

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau I : Les progéniteurs des différentes lignées | 20 |
| Tableau II : Du précurseur à la cellule mature | 23 |
| Tableau III : Principales cytokines agissant sur les cellules souches hématopoïétiques et les précurseurs engagés chez l'homme (Bidri and Arock, 1996)..... | 32 |
| Tableau IV : Délai d'acheminement des USP | 70 |
| Tableau V : Volume des USP (ml)..... | 73 |
| Tableau VI : Nombre de CNT à la réception ($\times 10^9$) | 74 |
| Tableau VII : Nombre de CNT au moment de la congélation ($\times 10^9$) | 75 |
| Tableau VIII : Nombre de cellules CD34+ au moment de la congélation de l'USP ($\times 10^6$)..... | 75 |
| Tableau IX : Nombre de CNT et de cellules CD34+ pour les USP ayant fait l'objet d'une demande et les USP cédées au cours de l'année 2013 | 82 |
| Tableau X : Nombre d'USP disponibles pour greffe en fonction de la richesse en CNT | 82 |
| Tableau XI : Liste des 25 haplotypes HLA-A, B, DR..... | 83 |
| Tableau XII : Analyse des Haplotypes HLA- A, B, DR retrouvés à la BSP de Nancy selon la liste des 25 haplotypes les plus fréquents du registre..... | 84 |
| Tableau XIII : Analyse des Haplotypes HLA- A, B, DR selon la liste des 25 haplotypes les plus fréquents dans le fichier des USP inscrites en 2013 sur le registre national | 84 |

Abréviations

ABM : Agence de la Biomédecine

ADN : Acide Désoxyribonucléique

AFA : African American (Africains, Américains)

API : Asian-Pacific Islander (Asiatiques et habitants des îles du Pacifique)

BFU-E : Burst Forming Unit – Erythrocyte

BSP : Banque de Sang Placentaire

CAU : Caucasian (Caucasiens)

CD : Cluster de Différentiation

CD34 : Cluster de Différenciation numéro 34

CFU : Colony Forming Unit (Cellules formant des colonies)

CFU-Ba : Colony Forming Unit - Basophile

CFU-Eo : Colony Forming Unit - Eosinophile

CFU-G : Colony Forming Unit - Granulocyte

CFU-GEMM : Colony Forming Unit - Granulocyte, Erythrocyte, Macrophage et Mégacaryocyte.

CFU-GM : Colony Forming Unit – Granulocyte, Macrophage

CFU-L : Colony Forming Unit - Lymphocyte

CFU-M : Colony Forming Unit - Macrophage

CFU-Mk : Colony Forming Unit - Mégacaryocyte

CFUs : Colony Forming Unit in the Spleen

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CMV : Cytomégalovirus

CNT : Cellules Nucléées Totales

CPD-A : citrate phosphate dextrose adenine

CSF : Colony Stimulating Factor

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSM : Cellules Souches Mésoenchymateuses

CSP : Cellules Souches Périphériques

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DVMO : Donneur Volontaire de Moelle Osseuse

EBV : Epstein Barr Virus

EPO : Erythropoïétine

FCH : Facteurs de Croissance Hématopoïétiques

FGM : France Greffe de Moelle
G-CSF : Granulocyte - Colony Stimulating Factor
GM-CSF : Granulocyte, Macrophage – Colony Stimulating Factor
GVH : Greffon Versus Hôte
GVL : Greffon Versus Leucémie
HBV ou **VHB** : Virus de l'Hépatite B
HCV ou **VHC** : Virus de l'Hépatite C
HES : hydroxyéthylstarch
HIV ou **VIH** : Virus de l'Immunodéficience Humaine
HIS : Hispanic (Hispaniques)
HLA : Human Leucocyte Antigens
HTLV : Virus T Lymphotropique Humain
IgG : Immunoglobuline G
IgM : Immunoglobuline M
IL : Interleukine
KO : Knock-Out (Inactivation)
LIF : Leukemia Inhibitory Factor
MALT : Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MO : Moelle Osseuse
PCR : Réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction)
SCF : Stem Cell Factor
TCR : Récepteur des cellules T (T Cell Receptor)
TPO : Thrombopoïétine
USP : Unité de Sang Placentaire
UTCT : Unité de Thérapie Cellulaire et banque de Tissus

Introduction

Le sang placentaire renferme des quantités importantes de cellules souches hématopoïétiques capables de reconstituer, après injection à un individu, une hématopoïèse à long terme chez ce dernier. De ce fait, le sang placentaire est devenu, depuis une trentaine d'années, une source de greffon pour la réalisation de greffes de cellules souches hématopoïétiques allogéniques aussi bien chez les enfants que chez les adultes.

En France, le don de sang placentaire est un don volontaire, anonyme, gratuit et pour autrui conformément à la loi no 2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique. Ce don est sans danger ni pour la mère ni pour l'enfant. La collecte de sang placentaire à visée autologue, qui ne repose sur aucun fondement scientifique, est illégale en France. Cependant, la collecte de sang à visée intrafamiliale est autorisée.

Située au CHU de Brabois, la Banque de Sang Placentaire (BSP) de Nancy a ouvert ses portes le 19 novembre 2012. Cette BSP est conventionnée à la Polyclinique Majorelle qui s'occupe du recrutement des mères et du prélèvement des Unités de Sang Placentaire (USP). Le Réseau Français de Sang Placentaire (RFSP), créé en janvier 1999 par l'Agence de Biomédecine (ABM), a mis en place des critères stricts de sélection des USP mis en banque. Parmi tous les prélèvements réceptionnés à la BSP, de très nombreux sont éliminés dès le départ pour des causes plus ou moins fréquentes : volume sanguin trop faible, nombre de cellules nucléées totales (CNT) trop faible, contamination microbienne, problème au moment de la congélation... Nous allons étudier dans ce travail s'il existe des moyens de limiter certaines causes d'élimination afin d'obtenir un meilleur rendement d'USP inscrites sur le registre national par rapport à tous les prélèvements effectués.

Deux facteurs sont pris en compte lors de la cession d'une USP en vue d'une greffe de CSH : la compatibilité entre le donneur et le receveur et le nombre de CNT en fonction du poids du receveur. Nous allons décrire ici les caractéristiques des USP inscrites sur le registre national par la BSP de Nancy afin de déterminer si ces nouvelles USP inscrites apportent quelque chose de plus par rapport à toutes les USP déjà inscrites sur le registre.

1. Le sang, rappel bibliographique

1.1 L'hématopoïèse

L'hématopoïèse provient du grec *haímatos* (« du sang ») et *poiésis* (« création »). L'hématopoïèse est le processus physiologique à partir duquel vont naître les éléments figurés du sang : globules rouges, polynucléaires, lymphocytes, monocytes et plaquettes. La régulation de la production cellulaire est remarquablement organisée pour maintenir un parfait équilibre physiologique entre la production et la disparition des différentes cellules sanguines et pour répondre à des besoins exceptionnels (Najman and Potron, 1994). Pour cela, on note l'intervention de nombreuses cytokines et des facteurs de croissance (Fauchet and Ifrah, 1995).

La concentration cellulaire se maintient constante à l'état physiologique, malgré les pertes cellulaires journalières : c'est l'homéostasie. La production journalière est estimée à : 1 à $2,5 \cdot 10^{12}$ globules rouges, 1 à $2,5 \cdot 10^{12}$ plaquettes et 50 à $100 \cdot 10^9$ globules blancs. Ceci s'explique par la durée de vie limitée des éléments figurés du sang : 120 jours pour les globules rouges, 7 à 10 jours pour les plaquettes, 24 heures pour les polynucléaires neutrophiles, plusieurs mois pour les monocytes (Fauchet and Ifrah, 1995).

L'hématopoïèse se déroule dans différents organes appelés organes hématopoïétiques. La moelle osseuse (MO) et le thymus sont des organes hématopoïétiques primaires. La MO est un organe complexe, le plus volumineux du corps : sa masse est estimée de 1600 à 3700 g chez l'adulte, et représente 4,5% du poids total. Les ganglions lymphatiques, la rate et le système MALT (Mucosa Associated Lymphoid Tissue) sont des organes hématopoïétiques secondaires. Ils apparaissent après les organes primaires et n'atteignent leur plein développement que sous l'influence des stimuli antigéniques du monde extérieur, qui les modifient tout au long de la vie (Najman and Potron, 1994).

La formation des éléments figurés du sang et des premiers vaisseaux commence dès la troisième semaine de gestation. L'hématopoïèse se concentre d'abord dans les annexes embryonnaires. Elle est ensuite assurée par d'autres organes comme le foie, la rate et la MO. On distingue trois périodes dans l'hématopoïèse embryonnaire.

1.1.1 Période pré-hépatique

Le mésenchyme ou tissu conjonctif embryonnaire est à l'origine de toutes les cellules du sang. Des îlots sanguins apparaissent dans le sac vitellin, dès le dix-neuvième jour de développement de l'embryon. Quelques jours plus tard, des îlots semblables sont retrouvés dans le tissu mésoblastique. L'activité hématopoïétique s'y poursuit jusqu'au deuxième mois de gestation. A compter de la sixième semaine, l'hématopoïèse diminue dans le sac vitellin puis cesse complètement au troisième mois.

Les cellules sanguines présentes sont des érythroblastes primitifs ayant l'apparence de mégaloblastes. Elles sont de grande taille et ont la faculté de se charger d'hémoglobine tout en conservant leur noyau, ainsi elles peuvent se diviser à l'intérieur des vaisseaux (Ghanassia and Procureur, 1999).

1.1.2 Période hépato-splénique

L'hématopoïèse commence dans le foie vers le troisième mois, puis décroît à partir du cinquième mois fœtal ; des îlots sanguins persistent cependant jusqu'à la naissance. Les cellules sanguines présentes sont principalement des érythroblastes définitifs, plus petits que les érythroblastes primitifs. Ils donnent naissance à des hématies anucléées dont le diamètre moyen est de 7,5 μm . Il y a aussi quelques mégacaryocytes et de rares granulocytes.

Dans la rate, l'érythropoïèse débute vers le cinquième mois pour se terminer à la naissance dans certains cas. La production érythrocytaire splénique est quantitativement moins importante que celle du foie. La rate est aussi le siège d'une lymphocytopoïèse qui se poursuivra toute la vie. Pendant la période hépatique, on a aussi décrit une faible activité hématopoïétique dans le thymus et les ganglions (Ghanassia and Procureur, 1999).

1.1.3 Période lympho-médullaire

Entre le quatrième et le cinquième mois fœtal, quand débute la circulation placentaire, l'hématopoïèse commence dans la MO, formant d'abord des granulocytes, puis des hématies et des plaquettes. Les éléments précurseurs de ces cellules sont semblables à ceux de l'adulte. A partir du sixième mois fœtal, la moelle osseuse est l'organe hématopoïétique le plus important.

Vers la fin de troisième mois fœtal, le tissu lymphoïde responsable de la formation des lymphocytes et des monocytes apparaît dans le thymus et les ganglions. La lymphocytopoïèse y est active à partir du cinquième mois (Ghanassia and Procureur, 1999).

A la naissance, la moelle fœtale compte de $0,6$ à $0,8 \cdot 10^{12}$ érythroblastes par litre. Dans la première semaine après la naissance, le nombre des éléments érythroïdes diminue de moitié puis augmente de nouveau pour atteindre une valeur comparable à celle de la naissance, vers la vingtième semaine (L'Italien *et al.*, 1983).

1.1.4 Après la naissance

A la naissance, seule la MO est fonctionnelle, mais elle l'est pratiquement au niveau de tous les os. Progressivement, la moelle active, « rouge », va subir une involution centripète au profit de la moelle adipeuse, « jaune ». Chez l'adulte, la moelle active est limitée aux épiphyses des fémurs et humérus, aux os du crâne, aux côtes, sternum, omoplates, clavicules, vertèbres, bassin et à la moitié supérieure du sacrum. Le nombre total de cellules nucléées dans la MO est d'environ 10^{12} chez l'adulte (Zittoun *et al.*, 1998). La moelle adipeuse, n'a pas d'activité hématopoïétique ; elle constitue une réserve de graisses, et peut en cas de besoin, se transformer en moelle active. Le foie et la rate maintiennent un potentiel d'hématopoïèse durant toute la vie (Fauchet and Ifrah, 1995).

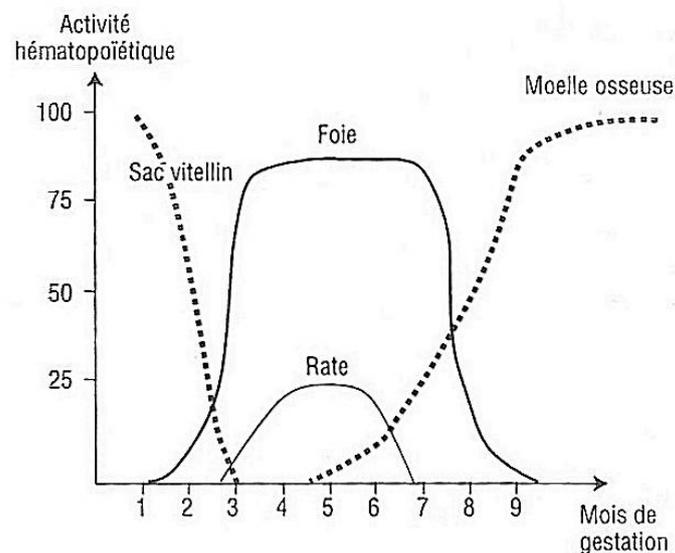


Figure 1 : Développement embryonnaire et fœtal de l'hématopoïèse

1.2 Les cellules souches

1.2.1 Totipotence

L'embryogenèse est par définition le processus qui forme un individu entier à partir d'une seule cellule, le zygote (Rossant and Tam, 2009). Ce zygote et les cellules issues de ses premières divisions, les blastomères, sont les seules cellules totipotentes de l'organisme. Cela signifie que leur génome est organisé de telle manière qu'elles peuvent coder l'information nécessaire à la fabrication d'un organisme entier. Mais encore faut-il que la cellule totipotente soit dans le contexte embryonnaire car jamais une cellule totipotente (telle qu'on la prélève par exemple pour réaliser un diagnostic préimplantatoire) ne formera un embryon dans une boîte de Pétri (Coulombel, 2010). Ce stade totipotent n'est conservé que jusqu'au stade morula (4ème jour suivant la fécondation chez la femme) où l'embryon est constitué de 8 à 16 cellules (Smith, 2006). Une cellule totipotente a la capacité de fournir tous les tissus de l'organisme y compris le lignage trophoblastique placentaire.

1.2.2 Pluripotence et multipotence

La pluripotence désigne la capacité d'une cellule à se différencier dans les trois lignages primaires issus de la gastrulation : le mésoderme, l'endoderme et l'ectoderme. Ces trois feuillettes sont à l'origine de certains des futurs tissus de l'organisme : par exemple, peau et tissu nerveux sont issus de l'ectoderme, intestin, foie et pancréas de l'endoderme, cellules hématopoïétiques et musculaires du mésoderme (Rossant and Tam, 2009). Cette capacité à fournir tous les tissus de l'organisme ne se retrouve que chez les cellules souches embryonnaires c'est-à-dire les cellules issues de la masse interne du blastocyste.

La multipotence, plus restrictive, indique qu'une cellule ne peut produire que les types de cellules différenciées composant un seul tissu (Coulombel, 2010). Elle se retrouve chez les cellules souches adultes qui sont déjà engagées dans un programme tissulaire spécifique et servent à réparer les tissus lésés, malades ou simplement vieillissants.

Totipotence et pluripotence sont deux propriétés restreintes aux cellules des premiers stades de développement embryonnaire : intuitivement, on peut comprendre qu'à un moment très précoce du développement, avant la spécification des tissus, certaines cellules aient l'information requise pour une capacité de différenciation presque illimitée, ce qui n'est plus nécessaire chez le fœtus et l'adulte, une fois les organes formés (Coulombel, 2010).

Les cellules souches fœtales sont beaucoup plus proches des cellules souches adultes que des cellules souches embryonnaires par leurs propriétés et leurs caractéristiques moléculaires. Elles ont déjà acquis une identité tissulaire, et comme les

cellules souches adultes, ne sont plus pluripotentes, mais seulement multipotentes. Présentes dans tous les tissus fœtaux, elles se distinguent de leurs consœurs adultes par leur activité intense de prolifération et une « réserve » de divisions cellulaires beaucoup plus importante, mais leur potentiel n'est pas fondamentalement différent (Coulombel, 2010).

Les cellules souches représentent une fraction extrêmement faible de la population médullaire totale (0,01 à 0,05 %). On les retrouve aussi dans le sang de cordon ombilical et, en quantité encore plus faible, dans le sang circulant. Dans les conditions physiologiques, 90% des cellules souches sont quiescentes et leur mise en cycle dépend de l'action de certains facteurs glycoprotéiques solubles, les cytokines, mais aussi de leurs interactions avec certaines cellules du microenvironnement (Bidri and Arock, 1996).

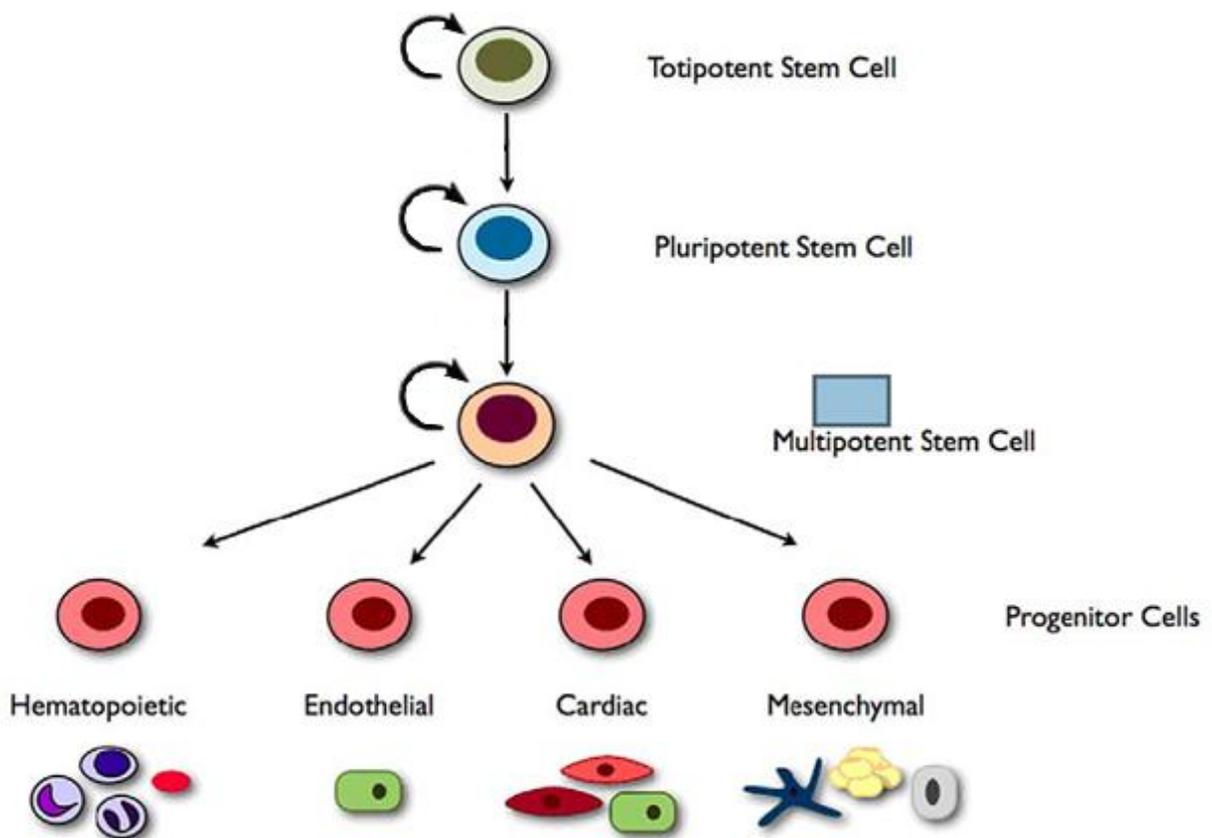


Figure 2 : La hiérarchie des cellules souches (Sieveking and Ng, 2009)

1.3 De la cellule souche hématopoïétique (CSH) aux cellules matures

Les cellules sanguines dérivent d'une cellule souche commune, capable, par ses propriétés d'auto-renouvellement et de multipotentialité, de générer de façon stable l'ensemble des cellules du sang. Sous l'influence de facteurs locaux et humoraux, agissant sur des récepteurs membranaires, ces cellules s'engagent dans un processus de différenciation où elles perdent leurs propriétés d'auto-renouvellement et de multipotentialité et acquièrent des fonctions propres à chaque lignée (Theml *et al.*, 2006).

L'hématopoïèse est un phénomène complexe présentant une hiérarchie cellulaire et comprenant schématiquement trois compartiments :

- ~ Un compartiment de cellules très primitives et multipotentes, ou **cellules souches hématopoïétiques**. Ces cellules peuvent proliférer de façon importante et sont capables à la fois de s'autorenouveler et de se différencier vers toutes les lignées hématopoïétiques, y compris lymphoïdes.
- ~ Un compartiment de **progéniteurs**, de morphologie indifférenciée, qui prolifèrent sans s'autorenouveler. Ces cellules sont habituellement orientées vers une ou au maximum deux lignées cellulaires.
- ~ Un compartiment de maturation, celui des **précurseurs hématopoïétiques**, où les cellules sont morphologiquement reconnaissables. A la fin de leur processus de maturation, les cellules hématopoïétiques passent dans la circulation (Bidri and Arock, 1996).

L'existence d'un tel système hiérarchisé permet une amplification énorme de la production car chaque compartiment cellulaire comprend plusieurs mitoses, aboutissant à la formation de plusieurs centaines de milliers de cellules matures à partir d'une seule cellule souche (Bidri and Arock, 1996).

Les cellules hématopoïétiques peuvent être regroupées en quatre compartiments répondant à des niveaux de différenciation croissante.

1.3.1 Les cellules souches multipotentes

1.3.1.1 Propriétés

Une cellule souche multipotente doit répondre aux 3 critères suivants :

- ~ Capacité d'auto-renouvellement : multiplication sans différenciation permettant de maintenir intact un pool de cellules souches primitives et donc le potentiel de l'hématopoïèse.
- ~ Capacité de différenciation : possibilité, sous l'influence de facteurs de croissance, de se diviser en s'engageant de façon irréversible vers plusieurs ou une lignée. La cellule perd alors sa multipotence pour devenir une cellule engagée.
- ~ Capacité de produire une restauration hématologique chez une souris irradiée à dose létale.

Lors d'une hématopoïèse normale il existe un équilibre entre la production des cellules souches par division cellulaire (autorenewement) et la perte des cellules souches par engagement vers les lignées cellulaires (différenciation) (Hématopoïèse).

Les cellules souches multipotentes sont localisées dans la MO mais certaines peuvent passer de façon temporaire dans le sang. Elles ne sont pas identifiables morphologiquement : elles ressemblent à des petits lymphocytes.

A l'état normal, les cellules souches multipotentes prolifèrent très peu (elles sont au stade G0) et le maintien de l'homéostasie est assuré par la prolifération et la différenciation des compartiments plus différenciés. Le microenvironnement paraît également intervenir dans la prolifération et la différenciation des CFU-S (Colony Forming Unit in the Spleen) c'est-à-dire les cellules formant des colonies dans la rate. Ceci signifie qu'une cellule souche donne naissance à une colonie mixte formée de plusieurs types cellulaires. Le tissu dans lequel les CFU-S donnent naissance à des colonies joue un rôle certain dans le type cellulaire de celles-ci. Dans la rate, la majorité des colonies sont constituées d'érythroblastes alors que dans la moelle on trouve surtout des cellules granuleuses (Najman and Potron, 1994).

Les cellules souches conservent leur propriétés après congélation à -196°C puis décongélation même de nombreux mois plus tard (Hématopoïèse).

1.3.1.2 Expérience de Till et McCulloch

En 1961, les expériences de Till et McCulloch ont, pour la première fois, démontré l'existence d'une CSH capable de générer les différentes lignées érythroïdes, monocytaires et granuleuses (McCulloch and Till, 1960).

L'expérience, menée par ces chercheurs, consiste à irradier une souris à 1000 rads ce qui provoque la destruction de son tissu hématopoïétique et induit donc une aplasie médullaire mortelle. Si des cellules de la MO d'une souris syngénique sont injectées après l'irradiation, les CSH de cette MO sont capables de reconstituer les différentes lignées hématopoïétiques. En effet, au bout du 8^{ème} jour, on peut mettre en évidence la formation de nodules ou colonies cellulaires dans la rate de ces souris irradiées (la rate est un organe hématopoïétique chez la souris adulte et non chez l'homme). Ces colonies sont mixtes, c'est-à-dire, constituées de cellules appartenant à plusieurs lignées cellulaires.

Ces auteurs ont pu démontrer qu'un nodule splénique provient d'une seule cellule souche injectée. En effet, en irradiant les cellules de MO avant être réinjectées de façon à provoquer des cassures chromosomiques, on observe que toutes les cellules en mitose d'un même nodule possèdent les mêmes cassures chromosomiques.

Les auteurs ont également démontré qu'il existe une relation linéaire entre le nombre de cellules médullaires injectées et le nombre de nodules formés. La concentration de précurseurs hématopoïétiques, appelées CFU-S est d'environ 1 cellule pour 1000 cellules médullaires.

Ces CFU-S sont donc des CSH multipotentielles, c'est à dire capables de générer les différentes lignées hématopoïétiques.

1.3.1.3 Clusters de différenciation

Des anticorps monoclonaux clustérisés (CD, Cluster de Différenciation), dirigés contre des structures membranaires ont été définis et aident à une meilleure compréhension de la différenciation. Les CD sont des antigènes, exprimés à la surface des cellules, qui permettent de définir le type cellulaire et la fonction cellulaire. Les cellules acquièrent des antigènes spécifiques de lignée au cours de leur maturation. Les anticorps permettent de définir pour une cellule donnée, le degré de maturité et son appartenance à une lignée (Fauchet and Ibrah, 1995).

Les CSH expriment à leur surface l'antigène CD34. Les cellules CD34+ représentent 1 à 4% des cellules de la MO, comprenant la cellule souche multipotente et les progéniteurs

déjà engagés. Au cours de la différenciation, on assiste à une baisse de la densité antigénique en molécule CD34+ avec un enrichissement en différents marqueurs spécifiques de lignées (Fauchet and Ibrah, 1995).

Les marqueurs CD133, CD117 et CD90 sont exprimés à la surface de la majorité des CSH (Wognum *et al.*, 2003). Les CSH les plus primitives, appelées LT-CSH (« Long Term ») sont CD133+, CD34- et CD38-. Elles se différencient en ST-CSH (« Short Term ») et en progéniteurs de l'hématopoïèse qui expriment l'antigène CD34 et sont donc CD133+, CD34+, CD38- et HLA DR-.

Les CSH se définissent également par l'absence de différents marqueurs de surface tels que CD38, CD10, CD14 ou encore CD15. En effet, le marqueur CD38 témoigne d'un engagement multilinéage, étape très précoce de la différenciation (Fauchet and Ibrah, 1995).

1.3.2 Les progéniteurs

Classiquement deux branches principales de différenciation émergent de la cellule souche multipotente : les CFU-L (progéniteur lymphoïde commun) et les CFU-GEMM (cellules souches myéloïdes) (Fauchet and Ibrah, 1995). La cellule souche lymphoïde possède la potentialité de différenciation vers les trois types cellulaires : les lymphocytes : T et B et les cellules Natural Killer (NK). La différenciation cellulaire myéloïde peut utiliser trois voies : l'érythropoïèse, la granulopoïèse-monocytopoïèse ou la mégacaryocytopoïèse (Fauchet and Ibrah, 1995).

L'existence de cellules intermédiaires entre les cellules souches et les cellules matures, qui sont non identifiables morphologiquement, a pu être mise en évidence essentiellement par l'introduction des techniques de culture de colonies en milieu semi-solide (Ogawa, 1993) : en présence d'un stimulant (les progéniteurs ont besoin de facteurs de croissance spécifiques appelés CSF pour Colony Stimulating Factor pour former des colonies en culture), et au bout d'un temps variable, se forment des colonies cellulaires constituées de cellules matures. La plupart des colonies sont composées d'un seul type cellulaire, parfois de deux, comme pour la lignée granulomonocytaire, plus rarement de plusieurs types cellulaires. En général, plus la colonie apparaît après un long délai de culture, plus elle dérive d'une cellule primitive. La taille de la colonie est aussi le reflet du stade de différenciation du progéniteur car les colonies provenant d'un progéniteur primitif sont formées d'un grand nombre de cellules (Bidri and Arock, 1996).

Chaque colonie est clonale et dérive d'une seule cellule appelée CFU (Colony Forming Unit), accompagnée des initiales de la lignée ou encore sous le terme général de

progéniteurs (Gregory and Eaves, 1978). Les progéniteurs sont les descendants directs de la CFU-S car ils sont retrouvés au sein des colonies spléniques. On différencie les progéniteurs de la CFU-S car les colonies remises en culture sont incapables de former des colonies secondaires *in vitro* ou des colonies spléniques *in vivo* (Bidri and Arock, 1996).

Il existe des progéniteurs déterminés pour chaque lignée cellulaire, mais il s'agit de populations cellulaires très hétérogènes allant d'une cellule proche de la CFU-S jusqu'à des cellules extrêmement proches des éléments morphologiquement reconnaissables (Bidri and Arock, 1996).

Tableau I : Les progéniteurs des différentes lignées

| CFU ou progéniteur | Lignée |
|---------------------------|------------------------------------------|
| CFU-GM | Polynucléaires Neutrophiles et Monocytes |
| CFU-G | Polynucléaires neutrophiles |
| CFU-M | Monocytes |
| CFU-MK | Plaquettes |
| CFU-Eo | Polynucléaires éosinophiles |
| CFU-B | Polynucléaires basophiles |
| BFU-E → CFU-E | Hématie |

Les progéniteurs perdent progressivement leur capacité d'auto-renouvellement au fur et à mesure de leur avancement dans la différenciation. Ils restent peu nombreux et non identifiables morphologiquement : ils ont l'aspect morphologique d'une cellule lymphoïde de taille moyenne. Ils acquièrent les marqueurs immunologiques CD-33 et HLA-DR en plus du CD-34 déjà présent au stade de cellule souche multipotente. Ces déterminants antigéniques peuvent être reconnus par des anticorps monoclonaux.

Les techniques de cultures des progéniteurs hématopoïétiques en milieu semi-solide permettent de quantifier les CFU-GEMM, CFU-GM, BFU-E, CFU-E et CFU-MK. Elles sont utiles dans l'exploration de certaines hémopathies affectant les cellules souches et sont nécessaires pour apprécier le contenu des prélèvements de greffe de progéniteurs hématopoïétiques.

1.3.2.1 Les progéniteurs érythroïdes

Le premier stade cellulaire orienté vers la lignée érythroïde est le stade BFU-E qui donne naissance à des colonies importantes pouvant contenir jusqu'à 30 000 ou 40 000 cellules. Les BFU-E sont une population très hétérogène avec des cellules peu différenciées donnant des colonies volumineuses et des cellules plus différenciées. Ces cellules sont présentes dans la moelle et le sang. A l'état normal, un tiers d'entre elles sont en phase de synthèse d'ADN. Les BFU-E aboutissent à un stade ultérieur à des CFU-E, cellules peu mobiles en culture qui donnent naissance vers le 7^{ème} jour à des amas de petit volume contenant moins de 100 cellules. Les CFU-E ne sont présentes que dans la moelle et près de 80% d'entre elles sont en phase de synthèse d'ADN (Eaves and Eaves, 1984). Le début de la synthèse d'hémoglobine intervient au stade proérythroblaste. On constate une modification du nombre et du type de récepteurs. En effet, les récepteurs à l'érythropoïétine décroissent avec la maturation terminale alors que les récepteurs à la transferrine restent très nombreux (Najman and Potron, 1994).

1.3.2.2 Les progéniteurs des neutrophiles et des macrophages

La première cellule est capable de donner naissance à des colonies contenant à la fois des cellules granuleuses neutrophiles et des monocytes, macrophages. Cette cellule, CFU-GM, est présente surtout dans la moelle mais aussi dans le sang. Les polynucléaires neutrophiles apparaissent sous l'influence directe du G-CSF alors que les monocytes et macrophages nécessitent la présence de M-CSF (Najman and Potron, 1994).

1.3.2.3 Les progéniteurs des éosinophiles et des basophiles

Les polynucléaires éosinophiles se développent à partir des progéniteurs CFU-Eo sous l'influence du GM-CSF (Clutterbuck and Sanderson, 1988).

Les polynucléaires basophiles paraissent avoir une voie de différenciation commune avec les mastocytes.

1.3.2.4 Les progéniteurs mégacaryocytaires

Le premier stade cellulaire orienté vers cette lignée est le stade BFU-MK. Elle donne naissance à des CFU-MK qui aboutissent à former des mégacaryocytes mûrs. Un CFU-MK donne naissance à 128 mégacaryocytes en moyenne (Gewirtz, 1986).

1.3.2.5 Les progéniteurs lymphoïdes

Les lymphocytes B et T et les cellules NK proviennent d'une cellule souche multipotente commune.

L'étape la plus précoce de la lymphopoïèse B est représentée par les cellules pro-B. La cellule pro-B porte encore l'antigène CD-34 présent sur tous les progéniteurs et commence à exprimer les antigènes CD-10 et CD-19. Elle donne naissance à la cellule pré-B qui perd l'antigène CD-34 et exprime l'antigène CD-20. La cellule pré-B donne naissance aux cellules B qui perdent l'antigène CD-10 et expriment l'antigène CD-21 ainsi que l'immunoglobuline IgM à leur surface.

Le progéniteur commun de la lymphopoïèse T coexpriment les antigènes CD-34, CD-19 et CD-7. La cellule pro-T exprime les antigènes CD-34, CD-7 et CD-10. Ce progéniteur pro-T se déplace ensuite de la MO vers le thymus pour poursuivre sa différenciation. Les progéniteurs thymiques vont perdre l'antigène CD-34 et acquérir en surface les antigènes CD-3, CD-4 et CD-8. La dernière étape de différenciation thymique est caractérisée par l'expression à la surface des cellules d'antigène CD-3 et la perte de la coexpression CD-4 et CD-8.

Les cellules T immatures ou thymocytes prolifèrent et se différencient dans le thymus, contrairement aux autres cellules sanguines qui se différencient dans la MO. Au cours de leur passage dans le thymus, les thymocytes vont subir une double sélection. Les thymocytes, dont le TCR (récepteur des cellules T) nouvellement synthétisé reconnaît les molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) autologue, subissent une sélection positive et continuent leur différenciation. Il y a ensuite une deuxième sélection, négative cette fois, qui consiste à induire l'apoptose des cellules auto-réactives qui expriment un TCR ayant une forte affinité pour les molécules du CMH autologue présentes à la surface des cellules dendritiques et des macrophages et qui présentent des peptides du soi. Après la double sélection, les cellules survivantes sont simples positives CD-4 ou CD-8 et quittent le thymus pour rejoindre la circulation périphérique jusqu'à la rencontre d'un antigène. On note 95% d'apoptose au cours de cette sélection thymique (Vaubourdolle, 2007).

1.3.3 Les précurseurs

Ce sont les premières cellules reconnaissables de chaque lignée qui n'ont plus de pouvoir d'auto-renouvellement et dont la capacité de prolifération est limitée (Najman and Potron, 1994). Le compartiment des précurseurs est localisé dans la MO où il permet la maturation et la multiplication cellulaire.

Le stade de maturation pour aboutir aux cellules terminales fonctionnelles entraîne des modifications morphologiques communes à chaque lignée comme : la diminution de la

taille cellulaire, la diminution du rapport nucléo-cytoplasmique, la disparition des nucléoles et la condensation de la chromatine. On observe également des modifications spécifiques à chaque lignée comme : l'apparition de granulations spécifiques dans le cytoplasme de la lignée granuleuse et la polylobulation du noyau dans la lignée granuleuse.

Selon les lignées, il se produit entre trois et cinq mitoses. Ainsi, un précurseur peut donner naissance à trente-deux cellules filles. Pour la lignée mégacaryocytaire, il n'y a pas de division cellulaire mais une endomitose à l'intérieur des mégacaryocytes. Les plaquettes sont des fragments de cytoplasme du mégacaryocyte qui seront libérées au moment de la mort de ce précurseur.

1.3.4 Les cellules matures

Seules les cellules terminales, matures et fonctionnelles, vont passer dans le sang : polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles, hématies, plaquettes, lymphocytes et monocytes. Pour la plupart de ces cellules, le sang ne représente qu'un lieu de passage et de transport entre leur lieu de production (la moelle) et le lieu de leurs fonctions (les tissus). Les lymphocytes et les monocytes seront de plus capables de nouvelles différenciations après leur séjour sanguin.

Tableau II : Du précurseur à la cellule mature

| Précurseurs | Intermédiaires | Cellules matures |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Pro-érythroblate | Erythroblaste basophile → Erythroblaste polychromatophile → Erythroblaste éosinophile → Réticulocyte | Erythrocyte ou Globule rouge ou Hématie |
| Myéloblaste | Promyélocyte → Myélocyte → Métamyélocyte | Granulocyte ou Polynucléaire |
| Mégacaryoblaste | Mégacaryocyte basophile → Mégacaryocyte granuleux → Mégacaryocyte thrombocytogène | Thrombocyte ou Plaquette |
| Pro-lymphocyte | Pré-lymphocyte | Lymphocyte |

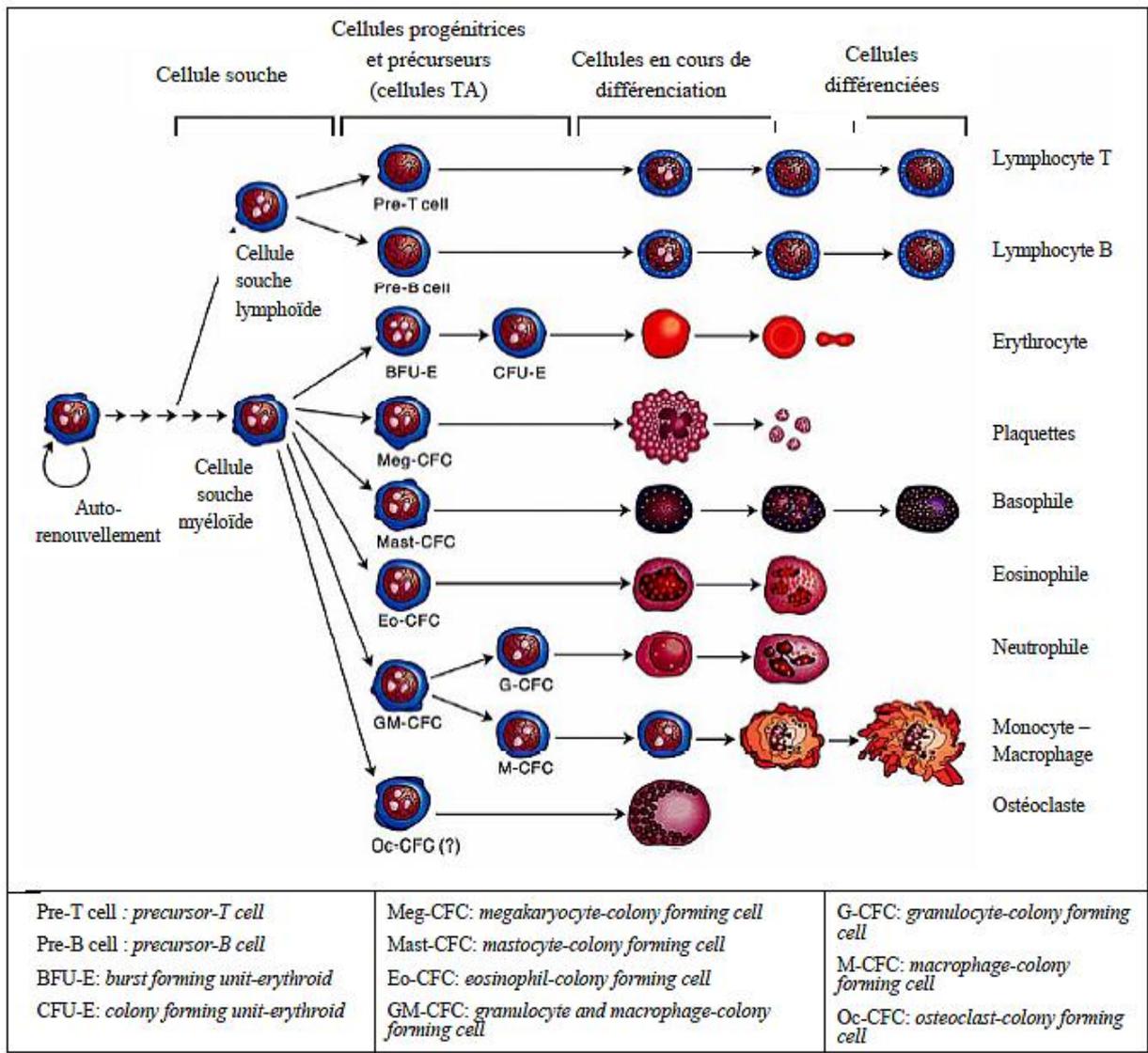


Figure 3 : Schéma de l'hématopoïèse

1.4 Le micro-environnement hématopoïétique

La MO est contenue dans les cavités osseuses des 206 os du squelette. Néanmoins, en dépit de sa dispersion anatomique, elle présente une unité structurale et fonctionnelle justifiant la réunion des différents territoires intra-osseux qui la composent (et qui ne sont pas nécessairement contigus) en un seul et même organe hématopoïétique (Fliedner et al., 2002). C'est une matière molle, semi-fluide qui représente environ 3 à 5% du corps humain, soit entre 1600 et 3700 g (L'Italien et al., 1983).

On distingue deux types de tissus :

- ~ **La moelle rouge** (ou tissu hématopoïétique) qui est active sur le plan hématopoïétique, qui est riche en cellules myéloïdes, en vaisseaux et en nodules lymphoïdes mais qui est pauvre en adipocytes. Les cellules myéloïdes sont présentes à différents stades de maturation.
- ~ **La moelle jaune** (ou tissu adipeux) qui, à l'inverse, est riche en adipocytes et pauvre en cellules myéloïdes. Elle constitue une réserve importante de lipides. Elle est inactive sur le plan hématopoïétique, néanmoins elle conserve la capacité de reprendre une activité hématopoïétique en cas de besoin, en se (re)transformant en moelle rouge par un processus appelé reconversion médullaire (Manceron et al., 2003).

On observe une topographie variable de la MO en fonction de l'âge. A la naissance et jusqu'à 4 ans, la moelle de la totalité des cavités osseuses (à l'exception des phalanges terminales) est rouge, très active, compensant ainsi l'espace médullaire réduit dû à l'importance du cartilage et l'épaisseur des corticales et des travées de l'os spongieux (Fauchet and Ifrah, 1995).

Puis au cours des années suivantes, avec l'accroissement rapide de la taille des os, la capacité hématopoïétique de la MO augmente bien au-delà des besoins, et on assiste alors à une involution adipeuse de nombreux territoires médullaires, donnant un aspect jaune à la MO à ces niveaux. Cette involution débute à l'extrémité des os longs et se poursuit jusqu'à l'âge adulte où la moelle hématopoïétique n'est plus localisée qu'au niveau de certains os seulement : les vertèbres, le sacrum, le cadre osseux du bassin, les côtes, le sternum, les os du crâne, les clavicules, les omoplates, les extrémités proximales du fémur et de l'humérus (Drouet and Lagrange, 2010). La réduction de la moelle rouge va se perpétuer lentement tout au long de la vie, parallèlement à la réduction des zones trabéculaires, du nombre d'éléments cellulaires associés (ostéocytes, ostéoblastes et ostéoclastes) et les vaisseaux paratrabéculaires (Fauchet and Ifrah, 1995).

Le compartiment intravasculaire est l'élément clé de la structure médullaire. Il permet le passage des inducteurs (facteurs de croissance), des substances basales nécessaires à l'hématopoïèse et la libération des cellules matures vers la circulation générale (Fauchet and Ifrah, 1995).

Le compartiment extravasculaire est composé du microenvironnement médullaire nécessaire et indispensable à l'autorenouveau des cellules souches, leur maturation et leur différenciation. C'est un support de migration, un réservoir de molécules régulatrices et d'inducteurs de la prolifération et de la différenciation (Fauchet and Ifrah, 1995).

Dans les tissus, les cellules souches ne sont pas localisées au hasard, mais dans une niche géographiquement définie, en trois dimensions, associant cellules d'origine diverse et matrice extracellulaire en un réseau complexe avec lequel les cellules souches interagissent de façon dynamique et très précisément contrôlée (Lataillade et al.).

1.4.1 Les cellules stromales

Les cellules stromales, qui sont d'origine mésenchymateuse, comprennent les cellules endothéliales, les fibroblastes et les cellules graisseuses. Les macrophages médullaires, qui sont dérivés des cellules souches hématopoïétiques, sont également considérés comme faisant partie du stroma (Najman and Potron, 1994).

Les cellules stromales constituent une des sources essentielles de facteurs de croissance hématopoïétiques. L'adhérence permet aux cellules hématopoïétiques d'être baignées localement dans une concentration élevée de facteurs de croissance et d'être en contact étroit avec les facteurs de croissance transmembranaire (SCF, MCSF). En outre, les matrices sont un réservoir de facteurs de croissance comme le GM-CSF et l'IL-3, ou d'inhibiteurs comme le TGF- β (Long *et al.*, 1992).

1.4.2 La matrice extracellulaire

Formée d'un réseau fibrillaire insoluble sécrété par les cellules endothéliales et les fibroblastes, la matrice extracellulaire est composée d'une grande diversité de composants complexes, des protéines adhésives telles que la fibronectine, l'hémonectine, la laminine, des molécules de collagène, des protéoglycanes (Fauchet and Ifrah, 1995).

L'adhérence des cellules primitives hématopoïétiques a lieu soit directement au stroma médullaire, soit sur des matrices extracellulaires et joue sûrement un rôle primordial dans la survie, la prolifération et la maturation de ces éléments. En effet, dans les cultures à long terme, les cellules hématopoïétiques primitives adhèrent au stroma et à la matrice extracellulaire du flacon de culture (Coulombel et al., 1983).

1.5 La niche hématopoïétique

1.5.1 La notion de niche

Un premier modèle de microenvironnement inductif de l'hématopoïèse a été décrit dans les années 1970 (Trentin, 1989). Puis, en 1977, Dexter a proposé l'utilisation d'une couche de cellules stromales adhérentes pour le maintien des CSH de souris en culture à long terme (Tm *et al.*, 1977). Toutefois, c'est en 1978, que Robert Schofield a évoqué le concept de niche pour expliquer le microenvironnement limité qui contenait les CSH (Schofield, 1978). Il a énoncé l'hypothèse que les CSH ne pouvaient maintenir leur caractère souche, autrement dit, l'équilibre entre l'auto-renouvellement et la différenciation vers les lignages hématopoïétiques, que en gardant un contact physique avec un stroma approprié, constitué de cellules stromales associées à leur matrice extracellulaire (Schofield, 1978). Une fonction principale de la niche est d'ancrer les cellules souches (Charbord *et al.*, 2011).

En plus des cellules du microenvironnement, la niche contient des molécules d'adhésion telles que la N-cadhérine et l'intégrine, qui jouent un rôle important dans l'interaction entre le microenvironnement et les cellules souches (Simmons *et al.*, 1997). Les cellules du soutien de la niche génèrent des facteurs extrinsèques, des molécules de surface interagissant avec les CSH, qui permettent de maintenir la taille du pool de cellules souches et de fournir le nombre requis de cellules sanguines matures tout au long de la durée de vie de l'organisme (Whetton and Graham, 1999).

La niche présente une structure asymétrique. Après division, une seule cellule fille est maintenue dans la niche comme une cellule souche (auto-renouvellement), l'autre cellule fille quitte la niche pour proliférer et se différencier, et devenir, par la suite, une cellule mature fonctionnelle (Li and Xie, 2005). En dehors de la niche, les CSH réalisent des divisions symétriques : soit en donnant deux CSH filles, soit en donnant deux cellules différenciées.

1.5.2 Migration des cellules ou « homing »

Les cellules souches hématopoïétiques sont des cellules migrantes. Cela s'observe dès la formation du système hématopoïétique. En effet, nous avons vu précédemment que les cellules hématopoïétiques naissent dans le sac vitellin, puis migrent vers le foie et la rate avant de rejoindre la MO. Ce processus de migration est utilisé dans la greffe de cellules souches hématopoïétiques puisque une injection intra-osseuse des cellules n'est pas nécessaire. Les cellules sont injectées par voie veineuse périphérique puis migrent vers la MO (Ho and Punzel, 2003). Pour migrer dans un tissu, toute cellule circulante doit être

capable d'adhérer à la surface de l'endothélium avec suffisamment de force pour contrecarrer le flux sanguin. Ce procédé est défini comme le « rolling »

Dans ce contexte, l'attention s'est portée récemment sur le rôle d'une famille de molécules de signalisation impliquées dans le « homing », les réponses inflammatoires et la défense de l'hôte : les chimiokines (Whetton and Graham, 1999). Ce qui est clair, cependant, c'est le rôle clé joué par la chimiokine SDF-1 (Stromal cell-Derived Factor 1) dans la régulation de la migration des CSH au cours du développement embryonnaire puis chez les adultes. Cette cytokine est produite de manière constitutive par le stroma et les ostéoblastes immatures de la niche (Peled *et al.*, 1999). Elle est exprimée à la surface des cellules du tissu cible. SDF-1 est couplé à un récepteur situé à la surface des cellules de migration, CXCR4.

Un des facteurs prépondérant pour le homing est le gradient SDF-1/CXCR4 (Li and Xie, 2005). Ce gradient est un des facteurs principaux du homing : il est augmenté lorsqu'un recrutement de CSH est nécessaire. Ainsi si on bloque l'interaction de SDF-1 et de CXCR4, on abolit le homing et la greffe des CSH dans un tissu (Bismuth, 2008).

Cette propriété est également mise à profit dans le recueil des CSH après stimulation par le G-CSF. La stimulation par le G-CSF va favoriser la sécrétion de protéases qui clivent différentes protéines d'interactions comme le SDF-1 membranaire et VCAM (Vascular cell adhesion molecule 1) : cela permet ainsi de libérer les cellules vers la circulation périphérique (Carstanjen *et al.*, 2002; Nervi *et al.*, 2006). Cependant, dans un modèle de KO (Knock-Out) du gène CXCR4 chez la souris, c'est-à-dire inactivé pour ce gène CXCR4, les cellules conservent leur migration mais leur rétention au sein de la moelle est restreinte. Il existe désormais le Plerixafor qui est un anti-CXCR4 et qui peut être utilisé en cas d'échec de mobilisation des CSH avec le G-CSF.

1.6 Fonctions des cellules sanguines

1.6.1 Les hématies ou globules rouges

La fonction principale de l'hématie est son rôle respiratoire, grâce au transport de l'oxygène qui se fixe à l'hémoglobine (Raoul et al., 1978).

1.6.2 Les granulocytes ou polynucléaires

Les polynucléaires neutrophiles jouent un rôle fondamental dans les réactions inflammatoires aiguës et dans la défense contre les micro-organismes à développement extracellulaire par leur capacité phagocytaire et les substances sécrétées (Theml et al., 2006). Ce sont des cellules de l'immunité non spécifique.

Les polynucléaires éosinophiles interviennent dans les processus de défense contre les parasites. Ils exercent une action cytotoxique directe sur les parasites, leurs œufs et les larves. Ils jouent également un rôle de régulation négative des phénomènes d'allergie et des réactions anaphylactiques, en limitant les effets de l'activation des cellules basophiles/mastocytes (Theml et al., 2006). A ce titre, ils ont un effet anti-inflammatoire.

Les polynucléaires basophiles et leurs équivalents tissulaires (mastocytes), par la libération de substances telles l'histamine, la sérotonine, l'héparine, et de médiateurs d'inflammation, interviennent dans le déclenchement de réactions inflammatoires en augmentant la perméabilité vasculaire au site d'activité antigénique locale, régulant ainsi l'afflux d'autres cellules de l'inflammation (Theml et al., 2006).

1.6.3 Les plaquettes (ou thrombocytes)

Les plaquettes proviennent de la fragmentation cytoplasmique des mégacaryocytes polyploïdes. Par leurs propriétés d'adhésion et d'agrégation, elles interagissent avec l'endothélium (processus d'hémostase primaire). Outre cette fonction mécanique (clou plaquettaire), ces agrégats plaquettaires concourent au maintien de l'hémostase en sécrétant des facteurs phospholipidiques participant au déroulement de la coagulation plasmatique (Theml et al., 2006).

1.6.4 Les monocytes

Le monocyte est la forme temporairement sanguine de l'histiocyte – macrophage tissulaire qui a pour propriété de phagocyter les bactéries dites intracellulaires obligatoires, les levures, les virus, les cellules sénescents et les corps étrangers (Raoul et al., 1978).

1.6.5 Les lymphocytes

Les lymphocytes T sont responsables de l'immunité cellulaire. Ils agissent directement par contact ou en sécrétant des cytokines qui concourent à la destruction des cellules étrangères en favorisant l'action des macrophages et permettent l'activation des lymphocytes B. Les lymphocytes T interviennent dans les réactions inflammatoires, principalement les réactions d'hypersensibilité dite retardée (Raoul et al., 1978). Pour être activé, proliférer et se différencier, un lymphocyte T naïf doit reconnaître l'antigène spécifique à la surface des cellules présentatrices d'antigène (cellules dendritiques).

Les lymphocytes B sont responsables de l'immunité humorale. Ce sont les précurseurs des plasmocytes qui sécrètent dans le sang les anticorps circulants, des immunoglobulines : d'abord les IgM puis les IgG. Ils jouent également un rôle dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T (Raoul et al., 1978).

Les lymphocytes NK sont spécialisés dans la défense non spécifique contre les virus. Ils détectent les modifications à la surface des cellules infectées par le virus, se rassemblent à leur surface et les tuent, ce qui non seulement empêche les virus de se reproduire, mais les rend vulnérables aux autres agents du système de défense. Ils ont une fonction de cytotoxicité directe (Silbernagl et al., 1992).

Certains lymphocytes gardent leur sensibilité vis-à-vis de l'antigène qui les a transformés : ils sont dits « cellules-mémoires ». Ils assurent une réponse accélérée lors de la réintroduction de l'antigène correspondant (Raoul et al., 1978).

1.7 La régulation de l'hématopoïèse

L'hématopoïèse est un processus dynamique soumis à une régulation très fine : seules les cellules sanguines différenciées et matures sont mises en circulation, à des taux en rapport avec les besoins (Zittoun et al., 1998). Ainsi, la production médullaire quotidienne atteint 200.10^9 érythrocytes, 100.10^9 plaquettes et 50.10^9 polynucléaires neutrophiles. Cette régulation très complexe fait intervenir principalement des facteurs cellulaires (interactions avec les cellules stromales) et moléculaires (facteurs de croissance hématopoïétiques, cytokines) (Binet et al., 2011). Ces facteurs ou cytokines sont des glycoprotéines produites par les cellules du stroma de la moelle, par les lymphocytes et les monocytes, en dehors de l'érythropoïétine qui est sécrétée par le rein et le foie. On peut noter quatre règles communes dans leur fonctionnement : ils sont synthétisés *de novo* suivant la stimulation que reçoit la cellule productrice, ils se fixent spécifiquement à des récepteurs de la membrane cellulaire de la cellule cible, ils interviennent de manière séquentielle lors des différentes étapes de différenciation et leur mode d'action peut être direct et/ou indirect (Najman and Potron, 1994).

A côté du compartiment médullaire des cellules souches les plus primitives, on distingue au sein de la MO deux autres compartiments de cellules plus matures : le compartiment des progéniteurs et celui de maturation.

La régulation physiologique de l'hématopoïèse résulte de trois processus fondamentaux : une régulation « positive » liée aux facteurs de croissance hématopoïétique (FCH) qui font partie des cytokines, une régulation « négative », et des interactions entre cellules hématopoïétiques et microenvironnement médullaire. La présence de certaines molécules dans le milieu de culture pour assurer la survie, la prolifération et la différenciation des cellules hématopoïétiques est une nécessité absolue (Bidri and Arock, 1996).

Physiologiquement, chez l'adulte, l'hématopoïèse est exclusivement médullaire et l'essentiel de la régulation de ses différentes étapes est assuré par des interactions étroites entre les cellules hématopoïétiques et les composants du microenvironnement médullaire. On sait que les cellules stromales (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules adipocytaires) (Lichtman, 1981) produisent la plupart des molécules nécessaires au développement des cellules souches. Ces molécules se répartissent classiquement en facteurs de régulation positive, facteurs de régulation négative et ligands d'adhésion, ces derniers comprenant essentiellement les composants de la matrice extracellulaire (Bidri and Arock, 1996).

1.7.1 Régulation positive

1.7.1.1 Facteurs types CSF

Les facteurs types CSF (Colony Stimulating Factor) sont capables de donner des colonies de cellules hématopoïétiques dans les tests classiques. Ce sont essentiellement le GM-CSF, l'IL-3, le G-CSF, l'érythropoïétine, le M-CSF, l'IL-5 et la thrombopoïétine. Certaines de ces molécules agissent sur des progéniteurs précoces et ne sont pas spécifiques d'une lignée donnée. D'autres ont un effet restreint à une lignée donnée et sont nécessaires à l'acquisition des caractères de différenciation spécifiques des cellules matures.

1.7.1.2 Facteurs synergiques

Les facteurs dits synergiques, ne sont pas des CSF pour les progéniteurs hématopoïétiques mais seraient indispensables pour mettre en cycle les cellules hématopoïétiques primitives. Parmi ces facteurs, on peut citer : IL-1, IL-4, IL-6, IL-9, IL-11, LIF (Leukemia Inhibitory Factor) et SCF (Stem Cell Factor).

1.7.2 Régulation négative

On peut en citer deux : TGF- β (Transforming Growth Factors β) et TNF- α (Tumor necrosis Factor α).

Tableau III : Principales cytokines agissant sur les cellules souches hématopoïétiques et les précurseurs engagés chez l'homme (Bidri and Arock, 1996)

| Cellules cibles | Facteur principal | Facteurs synergiques |
|-----------------|--------------------|----------------------|
| CFU-GEMM | GM-CSF, IL-3 | G-CSF, IL-1, IL-6 |
| CFU-GM | GM-CSF, IL-3 | SCF + IL-3, G-CSF |
| CFU-G | G-CSF + GM-CSF | IL-3 |
| CFU-M | M-CSF + GM-CSF | IL-1, IL-2, IL-6 |
| BFU-E | EPO | IL-3, SCF, GM-CSF |
| CFU-Eo | GM-CSF, IL-5, IL-3 | |
| CFU-Ba | SCF | IL-3 |
| CFU-Mk | GM-CSF, IL-3 | EPO, IL-6, TPO |

2. Le sang placentaire

2.1 Les cellules du sang placentaire

Le sang de cordon ombilical contient de nombreux types de cellules :

- ~ des cellules souches hématopoïétiques, que l'on obtient principalement en prélevant le sang du cordon,
- ~ des progéniteurs de cellules endothéliales
- ~ des cellules souches mésenchymateuses, assez peu abondantes dans le sang mais très bien représentées dans le cordon lui-même (en particulier dans la gelée de Wharton, qui enveloppe les vaisseaux du cordon) (de Guerra *et al.*, 2010; Tsuji *et al.*, 2014).

Chez le nouveau-né, les cellules souches sanguines sont présentes dans le sang périphérique. Elles se trouvent à profusion dans le placenta et dans le cordon ombilical.

Dans le sang de cordon, on trouve environ 1% de cellules CD34+, ce qui est semblable à ce que l'on trouve dans la MO (Sutherland *et al.*, 1994). Cependant, aux premiers stades de la gestation, la fréquence des cellules CD34+ est beaucoup plus élevée, jusqu'à 11%. Cette quantité de cellules CD34+ diminue ensuite avec l'âge de la gestation. La sous-population CD34+ retrouvée dans le sang de cordon diffère de celle retrouvée dans le sang périphérique ou dans la MO (Fritsch *et al.*, 1996). En effet, le sous-ensemble CD34+ CD38-, qui définit une population de cellules primitives, est quatre fois plus élevé dans le sang de cordon que dans la MO, ce qui est en corrélation avec les dosages sanguins indiquant une proportion plus élevée de cellules hématopoïétiques primitives dans les sangs de cordon (Verhasselt *et al.*, 1998). Par ailleurs, le sang de cordon contient dix fois plus de cellules mononucléées CD34+ que le sang périphérique chez une personne adulte (Tsuji *et al.*, 2014).

2.2 La prolifération des cellules

Les cellules du sang de cordon sont plus riches en populations immatures, multipotentes, que les cellules médullaires. En culture, les colonies obtenues à partir de sang de cordon peuvent être repiquées et redonnent de nouvelles colonies. Les colonies secondaires obtenues à partir de sang de cordon sont plus nombreuses et plus immatures que celles obtenues avec des cellules médullaires (Raba and Souillet, 1998). La forte capacité proliférative des cellules, issues du sang de cordon ombilical, qui sont en mesure de reconstituer la MO a été confirmée par des greffes cliniques (Gluckman *et al.*, 1997). Bien

qu'une unité de 100 ml de sang de cordon ombilical ne renferme qu'un dixième du nombre de cellules nucléées et progénitrices que comptent 1 000 ml de moelle, les cellules souches que renferme cette seule USP peuvent, en raison de leur prolifération rapide, reconstituer le système hématopoïétique en entier (Gluckman *et al.*, 1997).

2.3 Les caractéristiques immunitaires

Les caractéristiques immunitaires des cellules souches et les anticorps du fœtus ne sont pas encore pleinement développés. Les lymphocytes T du sang de cordon ont une réactivité différente par rapport aux lymphocytes T médullaires de l'adulte. La réponse proliférative à une stimulation primaire est aussi forte avec des cellules T de cordon qu'avec des cellules T d'adulte, mais après une stimulation allogénique secondaire, on observe un état d'anergie avec les lymphocytes T de cordon alors que les lymphocytes T d'adulte continuent à proliférer. Il semble également que d'autres cellules immunocompétentes aient une réactivité plus faible dans le sang de cordon : les cellules dendritiques sont fonctionnellement immatures et l'activation des macrophages est altérée. Dans la plupart des cas, l'activité NK est également plus faible que celle du sang adulte, mais cette activité est rapidement induite par des cytokines (Raba and Souillet, 1998). De plus, les cellules multipotentes du sang placentaire expriment moins d'antigènes du système HLA (Human Leukocyte Antigen) à leur surface.

2.4 La quantité de sang placentaire

L'inconvénient présenté par la transfusion de sang ombilical était la faible quantité de sang contenue dans un cordon qui permettait de greffer seulement les patients de faible poids. Chez l'adulte, les cellules souches du cordon ombilical ne suffisaient pas il y a peu pour un traitement sûr, et leur multiplication *in vitro* n'était encore pas possible. Mais cette difficulté semble désormais dépassée, car les cellules issues du sang de cordon ombilical possèdent un potentiel de reproduction supérieur à celles de la MO. Le Docteur Jacques Hatzfeld, coordinateur du projet européen Hematopoietic Bioreactor, explique que le sang d'un seul cordon, soit un volume de 80 à 120 ml, contient autant de cellules souches du sang que les 800 à 1 200 ml de MO habituellement prélevés sur un donneur, et que la petite quantité de CSH tirée d'un cordon permet d'amplifier suffisamment les cellules souches *in vitro* pour permettre de greffer un adulte.

Les ressources sont illimitées. Le nombre des donneurs potentiels est important ; il inclut même les petits groupes de population ayant un profil immunologique rare.

3. La greffe de cellules souches

L'objectif d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques est d'apporter de manière durable des cellules souches hématopoïétiques issues d'un donneur sain vers un receveur : soit pour restaurer un tissu hématopoïétique détruit par un traitement intensif (traitement d'une hémopathie maligne) ; soit pour apporter un élément manquant de ce tissu hématopoïétique dans une pathologie non tumorale (déficit immunitaire) (Fauchet and Ifrah, 1995).

Les cellules souches peuvent avoir plusieurs origines : MO, cellules périphériques ou sang de cordon ombilical. L'injection du greffon médullaire se fait par voie intraveineuse, toujours précédée d'un conditionnement du receveur par chimio et/ou radiothérapie qui a un double but : éradiquer la maladie et induire une immunosuppression favorisant la tolérance immunitaire. Les cellules souches réinjectées vont se loger dans l'os spongieux (Fauchet and Ifrah, 1995). La reconstitution myéloïde est rapide, obtenue en trois semaines en moyenne.

3.1 Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)

Le système HLA (Human Leucocyte Antigens) est situé dans une région chromosomique localisée, chez l'homme, au niveau du bras court du chromosome 6 (bande 6p21.3) appelé « complexe majeur d'histocompatibilité » (CMH) (Rhodes and Trowsdale, 1999). Ce complexe comprend plus de 200 gènes, codant des produits très divers et de nombreux pseudogènes, dont un peu plus de la moitié sont fonctionnels et dont une quarantaine code pour les molécules du système HLA proprement dit (Forbes and Trowsdale, 1999).

Le système HLA joue un rôle fondamental dans la réponse immune et donc dans la réussite des greffes : c'est le plus important système de compatibilité tissulaire entre donneur et receveur. Les molécules HLA sont des glycoprotéines de la surface cellulaire dont le but est d'éduquer, dans le thymus, les lymphocytes T à reconnaître le « soi » du « non-soi » par l'intermédiaire de leur TCR (récepteur des cellules T). Elles ont également un rôle fondamental de « présentoir » des peptides antigéniques au TCR des lymphocytes T (Vaubourdolle, 2007). Le système HLA constitue ainsi l'image interne du soi auxquels vont se référer les lymphocytes T pour s'établir dans l'organisme, s'y maintenir puis pour reconnaître les déterminants antigéniques des agents pathogènes (Bensa, 2003).

Il possède trois caractéristiques essentielles :

- ~ il présente un polymorphisme important,
- ~ son expression est codominante,
- ~ il est transmis en bloc sous forme d'haplotype (Vaubourdolle, 2007).

Chaque enfant hérite d'un haplotype paternel et d'un haplotype maternel. La transmission de ces caractères est autosomique, monofactorielle et dominante. Ainsi, dans une fratrie, il y a quatre combinaisons haplotypiques possibles chez les enfants qui sont de fréquence statistique identique. Les événements de recombinaison, comme par exemple un crossing-over entre deux haplotypes, sont rares (Chatenoud, 2012).

Les haplotypes observés reflètent le phénomène de déséquilibre de liaison qui a limité la diversification et l'homogénéisation génétique de la population humaine mondiale. De ce fait les caractéristiques haplotypiques de système HLA sont des marqueurs de populations ethnogéographiques (Chatenoud, 2012).

Les deux haplotypes d'un individu représentent le génotype de celui-ci. La concordance d'expression de l'ensemble des gènes du système HLA permet l'identification des molécules correspondantes à la surface cellulaire et l'établissement du phénotype HLA (groupage HLA) (Chatenoud, 2012).

Le complexe HLA a été le premier système génétique pour lequel une cartographie et un séquençage complet ont été obtenus. Le premier antigène (Mac) du système HLA humain a été découvert en 1958 par J. Dausset à l'aide d'alloantisérums responsables de leucoagglutination chez les sujets dits histo-incompatibles (Dausset, 1958).

Le CMH est subdivisé en trois régions principales contenant des gènes codant des produits qui se distinguent par leur structure, expression, régulation et fonction.

3.1.1 Les antigènes HLA de classe I

Les molécules HLA de classe I comprennent les molécules HLA-A, HLA-B et HLA-C. Ce sont des glycoprotéines transmembranaires appartenant à la superfamille des immunoglobulines. Elles sont exprimées à la surface de la plupart des cellules à l'exception des cellules du système nerveux central (Cesbron Gautier et al., 2007). L'association intracellulaire de la chaîne α à la β 2-microglobuline conditionne l'expression à la surface cellulaire des molécules HLA de classe I. Les gènes de classe I sont très polymorphes, ce qui signifie qu'ils codent de nombreux variants alléliques qui diffèrent par leur composition en

acides aminés. On en dénombre à l'heure actuelle 2884 allèles au locus HLA-A, 3590 allèles au locus HLA-B et 2375 allèles au locus HLA-C (Chatenoud, 2012).

La région HLA-I, la plus télomérique, contient les 3 gènes HLA de classe Ia (ou HLA classe I classique), HLA-A, HLA-B, HLA-C, et les gènes de classe Ib (non classique) HLA-E, HLA-F, HLA-G ainsi que les gènes MIC-A et MIC-B et le gène HFE (Chatenoud, 2012).

3.1.2 Les antigènes HLA de classe II

Les molécules HLA de classe II comprennent HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP. Elles sont présentes sur les cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques, monocytes, macrophages, lymphocytes B), sur les lymphocytes T après activation, sur les cellules endothéliales des vaisseaux et sur les cellules épithéliales de l'intestin grêle (Choo, 2007). Elles sont situées dans la partie centrométrique du chromosome 6. Ce sont des hétérodimères composés d'une chaîne α et d'une chaîne β codées par les gènes A et B correspondants, localisés dans la région de classe II. Le polymorphisme génomique est étonnamment variable, de quasi inexistant pour DRA à considérable pour DRB1, il est significatif pour DQB1 et DPB1, plus limité pour DQA1 et faible pour DPA1. En plus du polymorphisme individuel de chaque chaîne des dimères, la diversité des molécules HLA de classe II est la résultante d'un double phénomène : l'association des deux chaînes protéiques α et β elles-mêmes polymorphes portées par le même haplotype et la capacité de chaînes α et β portées par les deux haplotypes de s'associer générant des molécules dites hybrides (Chatenoud, 2012).

La région HLA-II, la plus centromérique, abrite les gènes HLA-DR, HLA-DQ et HLA-DP, principaux gènes HLA de classe II et d'autres gènes de classe II (HLA-DO, HLA-DM) (Chatenoud, 2012).

3.1.3 Les antigènes HLA de classe III

Ils n'interviennent pas dans l'histocompatibilité. Ils codent les protéines ou facteurs de système du complément C2, C4, Bf et des cytokines de (TNF α , TNF β). Ils sont situés dans la région centrale du chromosome 6 (Chatenoud, 2012).

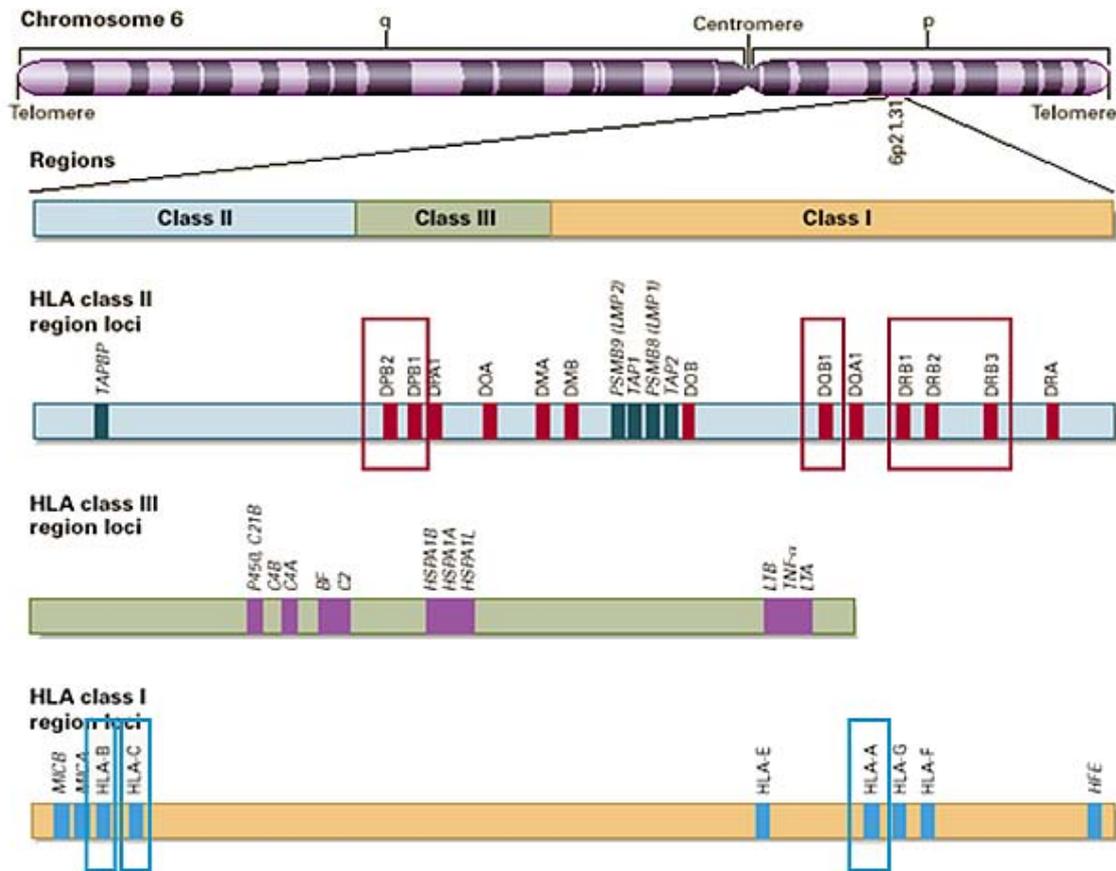


Figure 5 : Organisation génomique de la région HLA sur le bras court du chromosome 6

La diversité génétique extrême du système HLA est portée par un nombre important de loci et pour de nombreux loci par un nombre considérable d'allèles. Si l'on ne considère que les six séries alléliques principales HLA (A, B, C, DR, DQ et DP) celles-ci portent plus de 8000 allèles officiellement nomenclaturés dont la séquence a été internationalement validée conduisant à une diversité théorique de plusieurs dizaines de milliards de combinaisons. Les polymorphismes alléliques sont des différences nucléotidiques secondaires à des phénomènes génétiques ancestraux : mutation, conversion génétique, recombinaison, délétion (Chatenoud, 2012).

Un système international de nomenclature a été institué et est mis à jour régulièrement. Les caractéristiques du système HLA en terme de locus, gène séquence et antigène y sont répertoriés. Ce système assure la comparabilité des informations génétiques entre individu et sert de standard à l'accréditation européenne des laboratoires d'histocompatibilité (EFI) (Chatenoud, 2012).

La compatibilité HLA signifie une identité moléculaire au niveau des six antigènes de classe I (A, B, C) et des six antigènes de classe II (DR, DQ, DP) (Varet, 2012).

3.2 Les réactions allogéniques après la greffe

Un greffon hématopoïétique, qu'il soit d'origine médullaire, sanguine ou placentaire, comprend, d'une part, des cellules souches capables de reconstituer de façon durable une hématopoïèse complète et, d'autre part, des cellules immunocompétentes, telles que les lymphocytes T, susceptibles de reconnaître l'hôte comme étranger. Ces lymphocytes T matures sont responsables, après la greffe de CSH allogénique, d'une complication importante dont la morbidité et la mortalité demeurent élevées : la maladie du greffon contre l'hôte (GVH, graft versus host). A l'inverse, ces lymphocytes T jouent un rôle important dans la prévention du rejet de la greffe (HVG, host versus graft) et contribuent de façon significative à l'effet antitumoral associé à la greffe : l'effet greffon contre la leucémie (GVL, graft versus leukemia) (Horowitz *et al.*, 1990). Cet effet GVL constitue la modalité d'immunothérapie des cancers la plus puissante disponible aujourd'hui (Antin, 1993) et justifie à lui seul l'utilisation de la greffe de CSH allogénique pour le traitement de certaines hémopathies malignes.

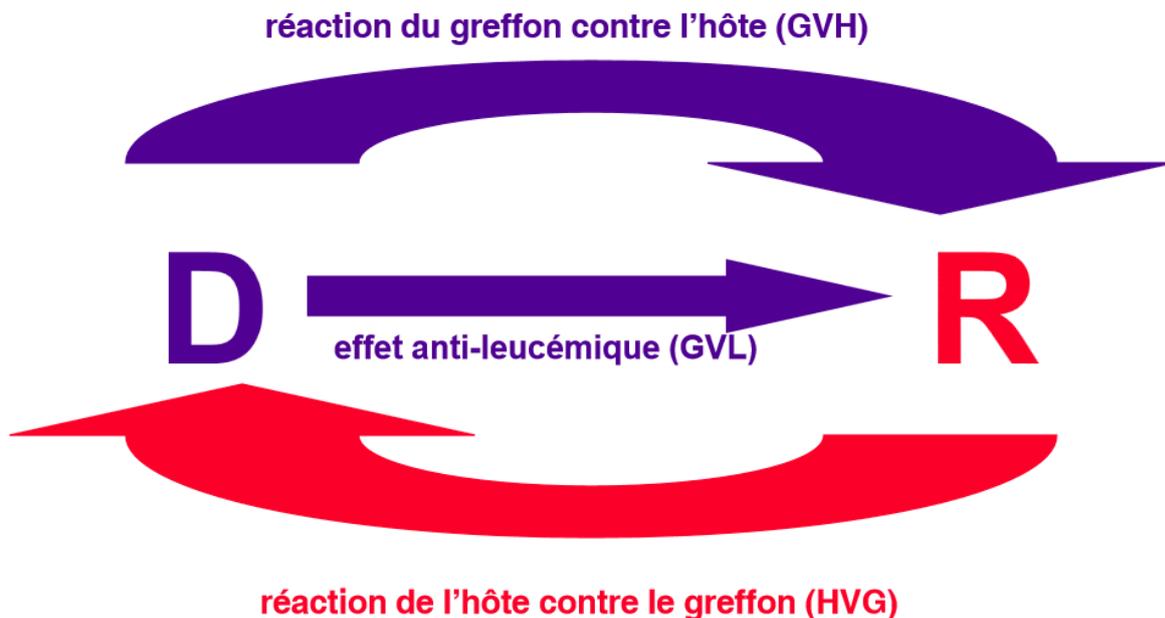


Figure 6 : Alloréactivité après greffe de cellules souches hématopoïétiques

3.2.1 La maladie du greffon contre l'hôte (GVH)

Le principe est le suivant : les lymphocytes T contenus avec les cellules souches dans le greffon, reconnaissent les cellules du receveur comme étant étrangères et les attaquent. C'est le greffon qui « rejette » l'hôte.

Billingham a défini trois pré-requis pour le développement de cette réaction du greffon contre l'hôte :

- ~ la présence de cellules immunocompétentes dans le greffon ;
- ~ l'incapacité pour l'hôte de rejeter les cellules administrées ;
- ~ un certain degré d'histo-incompatibilité entre le donneur et le receveur.

La démonstration de la déplétion des lymphocytes T présents dans le greffon prévient la survenue d'une GVH. En effet, cette démonstration a permis de mettre en évidence le rôle central de cette population cellulaire dans le déclenchement de la GVH. Pour prévenir celle-ci, un traitement immuno-suppresseur prophylactique est systématiquement prescrit pendant environ 6 mois.

Cette réaction est plus fréquente que le rejet. Elle survient dans près de 50 % des cas après une allogreffe familiale et dans plus de 80 % des cas après une greffe non familiale. La fréquence et la gravité de cette réaction augmentent avec l'âge du receveur. La GVH se manifeste de deux façons : GVH aiguë ou GVH chronique.

La **forme aiguë** est causée par les lymphocytes T alloréactifs du donneur présents au moment de la greffe qui, après avoir été activés par des cellules dendritiques dans les ganglions, engendrent une réponse contre les cellules du receveur. Elle s'observe généralement avant le 100^{ème} jour après la greffe. Presque tous les organes peuvent être affectés, mais les principaux sont la peau, les muqueuses, le tractus gastro-intestinal, les poumons et le foie. Elle induira notamment un rash cutané, des diarrhées, des pneumopathies interstitielles et une augmentation de la bilirubine, d'où la présence d'un ictère. En fonction de la sévérité de ces quatre symptômes, on définit une échelle de 0 à 4, avec pronostic clinique et prise en charge thérapeutique différents. Les GVH les plus sévères (grade 4), survenant dans 20 à 30% des cas, s'accompagnent d'un risque de décès important.

La **forme chronique** présente des éléments d'auto-immunité et d'immunodéficience et touche fréquemment la peau, les muqueuses, le foie, les poumons, les muscles, la bouche et les yeux. Elle survient plus de 100 jours après la greffe et peut être précédée d'une GVH aiguë. Les infections qui résultent de l'immunodéficience sont la principale cause de mort de la GVHD chronique. Elle se résout en général en 1 à 3 ans, cette période nécessitant le maintien d'un traitement.

3.2.2 L'effet du greffon contre la leucémie (GVL)

Après une allogreffe, les lymphocytes T du donneur sont capables d'éliminer les cellules tumorales résiduelles qui pourraient être encore présentes dans l'organisme du receveur. Les cellules immunocompétentes du greffon allogénique « combattent » et éliminent les cellules leucémiques ce qui correspond à une immunothérapie adoptive allogénique. On appelle cela l'effet du greffon contre la leucémie. Ce dernier permet de diminuer le risque de rechute. Ce mécanisme GVL n'est possible que dans le cas des allogreffes.

L'importance de cet effet GVL est maintenant bien établie chez l'homme puisque l'on a démontré que le taux de rechute leucémique est moindre chez les patients présentant une GVH aiguë et/ou chronique. Cet effet GVL est observé même en l'absence de GVH clinique (mais de façon moindre) comme l'indique le taux de rechute plus élevé après une greffe allogénique comportant une déplétion des lymphocytes T, qu'après une greffe allogénique sans déplétion des lymphocytes T en l'absence de GVH (Horowitz *et al.*, 1990).

Cet effet peut encore être renforcé par la transfusion de lymphocytes T du donneur, cette dernière pouvant aboutir dans certains cas à une nouvelle rémission complète si la maladie a rechuté malgré la greffe. Mais dans ce cas, il faut tenir compte du fait que le risque de GVH aiguë n'est pas négligeable.

3.2.3 Le rejet de la greffe par le receveur (HVG)

Dans le mois qui suit la greffe, on note une expansion des lymphocytes T matures du greffon chez le receveur. C'est l'effet recherché. Cependant, ce mécanisme est complexe et peut donner lieu à certaines complications qui peuvent être sérieuses. Dès la phase initiale, l'organisme du patient peut ne pas accepter le greffon et le rejeter. Le rejet de la greffe peut se traduire, soit par l'absence de prise initiale, soit par l'apparition d'une pancytopenie secondaire. Ce rejet est lié aux lymphocytes T et cellules NK du receveur. Un conditionnement pré-greffe peut éliminer ces cellules résiduelles chez le receveur et donc diminuer ce rejet. En cas de rejet complet (moins d'un cas sur 100), une deuxième greffe peut alors éventuellement être tentée avec des modalités différentes.

3.3 Les différents types de greffe

3.3.1 Auto-greffe

Dans ce cas, le malade est son propre donneur.

L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques a été introduite dans l'arsenal thérapeutique des hémopathies malignes dans les années 1980 et ses indications n'ont fait qu'augmenter jusqu'aux années 2000 où sa place a été standardisée. De nombreux travaux préalables chez l'animal et chez l'homme, avaient démontré qu'il était possible de faire circuler dans le sang, les cellules souches et progénitrices hématopoïétiques, après les avoir mobilisées à partir de la MO au décours d'une chimiothérapie aplasante. La réalisation d'une autogreffe est conditionnée par l'obtention d'un greffon autologue riche et fonctionnel capable de reconstituer l'hématopoïèse à long terme du patient (Bijou et al., 2011).

3.3.2 Greffe syngénique ou isogénique

Le donneur et le receveur sont jumeaux monozygotes.

La meilleure compatibilité HLA provient de jumeaux monozygotes puisqu'ils ont le même patrimoine génétique. De ce fait, on n'observe pas d'effet GVH. De même, il n'y a pas d'effet GVL pouvant entraîner de nombreuses rechutes (60%) lorsque la greffe a été réalisée pour le traitement d'une hémopathie maligne.

3.3.3 Greffe allogénique

Le donneur et le receveur sont des individus différents, appartenant à la même espèce.

Le devenir d'une allogreffe dépend des différences de compatibilité tissulaire existant entre le donneur et le receveur (Chatenoud, 2012).

Dans le contexte d'une allogreffe, l'objectif supplémentaire, par rapport à une autogreffe, est de parvenir à un effet allogénique à partir des lymphocytes alloréactifs contenus dans le greffon prélevé chez un donneur sain (Bijou *et al.*, 2011).

On distingue trois types de dons dans cette catégorie.

3.3.3.1 Donneur géno-identique :

C'est un donneur intra-familial identique du point de vue des antigènes HLA c'est-à-dire deux haplotypes en commun (frère, sœur).

3.3.3.2 Donneur non apparenté :

C'est un donneur non apparenté recensé sur un fichier de DVMO (Donneur Volontaire de Moelle Osseuse) ou fichier de sang de cordon. On recherche le donneur dont les antigènes HLA sont les plus proches de ceux du malade.

3.3.3.3 Donneur haplo-identique :

C'est un donneur intra-familial identique pour au moins un haplotype (père, mère, fratrie).

3.3.4 Les sources de CSH

Les cellules souches hématopoïétiques sont présentes à l'état naturel dans le sang placentaire à la naissance et dans la MO tout au long de la vie. Elles peuvent donc être prélevées dans ces deux sites par ponction ou par aspiration. Elles peuvent également être mobilisées de la MO pour être entraînées vers le sang périphérique où elles seront prélevées par cytophérèse. Dans la MO et le sang périphérique, les cellules souches hématopoïétiques peuvent être prélevées à partir d'un donneur sain dans le but de réaliser une allogreffe, ou à partir d'un patient malade dans le but de réaliser une autogreffe (Hequet, 2011a).

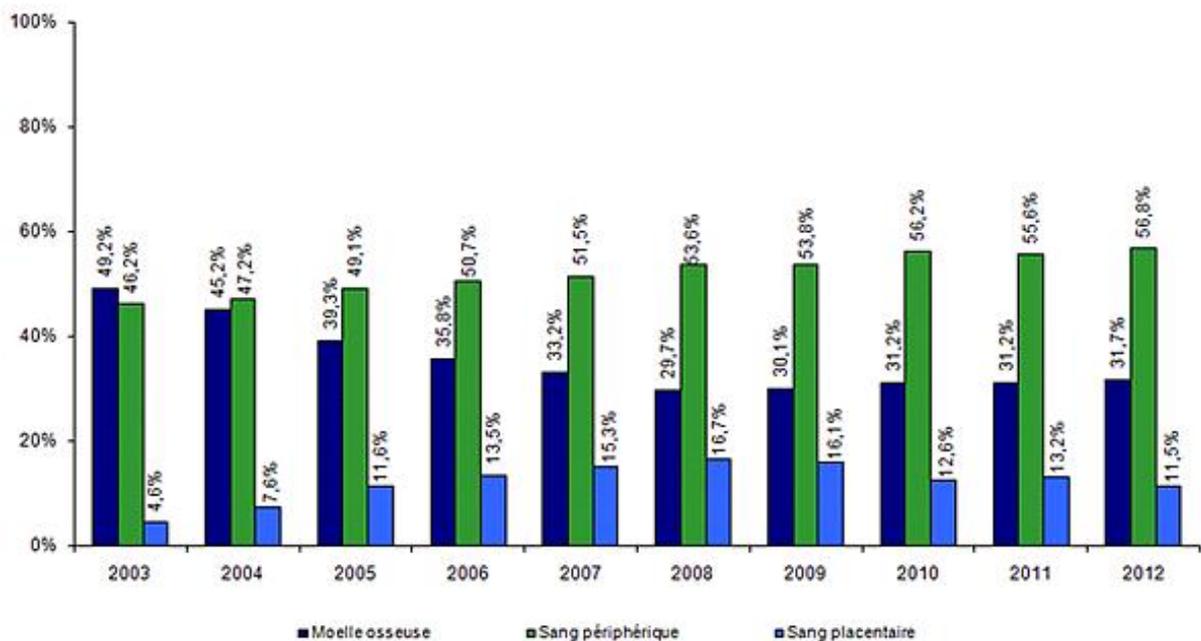


Figure 7 : Évolution de la répartition des sources de greffons des cellules souches hématopoïétiques allogéniques (Bijou *et al.*, 2011)

3.4 Greffe de moelle osseuse

Le prélèvement de MO chez un donneur d'allogreffe hématopoïétique (que ce soit un donneur familial ou non apparenté) obéit à des règles et des conditions de réalisation précises. Il est réalisé une fois que le donneur a été sélectionné et que son aptitude a été validée par les hématologues et les anesthésistes (donneur indemne d'affections virales, cancéreuses ou auto-immunes transmissibles et n'ayant pas de contre-indication à une anesthésie générale). En dehors de rares exceptions liées à des difficultés de disponibilité ou à des complications survenant chez le receveur, la date de prélèvement coïncide généralement avec la date de greffe. Cela permet de ne pas avoir à congeler les greffons et de ne pas perdre des cellules souches hématopoïétiques lors du procédé de congélation/décongélation (Hequet, 2011a).

Le prélèvement de MO est réalisé au bloc opératoire, sous anesthésie générale (Le don, le prélèvement et la greffe de moelle osseuse - Agence de la biomédecine). Le prélèvement est effectué par deux hématologues, au niveau des crêtes iliaques postérieures. Il est réalisé à l'aide de trocars adaptés constitués de plusieurs orifices latéraux pour aspirer la MO en différents endroits. Chaque aspiration ramène 2 ml de MO et, pour permettre un prélèvement efficace, l'opérateur doit changer la position du trocart avant chaque aspiration. Une aide technique est souhaitable pour récolter la MO à partir des seringues héparinisées et en faire la numération. En pratique, durant le prélèvement de MO la numération du nombre de CNT collectées, associée au volume prélevé et l'utilisation d'abaques permettent d'apprécier le volume total de MO à prélever. Le volume présent dans chaque seringue est déposé dans une poche adaptée contenant un mélange sérum physiologique isotonique/anticoagulants (Hequet, 2011a).



Figure 8 : Prélèvement de moelle osseuse

Le volume total de moelle collecté varie de 400 à plus de 1200 ml. Le volume total qui peut être prélevé dépend du poids du donneur (10 ml/kg et ne peut pas dépasser 20 ml/kg). Durant le prélèvement l'anesthésiste pourra décider d'arrêter le prélèvement plus tôt en cas de diminution significative de la tension artérielle. La quantité de cellules nécessaires pour réaliser une allogreffe de MO est 2 à $3 \cdot 10^8$ CNT/kg (Hequet, 2011a). Le prélèvement de MO intra-osseux permet de recueillir à la fois des cellules souches hématopoïétiques et leur milieu environnant (Le don, le prélèvement et la greffe de moelle osseuse - Agence de la biomédecine).

Pour le donneur, l'activité de la MO augmentera immédiatement après la ponction et réparera, en quelques jours, cette perte qui n'aura aucune conséquence sur la numération sanguine (il est prévu une transfusion de son propre sang après le prélèvement de moelle). La moelle est injectée au receveur par voie intraveineuse (Le don, le prélèvement et la greffe de moelle osseuse - Agence de la biomédecine).

Le DVMO nécessite la compatibilité absolue entre un donneur anonyme ou intrafamilial et un patient, ce qui est très rare, d'où l'importance d'augmenter le nombre de donneurs en France et d'approfondir les partenariats avec les réseaux étrangers (Le don, le prélèvement et la greffe de moelle osseuse - Agence de la biomédecine).

Il est très difficile de trouver un donneur compatible en dehors du cercle familial restreint (frères ou sœurs). A titre d'exemple, la probabilité de trouver une compatibilité au sein d'une même fratrie est de 1 sur 4. Elle est de 1 sur 1 million si elle est recherchée entre deux individus pris au hasard (Le don, le prélèvement et la greffe de moelle osseuse - Agence de la biomédecine).

Créé en 1986, le registre France Greffe de Moelle (FGM) est au service des malades qui ont besoin d'une greffe de MO mais qui n'ont pas de donneur compatible dans leur fratrie. Aujourd'hui, le registre FGM, qui recense tous les volontaires au don de MO, compte un peu plus de 215 000 inscrits mais ce nombre est encore insuffisant, car il est essentiel pour donner plus de chances de guérison aux malades d'augmenter chaque année le nombre de personnes inscrites (Le don, le prélèvement et la greffe de moelle osseuse - Agence de la biomédecine).

De nos jours, le prélèvement de MO n'est pratiquement plus utilisé pour réaliser des autogreffes de cellules souches hématopoïétiques. Il a été remplacé par le prélèvement de cellules souches hématopoïétiques dans le sang périphérique (Gratwohl *et al.*, 2009).

3.5 Greffe de cellules souches périphériques

Les cellules souches périphériques sont des cellules souches de la MO qui vont sortir des os, grâce à l'action d'un médicament injecté au donneur par voie sous-cutanée pendant 4 à 5 jours, et passer ainsi dans la circulation sanguine. En effet, physiologiquement, la concentration sanguine en progéniteurs hématopoïétiques est extrêmement réduite, rendant quasi impossible leur collection sans stimulation préalable (Varet, 2012). Ensuite, par une procédure de cytophérèse, les cellules souches nécessaires au patient vont être récupérées, alors que les cellules sanguines du donneur lui seront restituées, dans le cas d'une greffe allogénique (Le don de moelle osseuse : tout savoir sur le don). La cytophérèse consiste à séparer les différents constituants du sang en couches selon un gradient de densité (par centrifugation compte tenu des différences de taille, de poids et des propriétés de sédimentation) et à prélever la couche de cellules mononucléées dans laquelle sont situées les cellules souches hématopoïétiques (Cassens *et al.*, 1999).

Les prélèvements de cellules souches hématopoïétiques issues de sang périphérique peuvent être réalisés chez un patient pour réaliser une autogreffe ou chez un donneur sain pour réaliser une allogreffe (Hequet, 2011).

Le prélèvement de cellules souches hématopoïétiques périphériques doit être considéré différemment si le donneur est un donneur sain pour une greffe allogénique ou un patient pour un prélèvement autologue. Pour un donneur sain non apparenté, au maximum deux séances de cytophérèses peuvent être réalisées alors qu'au maximum trois séances de cytophérèses peuvent être effectuées chez un donneur familial. Pour un patient, il n'y a pas de nombre de cytophérèses maximum (Hequet, 2011).

Les prélèvements de cellules souches hématopoïétiques périphériques chez les donneurs sains effectués pour réaliser une allogreffe familiale ou non apparentée sont réalisés après vérification de l'absence d'affections transmissibles et de contre-indications à l'utilisation de facteurs de croissance hématopoïétique ou de réalisation de cytophérèse. Le donneur doit subir des injections de facteurs de croissance (G-CSF 10 µg/kg par jour par voie sous-cutanée) pendant cinq jours (Hequet, 2011). Les collectes sont réalisées, sans anesthésie, au moment où il y a suffisamment de cellules souches hématopoïétiques périphériques disponibles :

- ~ Dans le cas d'une autogreffe, un dosage de cellules CD34+ dans le sang du patient vérifiera que la cytophérèse peut être débutée ;

- ~ Dans le cas d'une allogreffe, le donneur sain sera systématiquement prélevé quatre à cinq jours après le début de la stimulation (même si le dosage cellules souches hématopoïétiques dans le sang périphérique sera effectué dès le début de la cytophérèse pour vérifier qu'il n'y a pas de défaut de mobilisation) (Hequet, 2011).



Figure 9 : Prélèvement de cellules souches périphériques

Les facteurs de croissance hématopoïétiques ne sont pas dénués de risque. Ils vont induire une hyperleucocytose durant quelques jours et pourraient être à l'origine de complications vasculaires même si seules d'exceptionnelles complications ont été décrites. Des équipes étudient les modifications immunologiques ou chromosomiques, au sein des cellules souches hématopoïétiques, que les facteurs de croissance pourraient entraîner à moyen et long terme (Marmier-Savet *et al.*, 2010).

La collecte de cellules non désirées peut également induire des conséquences chez le donneur. Ainsi la thrombopénie induite par le prélèvement de cellules dans une couche adjacente à celle des lymphocytes-monocytes-cellules souches hématopoïétiques pourrait atteindre des seuils dangereux et obliger à des précautions chez un donneur sain : réaliser des numération de formule plaquettaire durant un prélèvement pour l'arrêter précocement, hospitaliser un donneur pour surveillance clinique ou ne pas réaliser une cytophérèse supplémentaire en cas de greffon insuffisamment riche et de thrombopénie menaçante. Chez un patient, si la cytophérèse entraîne une thrombopénie menaçante, une transfusion plaquettaire est réalisée (Hequet, 2011a).

Chez un patient, la collecte de cellules souches hématopoïétiques périphériques a supplanté le prélèvement de MO, car les autogreffes de ces cellules réduisent significativement la durée d'aplasie, donc l'hospitalisation en chambre stérile, et le nombre de transfusions plaquettaires (Williams *et al.*, 1993). Des équipes ont observé la présence de cellules souches hématopoïétiques dans le sang périphérique lors de la reconstitution hématologique après les aplasies post-chimiothérapie (Siena *et al.*, 1989). Ainsi chez un patient, les cellules souches hématopoïétiques périphériques peuvent être prélevées par cytophérèse soit en sorties d'aplasies de chimiothérapie profitant de la stimulation de la MO renforcée par la prescription de facteurs de croissance (G-CSF) soit à l'état basal par la prescription de facteurs de croissance seuls (G-CSF).

Le nombre de cellules souches hématopoïétiques nécessaires pour réaliser une autogreffe est généralement de 2 à $4 \cdot 10^6$ CD34+/kg selon l'intensité du conditionnement.

Le nombre de cellules souches hématopoïétiques nécessaires pour réaliser une allogreffe est généralement de 4 à $6 \cdot 10^6$ CD34+/kg (Hequet, 2011a).

3.6 Greffe de sang placentaire

Auparavant négligé, jeté à la naissance, le sang de cordon ombilical est actuellement considéré comme une source précieuse de CSH (Vilmer, 1995).

3.6.1 Le sang placentaire

Le sang de cordon ombilical ou sang placentaire contient des CSH.

3.6.2 Avantages

3.6.2.1 Pas de risque au moment du prélèvement

Le prélèvement est effectué après la naissance de l'enfant, mais avant la délivrance du placenta. La sage-femme collecte le sang de cordon après s'être assurée que la mère et l'enfant sont en bonne santé. Il s'agit donc d'un prélèvement facile sans aucun risque pour le donneur (B. Anthony Armson, 2005 ; Gluckman, 2011).

3.6.2.2 Simplicité d'obtention

Le sang de cordon ombilical constitue une source facile pour obtenir des cellules souches hématopoïétiques, lesquelles sont de plus en plus utilisées, par rapport à la MO ou CSP, pour la greffe visant la prise en charge de pathologies malignes et bénignes chez les enfants et les adultes (B. Anthony Armson, 2005) (Les enjeux de la conservation du sang de cordon en France).

3.6.2.3 Un nombre de donneur potentiellement plus élevé grâce à une tolérance

HLA

En raison de l'immaturation des cellules contenues dans le sang de cordon, on peut tolérer 1 à 2 antigènes HLA incompatibles sur les 6 pris en compte, lors de la recherche d'un greffon compatible. Un nombre supérieur d'antigènes HLA incompatibles serait associé à une plus faible probabilité de prise de la greffe. Ainsi, lors de la réalisation d'une greffe, on peut étendre les recherches à un nombre plus élevé de donneurs potentiels (Gluckman and Rocha, 2009 ; Ruggeri *et al.*, 2010).

3.6.2.4 Une plus faible incidence et sévérité de GVH

Avec les cellules de sang de cordon on note une réduction de la réponse alloréactive par rapport à celle observée avec la greffe de MO (Barker and Wagner, 2003). Les cellules jeunes et immatures contenues dans le sang de cordon diminuent le risque de rejet immunologique et réduisent les réactions de GVH. Cet avantage permet ainsi à des enfants

appartenant à un groupe HLA rare de bénéficier d'une greffe à partir d'un greffon imparfaitement compatible (Barker and Wagner, 2003 ; Kurtzberg *et al.*, 1996).

La GVH est un événement précoce après une allogreffe de MO et est en partie déclenchée par la libération de cytokines. De ce fait, il est raisonnable de penser qu'une greffe de sang placentaire induira moins fréquemment et moins sévèrement une GVH aiguë et/ou chronique qu'un greffon de CSH adultes (MO) contenant un nombre plus élevé de cellules T activées (B. Anthony Armson, 2005 ; Varet, 2012).

3.6.2.5 Peu de risque de transmission de maladies infectieuses

Dans la grande majorité des cas, le sang de cordon n'est pas infecté par des virus latents, en particulier du groupe herpès, contrairement aux donneurs de MO adultes. Il y a donc peu, voire pas, de risque de transmission de maladies infectieuses comme le cytomegalovirus (CMV) ou le virus d'Epstein Barr (EBV) (Rubinstein *et al.*, 1993).

3.6.2.6 Disponibilité rapide

Le sang de cordon comparé aux autres greffons est rapidement disponible, ne nécessitant pas de solliciter des donneurs volontaires, de vérifier leurs statuts et ainsi d'allonger le délai de réalisation de la greffe. Ceci a de l'importance pour les patients, en attente de greffe, à haut risque avec une maladie instable (Barker *et al.*, 2002).

Les USP cryoconservées en banque peuvent être facilement transportées et décongelées pour une utilisation rapide en cas de besoin. Ainsi, les patients reçoivent une greffe de sang placentaire dans une médiane de 25 à 36 jours plus tôt que ceux qui reçoivent une greffe de MO (Gluckman and Rocha, 2009).

Les CSH du sang de cordon ombilical peuvent être congelées et transplantées chez un hôte après décongélation sans perdre leur capacité de repeuplement (Gluckman, 2011).

3.6.2.7 Meilleure représentation des minorités

La conservation de sang de cordon permet d'augmenter la diversité génétique HLA des greffons. En effet, certains groupes HLA trouvent une représentation très faible dans les registres de donneurs de MO, car ils sont fréquents dans des populations n'ayant pas forcément un accès facile au soin. La conservation du sang de cordon permet ainsi d'obtenir des greffons provenant de toutes sortes de catégories socioprofessionnelles, ce qui est généralement lié également à la diversité génétique (Barker and Wagner, 2003 ; Ruggeri *et al.*, 2010).

3.6.2.8 Excellentes capacités prolifératives

Le sang placentaire contient un grand nombre de progéniteurs hématopoïétiques, ainsi que des précurseurs plus primitifs et immatures. Ces progéniteurs sont capables d'assurer, après un traitement myélo-ablatif chez le receveur, une reconstitution hématopoïétique à court et à long terme (Varet, 2012). On note aussi une supériorité de la réponse proliférative *in vitro* et une supériorité de la capacité de prise de greffe *in vivo* par rapport à la greffe de MO (Barker and Wagner, 2003; Rubinstein *et al.*, 1993).

Quand des cellules de sang de cordon sont mises en culture, des colonies commencent à apparaître après 4 à 5 jours. Le nombre et la taille de ces colonies augmentent graduellement jusqu'à 14 à 17 jours. On dénombre en moyenne par colonie 1000 à 1500 cellules. Après cela, les colonies dégèrent et disparaissent graduellement après 4 semaines (Knudtzon, 1974). Ceci confirme la présence de progéniteurs hématopoïétiques dans le sang placentaire.

Une étude, chez 27 enfants, ayant reçu une greffe non apparentée de sang placentaire, a montré une reconstitution lymphocytaire, au bout de 2 mois pour les cellules NK, 6 mois pour les lymphocytes B, 9 mois pour les lymphocytes T CD8+ et 12 mois pour les lymphocytes T CD4+. Les auteurs en ont conclu que la reconstitution immunitaire était la même quelle que soit la source de CSH (Gluckman, 2011 ; Thomson *et al.*, 2000).

3.6.3 Inconvénients

3.6.3.1 Quantité de cellules limitées

La quantité de cellules prélevées est limitée (jusqu'à 10 fois moins que pour les autres greffons comme la MO). La dose totale de cellules nucléées/kg de receveur est un élément clé pour le succès de la greffe, limitant alors ses indications pour les adultes de grand gabarit. Le recours à la greffe simultanée de deux sangs placentaires distincts permet alors d'augmenter singulièrement des chances de prise de greffe (Barker and Wagner, 2003).

3.6.3.2 Pas de complément possible

Il n'y a pas de possibilité de recourir ultérieurement à un deuxième don, ni même de collecter les lymphocytes du donneur (Barker and Wagner, 2003 ; Varet, 2012).

En cas d'imprévu (poche contaminée, manque de cellules,...), il est impossible pour le patient d'avoir un complément de cellules (Les enjeux de la conservation du sang de cordon en France).

3.6.3.3 Retard dans la prise de la greffe

Une étude clinique a montré un retard dans la récupération hématopoïétique après une greffe de sang de cordon (Thomson *et al.*, 2000). Le faible nombre de progéniteurs hématopoïétiques dans le sang placentaire reste le principal problème de ce type de greffe par rapport à la MO ou à la mobilisation de CSP. Ceci peut se traduire par un échec de prise de la greffe, une prise de greffe retardée (Laughlin *et al.*, 2004 ; Rocha *et al.*, 2000) ou à une reconstitution immunitaire retardée (contrairement à l'étude chez les 27 enfants) et cela, malgré la capacité d'expansion rapide des cellules de sang de cordon (Komanduri *et al.*, 2007 ; Niehues *et al.*, 2001).

3.6.3.4 Risque potentiel de transmission de maladie génétique

La greffe est réalisée rapidement après la naissance de l'enfant d'où la possibilité d'un transfert de cellules souches hématopoïétiques présentant des anomalies génétiques (B. Anthony Armson, 2005 ; Barker and Wagner, 2003).

3.6.3.5 Diminution possible de l'effet anti- leucémique

Le fait que les cellules T présentes dans le sang de cordon ombilical soient immatures peut entraîner une baisse de l'effet GVL. On note tout de même la présence de cet effet GVL.

3.6.4 De la première greffe à nos jours

L'utilisation du sang de cordon ombilical comme source de CSH pour une transplantation a été pour la première fois suggérée par le professeur Edward A. Boyse (université d'Arizona) en 1983 et testée sur un modèle animal en 1984 (Wagner *et al.*, 1996).

La première greffe humaine de sang de cordon ombilical a été réalisée en 1988 par le docteur Eliane Gluckman, à l'hôpital St Louis à Paris, chez un enfant américain souffrant d'une maladie génétique, l'anémie de Fanconi (maladie orpheline qui se caractérise par un arrêt progressif de la MO) (Gluckman *et al.*, 1989 ; Les enjeux de la conservation du sang de cordon en France). La maman de ce patient était enceinte d'un deuxième enfant sain et HLA compatible au patient. En effet, celui-ci avait subi un test de dépistage prénatal pour être sûr qu'il n'était pas affecté par cette anémie, qu'il avait un caryotype normal et qu'il était HLA identique à son frère malade. Le sang de cordon a été prélevé à la naissance de l'enfant, cryoconservé puis utilisé, après décongélation, pour la transplantation. Les premiers signes de prise de la greffe sont apparus au jour 22 avec, par la suite, une reconstitution

hématologique complète. Le patient n'a pas eu de GVH et est actuellement en bonne santé avec une complète reconstitution hématologique et immunologique (Gluckman, 2011).

De 1988 à 1994, 50 greffes cordinales ont ainsi été réalisées dans le monde chez des enfants pour lesquels l'absence de donneur HLA identique dans la fratrie ne permettait pas de réaliser la greffe nécessaire (Barker and Wagner, 2003 ; Vilmer, 1995).

En 1992 et 1993, furent mises en place plusieurs BSP à New York, Paris, Milan et Düsseldorf (Les enjeux de la conservation du sang de cordon en France).

En 1996, on démontre la faisabilité des greffes allogéniques de sang de cordon avec des antigènes HLA incompatibles (Les enjeux de la conservation du sang de cordon en France).

En 1999, sont mis en place, le Réseau Français de Sang Placentaire (RFSP) par l'Agence française du sang (devenue Etablissement français du sang – EFS) et l'Etablissement français des greffes (devenue Agence de la Biomédecine – ABM) (Les enjeux de la conservation du sang de cordon en France).

Depuis cette date, les indications de greffe de cellules de sang de cordon se sont considérablement élargies grâce aux recherches effectuées sur ces cellules et grâce également à la possibilité, depuis 2002, de réaliser une double greffe de sang de cordon, rendant les greffes chez les adultes possibles (Les enjeux de la conservation du sang de cordon en France).

En 2012, 60 % des USP greffées en France provenaient de l'étranger (Agence de la biomédecine - rapports médicaux et scientifiques).

En janvier 2013, on dénombre 12 BSP publiques (gérées par des CHU ou par l'EFS) travaillant avec un réseau de 75 maternités publiques ou privées couvrant ainsi 25 % des naissances annuelles (Rouard *et al.*, 2013).

Aujourd'hui, les médecins sont en mesure de pratiquer la greffe de sang placentaire dans différentes situations, comme par exemple :

- ~ les cas de maladies non malignes:
 - aplasies médullaires constitutionnelles (maladie de Fanconi) ou acquises
 - déficits immunitaires combinés sévères
 - hémoglobinopathies (thalassémie, drépanocytose)
 - déficit enzymatique portant sur le tissu hématopoïétique (maladie de Gaucher...)
- ~ les cas de maladies malignes:
 - leucémies aiguës myéloïdes, leucémies aiguës lymphoblastiques

- leucémie myéloïde chronique
- syndromes myélodysplasiques
- lymphomes, myélomes, leucémie lymphoïde chronique
- syndromes myéloprolifératifs
- certaines tumeurs solides (Les enjeux de la conservation du sang de cordon en France).

Les résultats des greffes allogéniques de sang de cordon, qui rejoignent ceux des greffes de MO, expliquent le recours accru aux USP pour les greffes allogéniques de CSH. Ainsi, les utilisations de sang placentaire augmentent d'année en année. Au total, près de 10000 greffes allogéniques à partir de sang placentaire ont été réalisées dans le monde, et peu à peu les indications de ces greffes se rapprochent de celles de greffes réalisées avec les autres types de cellules. La France, en retard en 2007 sur la collecte de sang de cordon, a maintenant considérablement accru son stock et n'est plus obligée d'importer un grand nombre d'USP (Les enjeux de la conservation du sang de cordon en France).

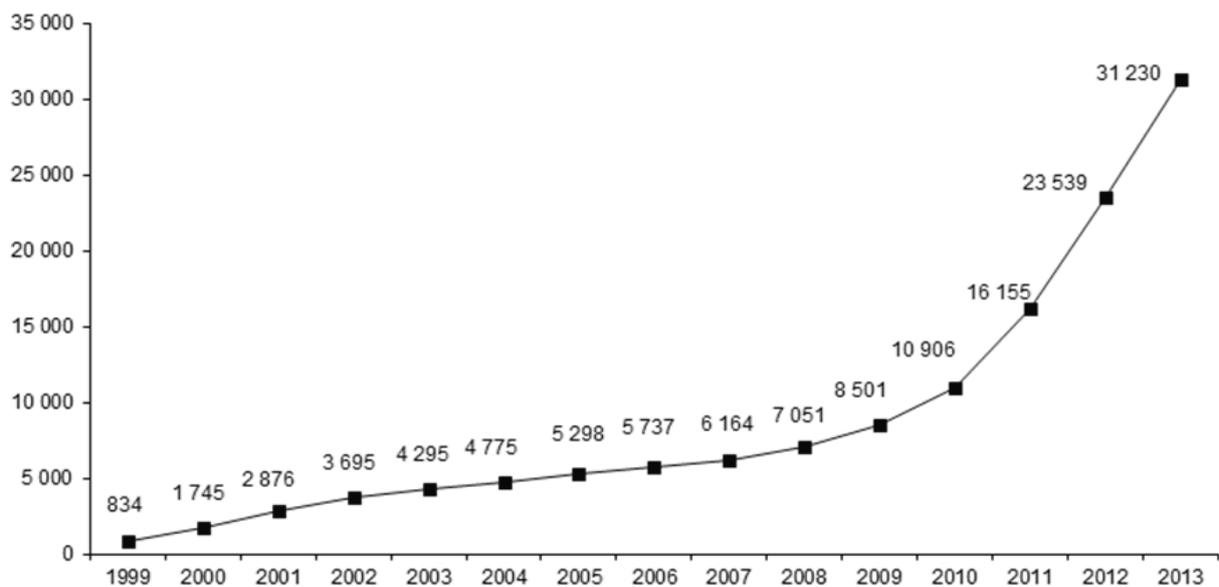


Figure 10 : Évolution du nombre de prélèvements d'unités de sang placentaire au sein du Réseau français de sang placentaire (Rouard *et al.*, 2013).

Le sang de cordon a permis d'étendre la greffe de CSH aux patients qui autrement ne seraient pas admissibles pour cette approche curative. En effet, la greffe de sang placentaire est réalisable chez les personnes adultes dans la mesure où une USP contient un nombre suffisant de CNT et doit être considérée comme une source de cellules souches allogéniques pour les patients qui n'ont pas de donneur de MO HLA compatible (Gluckman and Rocha, 2009).

Deux facteurs sont pris en compte lors de la recherche d'une (ou deux) USP : la compatibilité HLA et le nombre de CNT par kilogramme de poids du receveur ; l'incompatibilité HLA étant d'autant plus tolérée que le nombre de CNT/kg est élevé. Aujourd'hui, les standards HLA pour la sélection d'une USP incluent HLA-A et -B sérologiques (basse résolution) et DRB1* allélique (haute résolution) avec une compatibilité maximum de 6/6 et une possibilité d'incompatibilité jusqu'à 4/6. L'incompatibilité doit porter préférentiellement sur les molécules HLA de classe I (Kamani et al., 2008). Pour une même richesse cellulaire, une compatibilité de 6/6 est bien entendu préférée à une compatibilité de 5/6 et *a fortiori* de 4/6 avec un risque croissant de non prise de la greffe ou de maladie de GVH avec le degré d'incompatibilité (Gluckman and Rocha, 2006). Bien que non prouvé formellement, il est probable qu'un niveau de compatibilité de 6/6 soit associé, pour un greffon de MO comme pour un greffon de CSP, à des résultats supérieurs (Petersdorf, 2008).

Une étude d'Eurocord a comparé des adultes avec une leucémie recevant soit une greffe non apparentée de MO avec une compatibilité HLA de 6/6, soit une greffe non apparentée de sang placentaire avec une compatibilité HLA inférieure à 6/6. Les résultats montrent que, malgré une prise de greffe retardée, la greffe avec l'USP donne une survie comparable à celle obtenue avec la MO (Rocha *et al.*, 2001). Par ailleurs, une étude japonaise a montré qu'une greffe de sang placentaire a donné de meilleurs résultats qu'une greffe de MO non apparentée (Takahashi *et al.*, 2007).

Plusieurs études, sur la greffe de sang placentaire et la greffe de MO chez des enfants, ont constaté que l'incidence de GVH chronique était moindre avec le sang placentaire qu'avec la MO, mais que l'incidence de GVH aiguë de grade III-IV ne différait pas. De plus, on ne constate pas de différence de survie à 2 ans chez ces enfants. De même, chez les adultes, la mortalité liée à la greffe et la survie sans leucémie ne sont pas statistiquement différentes (Gluckman, 2011).

Un des problèmes majeurs de la greffe de CSH avec une USP est le faible nombre de progéniteurs et de CSH présents dans le greffon par rapport aux greffons de MO ou de CSP (Rocha *et al.*, 2009). Le temps de prise de greffe (défini comme le premier de trois jours consécutifs avec un nombre de neutrophiles $> 0,5 \cdot 10^9/l$) peut alors être prolongé, avec un temps médian d'environ 30 jours pour une greffe de sang placentaire, 21 jours pour une greffe de MO et 14 jours pour une greffe de sang périphérique (Danby and Rocha, 2014).

Afin d'augmenter le nombre de CNT/kg de receveur, la greffe de deux USP partiellement HLA compatible a été étudiée. De nombreux rapports confirment la bonne prise de la greffe ainsi que des résultats prometteurs concernant la survie après cette double greffe (Scaradavou *et al.*, 2013). Chez les patients ayant subi une double greffe, on observe

la dominance de l'une des deux USP, sans que l'on sache pourquoi. Dans un rapport du groupe Minnesota, la double greffe d'USP s'est révélée être un facteur de risque pour le développement d'une GVH aiguë. Ainsi, la survenue d'une GVH aiguë de grade II pour une double greffe (58%) est significativement supérieure par rapport à une simple greffe (39%), alors que l'incidence d'une GVH aiguë de grade III-IV est similaire pour les deux groupes (19% avec une double greffe et 18% avec une greffe simple). La double greffe d'USP est donc prometteuse, cependant le délai de prise de la greffe et d'autres résultats ne sont pas encore satisfaisants (Kang *et al.*, 2010).

En 2009, Eurocord a publié des recommandations pour la sélection des USP en vue d'une greffe de CSH (Rocha *et al.*, 2009) :

- ~ USP avec une compatibilité HLA de 6/6 ou de 5/6 :
 - Hémopathie maligne : 2,5 à $3,0 \cdot 10^7$ CNT/kg ;
1,2 à $1,7 \cdot 10^5$ cellules CD34+/kg ;
 - Pathologie non maligne : 2,5 à $3,0 \cdot 10^7$ CNT/kg ;
1,2 à $1,7 \cdot 10^5$ cellules CD34+/kg ;
- ~ USP avec une compatibilité HLA de 4/6 :
 - Hémopathie maligne : > $3,5 \cdot 10^7$ CNT/kg ;
> $1,7 \cdot 10^5$ cellules CD34+/kg ;
 - Pathologie non maligne : > $4,0$ à $5,0 \cdot 10^7$ CNT/kg ;
> $2,0$ à $2,5 \cdot 10^5$ cellules CD34+/kg.

Ainsi, quand pour une USP (avec une compatibilité HLA de 6/6 ou de 5/6) ne contient pas suffisamment de CNT à la congélation ($< 2,5 \cdot 10^7$ /kg), une double greffe doit être envisagée, en visant une dose combinée de CNT $> 3,0 \cdot 10^7$ /kg (Danby and Rocha, 2014).

L'ABM, étant bien consciente que les USP les plus riches sont celles qui ont le plus de chance d'être cédées, les spécifications du RFSP concernant le nombre de CNT à la réception à la BSP ont changé en fin d'année 2013. Par conséquent, le seuil de CNT conforme est passé de $1,4 \cdot 10^9$ à $1,8 \cdot 10^9$ au moment de la réception à la BSP. Ce changement est également dû au fait que la France a atteint son objectif de 30 000 USP stockées fin 2013.

La greffe de sang de cordon doit répondre à de nouveaux défis comme par exemple l'amélioration de la vitesse de prise de greffe de CSH et la diminution de la mortalité liée à la greffe. Plusieurs possibilités sont à l'étude :

- ~ augmenter le nombre de donneurs afin d'augmenter le nombre de greffons avec une compatibilité HLA de 6/6. Dans le petit groupe de patients ayant reçu 6 antigènes HLA compatibles sur 6, la prise de greffe de sang de cordon ombilical est améliorée, la GVH est réduite et la survie semble meilleure par rapport à une greffe de MO non apparentée avec HLA compatible (Gluckman and Rocha, 2009) ;
- ~ faire une perfusion intra-osseuse montre une meilleure prise de greffe plaquettaire et une plus faible incidence de GVH aiguë comparée à une perfusion IV (Gluckman and Rocha, 2009) ;
- ~ réaliser une greffe avec un conditionnement d'intensité réduit. Le conditionnement de la greffe est moins myéloablatif mais fournit tout de même une immunosuppression suffisante pour permettre la prise de la greffe (Rocha *et al.*, 2009) ;
- ~ réaliser une déplétion en cellules T du greffon : avant l'injection au patient, le greffon est mis en contact avec un anticorps polyclonal anti-thymocytes. Celui-ci permet de réduire le nombre de lymphocyte T dans le greffon et ainsi l'incidence d'une GVH (Rocha *et al.*, 2009) ;
- ~ faire une greffe de cellules amplifiées *in vitro* (de Lima *et al.*, 2008) ;
- ~ réaliser une greffe avec une USP avec une incompatibilité KIR-ligand. Ceci permet une diminution des rechutes et une augmentation de la survie après la greffe dans les cas de pathologies malignes (Rocha *et al.*, 2009).



Figure 11 : Situation du Réseau Français de Sang Placentaire en décembre 2012 (Le don, le prélèvement et la greffe de moelle osseuse - Agence de la biomédecine)

4. L'étude

4.1 Objectif de l'étude

La BSP du CHU de Nancy, conventionnée avec la maternité Majorelle de Nancy, a ouvert ses portes le 19 novembre 2012. Cette thèse a pour objectif l'analyse des causes de non-conformité des USP réceptionnées à la BSP du CHU de Nancy en 2013, première année d'activité.

Nous allons décrire ici les causes les plus fréquentes de destruction, déterminer les différents taux de destruction et proposer des solutions pour diminuer ces taux.

Puis nous comparerons les caractéristiques des différentes USP prélevées en 2013 par la maternité Majorelle par rapport à toutes les USP prélevées en France sur la même période par les différentes maternités. Nous pourrons ainsi déterminer si la Polyclinique Majorelle connaît les mêmes causes de destruction que les autres maternités et si ces causes sont retrouvées dans les mêmes proportions.

Enfin, nous nous intéresserons plus particulièrement aux USP inscrites sur le registre en 2013. Nous tenterons ainsi d'identifier les USP inscrites sur le registre qui ont le plus de chances d'être cédées pour une greffe au regard de leur richesse cellulaire et/ou de leur typage HLA peu fréquent.

4.2 Matériel et méthodes

4.2.1 Type d'étude

Nous avons réalisé une étude rétrospective sur les causes de non inscription des USP sur le registre national ainsi qu'une analyse du stock d'USP inscrites sur le registre. Les USP prélevées à la Polyclinique Majorelle ont été envoyées à la BSP du CHU de Nancy (UTCT : Unité de Thérapie Cellulaire, banque de Tissus et banque de sang placentaire). L'étude a été réalisée du 1^{er} janvier 2013 au 31 décembre 2013 et 440 USP ont été prélevées durant cette période.

4.2.2 Population

Après information de la mère et signature du consentement, le recueil de sang placentaire est réalisé quel que soit le mode d'accouchement (voie basse ou césarienne) par différents intervenants (sages-femmes, médecins obstétriciens). Les USP sont ensuite envoyées à la BSP.

4.2.3 Recueil des données

Les données ont été recueillies de manière rétrospective à partir d'un tableau réalisé par la BSP. Ce tableau a été complété à partir de fiches techniques de prélèvement remplies par les sages-femmes au moment du prélèvement et par le personnel de la BSP au moment des manipulations sur la poche de sang et lors des différentes étapes de validation de l'USP.

4.2.4 Référentiels

- ~ Arrêté du 16 décembre 1998 portant homologation des règles de bonnes pratiques relatives au prélèvement, au transport, à la transformation y compris la conservation, des cellules souches hématopoïétiques issues du corps humain et des cellules mononucléées sanguines utilisées à des fins thérapeutiques.
- ~ Décision du 27 octobre 2010 définissant les règles de bonnes pratiques relatives à la préparation, à la conservation, au transport, à la distribution et à la cession des tissus, des cellules et des préparations de thérapie cellulaire.
- ~ Arrêté du 23 décembre 2010 relatif aux modalités d'exécution des analyses de biologie médicale pour la recherche des marqueurs infectieux sur les éléments et produits du corps humain prélevés à des fins thérapeutiques, à l'exception des gamètes, du sang et des produits sanguins.
- ~ Fiche des spécifications des unités de sang placentaires issues du RFSP (document RFSP du 22-06-11)

4.2.5 Période d'étude

Notre étude descriptive, rétrospective s'est déroulée sur une année : du 1^{er} janvier 2013 au 31 décembre 2013.

4.2.6 Critères de qualité

Les USP réceptionnées à la banque doivent respecter des critères de qualité pour être inscrites sur le registre national. Si tous ces critères sont remplis, l'USP est dite conforme. Ainsi le taux de conformité a été défini par le nombre d'USP conformes pour tous les critères de qualité selon les spécifications du RFSP sur le nombre d'USP réceptionnées à la BSP.

4.2.6.1 Critères de conformité des USP à la réception à l'UTCT

Le volume d'une USP à réception à la BSP doit être supérieur ou égal à 70 ml hors anticoagulant, soit un poids supérieur ou égal à 137g pour la poche de sang. Les 137g correspondent au poids de la poche, de la tubulure, de l'anticoagulant (présent dans la poche avant le prélèvement) et du sang de cordon.

Le nombre de CNT doit être supérieur ou égal à $1,4 \cdot 10^9$ selon les spécifications du RFSP au moment de l'étude.

4.2.6.2 Spécifications des USP après miniaturisation et avant la congélation

Le nombre de CNT doit être supérieur ou égal à $1,0 \cdot 10^9$ et le nombre de cellules CD34+ supérieur à $1,8 \cdot 10^6$ avant congélation selon les spécifications du RFSP au moment de l'étude.

4.2.6.3 Critères de conformité des marqueurs biologiques

Des prélèvements de sang sont réalisés sur la mère au moment de l'accouchement afin de rechercher les marqueurs infectieux suivants : HIV, HBV, HCV, syphilis, HTLV, CMV, EBV, toxoplasmose. Ces tests sont effectués par sérologie pour tous les marqueurs et par diagnostic génomique viral pour le HIV, le HBV et le HCV. Un résultat positif sur au moins une des sérologies HIV, HBV (hors profil hépatite B ancienne), HCV, syphilis ou HTLV exclut directement l'USP.

En ce qui concerne CMV, EBV et toxoplasmose, seule une primo-infection en cours avec IgM positive sans présence d'IgG élimine l'USP. Si y a présence d'IgM et d'IgG, on réalise alors une PCR pour s'assurer de l'absence de réplication virale.

Sur l'USP sont aussi réalisées les analyses suivantes : recherche de contamination microbiologique et recherche d'hémoglobinopathie. L'USP est considérée comme non conforme si le contrôle microbiologique est positif avec présence de bactéries aérobies ou anaérobies ou de levures et s'il est détecté une hémoglobinopathie.

Si l'ensemble de ces analyses révèle au moins une anomalie, le sang de cordon ne peut être conservé. Lors de la cession de l'USP, d'autres analyses sont réalisées sur le sang de cordon telles que la recherche des marqueurs infectieux suivants : HIV, HBV, HCV, syphilis, HTLV.

De plus, le groupe sanguin est déterminé sur l'USP. Le groupe sanguin peut parfois être difficile à déterminer sur l'USP. En effet, les antigènes du système ABO peuvent avoir une densité très faible au niveau des hématies au moment de la naissance. Ils subissent une maturation post-natale et acquièrent une réactivité totale aux alentours de deux ans. Ainsi, il est possible d'identifier plusieurs colonies différentes dans un sang de cordon. Cette pluralité est-elle due à l'immaturité des antigènes de système ABO ou y'a-t-il eu contamination du sang de cordon par du sang maternel ? Les deux cas de figure se sont présentés à l'UTCT. De ce fait, une double population d'hématies dans le sang de cordon est un critère d'élimination de l'USP.

4.2.7 Critères de prélèvement

4.2.7.1 La maternité et la banque de sang placentaire

La collecte des USP se fait dans des maternités publiques ou privées autorisées par l'ARS pour le prélèvement de cellules souches à visée thérapeutique (arrêté du 14 décembre 2009). Pour cette étude, toutes les USP ont été prélevées à la Polyclinique Majorelle. Cette maternité a obtenu la décision favorable de l'ARS 2011/43 le 21 septembre 2011, après avis de l'ABM. Cette autorisation, renouvelable, est délivrée pour une période de 5 ans. De plus, une convention entre la maternité et la BSP a été signée le 10 octobre 2012. La BSP du CHU de Nancy fait partie du RFSP et est la 12^{ème} et dernière banque de ce réseau. Elle a commencé son activité en novembre 2012.

Au sein de la maternité, l'activité de prélèvement de sang placentaire est coordonnée par la sage-femme référente de la Maternité.

4.2.7.2 Le consentement et l'entretien médical prénatal

L'information sur le don de sang placentaire (Annexe 1) est initiée, pour les grossesses non pathologiques, au cours de l'une des consultations systématiques prénatales par le médecin obstétricien ou la sage-femme. Les femmes enceintes doivent passer un entretien médical simplifié de pré-don afin de vérifier qu'il n'existe pas de contre-indication pour leur propre santé mais également pour la santé du receveur. Toutes les femmes ne peuvent pas donner car des critères stricts de sélection médicale des donneuses ont été établis par le RFSP. Elles ont ensuite jusqu'à l'accouchement pour accepter ou non le don de sang placentaire. Ce consentement (Annexe 1) est révocable sans forme et à tout moment tant que le prélèvement n'est pas intervenu. Le don de sang placentaire ne peut plus être proposé à partir du moment où le travail est actif (3-4 cm de dilatation avec des contractions régulières), d'après les recommandations du RFSP. En effet, la mère doit pouvoir se concentrer sur l'information donnée.

4.2.7.3 Les préleveurs

Le prélèvement de sang placentaire est placé sous la responsabilité d'un médecin obstétricien. Selon les Bonnes Pratiques de 1998, les personnes habilitées à prélever sont des sages-femmes diplômées d'Etat et les gynécologues obstétriciens.

Afin qu'une sage-femme puisse réaliser seule le prélèvement du sang placentaire, elle doit avoir réalisé au minimum cinq prélèvements sous encadrement. Au terme des cinq prélèvements, les volumes et bactériologies sont analysés conjointement par un responsable de la BSP et la sage-femme référente. Au regard des événements qui auraient pu rendre les prélèvements non valides (petit placenta, urgences obstétricale ou pédiatrique) et si la sage-femme référente atteste l'acquisition d'une technique correcte de prélèvement, la sage-femme pourra être validée.

Dans le cas contraire, la sage-femme en cours de validation devra réaliser d'autres prélèvements sous la responsabilité d'un préleveur validé jusqu'à sa validation définitive.

Une sage-femme en cours de validation doit être accompagnée d'un préleveur validé lors des prélèvements. Le cas échéant, la fiche technique de prélèvement doit mentionner les deux personnes présentes qui y apposent leur signature.

4.2.7.4 Le prélèvement

Le matériel de prélèvement doit être préparé à l'avance. Il comprend le chariot avec la balance-agitateur, la soudeuse et la poche de prélèvement anti-coagulée et stérile étiquetée au nom de la mère. La poche de prélèvement contient 21 ml d'anticoagulant, le citrate phosphate dextrose adénine (CPD-A). Une petite poche satellite, contenant 7 ml de CPD-A, est présente et est ajoutée à la fin du prélèvement. On ajoute ensuite une paire de gants stériles, des compresses imbibées de Bétadine® et un champ stérile.

En salle de naissance, la sage-femme ou le gynécologue en charge de la patiente vérifie qu'il n'y a pas de contre-indication médicale de dernière minute. Le prélèvement de sang placentaire intervient dès la naissance de l'enfant après le clampage précoce et la section du cordon ombilical (Lasky *et al.*, 2002). Le cordon ombilical est clampé grâce à une pince Kocher à environ 10 cm de l'enfant puis on place une deuxième pince à 2 cm de la première afin de couper le cordon. On remplace le champ sous fessier souillé par un nouveau champ stérile. On désinfecte ensuite le cordon ombilical avec les compresses de Bétadine® de la pince Kocher vers le placenta. On introduit alors le trocart dans la veine ombilicale au plus près de la pince Kocher, biseau vers le bas, et on « traite » le cordon avec une compresse par pression alternative. Le prélèvement doit se poursuivre jusqu'à décollement et expulsion du placenta, cette étape engendrant un afflux de sang dans le

cordon. On clampé ensuite la tubulure du trocart puis on la purge à l'aide du clamp bleu. Après le prélèvement, on casse le bec plastique blanc intra-tubulaire et on ajoute l'anticoagulant de la petite poche. On clampé et on purge de nouveau la tubulure à l'aide du clamp bleu. On note le volume approximatif de la poche et on colle l'étiquette de la patiente sur la poche en vérifiant l'identité de celle-ci. La sage-femme référente soude la tubulure en 3 points à environ 20 cm de la poche. Elle place ensuite l'USP dans un sac plastique ainsi que le consentement signé et la fiche technique de prélèvement et le tout est conservé entre 4 et 10°C avant d'être envoyé à la BSP. Selon les BP de 1998, l'USP doit être cryopréservée dans les 24 heures qui suivent le prélèvement. Ainsi, deux navettes se chargent du transport des USP de la maternité vers la BSP à 12h et à 17h.

La nécessité d'une prise en charge médicale appropriée de la mère ou du nouveau-né peut annuler à tout moment la réalisation de la collecte de sang placentaire en salle de naissance.



Figure 12 : Prélèvement du sang de cordon

4.2.7.5 Réception de l'USP à la BSP

Lors de la réception à la banque, les USP sont anonymisées, enregistrées dans le système informatique et pesées. Si le poids est conforme aux spécifications, un échantillon de l'USP est prélevé pour déterminer quelles unités iront vers l'étape de préparation. Les critères de sélection établis par le RFSP reposent sur le volume ainsi que sur la richesse en CNT du produit cellulaire prélevé. Une réduction de volume est réalisée sur les USP avec

une technique automatique permettant une bonne reproductibilité. Cette étape de miniaturisation permet de réduire le volume de plasma et de globules rouges. Le volume de produit fini est de 25 ml après addition de la solution cryoprotectrice composée de DMSO (diméthylsulfoxyde)/HES (hydroxyethylstarch) (Rubinstein, 2009). Deux segments de tubulures sont attachés à la poche et permettent de réaliser des tests complémentaires au moment de la cession de l'USP. Les USP sont alors congelées dans un programmeur de descente en température contrôlée ou, pour certaines banques, dans un automate assurant la congélation et le stockage. La miniaturisation des USP facilite la conservation en azote gazeux ou liquide en limitant les espaces nécessaires de stockage. À la congélation, les USP ne sont conservées que si elles répondent aux deux critères quantitatifs établis par le RFSP qui sont une richesse en CNT et en cellules CD34+.

La qualification des USP comprend également l'obtention des données de viabilité cellulaire, contrôle de stérilité, numération des érythroblastes, électrophorèse de l'hémoglobine, typage HLA de l'USP en biologie moléculaire. Après qualification, les USP validées sont enregistrées informatiquement sur le registre FGM.

4.2.7.6 L'enfant

Dans les quarante-huit heures après la naissance de l'enfant, le pédiatre de la maternité remplit une fiche de qualification néonatale de l'enfant (Annexe 2) ayant pour objectif de vérifier la bonne santé du nouveau-né. Cette fiche sera ensuite transmise à la BSP.

Au minimum six semaines après la naissance, une fiche de qualification post-natale (Annexe 3) sera complétée par le médecin qui suit l'enfant afin de confirmer le bon état de santé de celui-ci ; le document sera alors adressé à la BSP. Ces informations sont nécessaires pour confirmer que l'USP est utilisable à des fins de greffe. En effet, après réception de résultats négatifs pour les tests microbiologiques et réception de la fiche de qualification post-natale, on réalise une sérologie et un diagnostic génomique viral sur le sang de la mère ainsi qu'une électrophorèse de l'hémoglobine sur le sang de l'enfant. On effectue ensuite un typage HLA de l'USP et de la mère. Cette dernière étape permet de valider définitivement l'USP. Celle-ci peut alors être inscrite sur le registre national. Les mères sont informées que, si un problème de santé important intervient dans la vie de l'enfant même plusieurs années après, elles doivent communiquer l'information à la BSP qui, le cas échéant, pourra décider de détruire l'USP.

4.2.7.7 La mère

Si l'USP est congelée, la sage-femme référente complète avec la mère un document de qualification médicale relatif aux antécédents de la mère et du père (Annexe 4). Puis sur la fiche de qualification post-natale (Annexe 3), la mère indiquera les éventuels problèmes de santé survenus l'accouchement.

4.2.7.8 Cession d'une USP

Lors de la cession d'une USP, des contrôles sont effectués sur un des deux segments attachés à la poche. On réalise un contrôle de viabilité des cellules CD34+, un typage HLA succinct (pour être sûr que ce soit la bonne USP) et un test clonogénique des CFU-GM. Les contrôles des marqueurs infectieux sur les échantillons de sérum et de plasma de l'USP sont alors réalisés.

4.2.8 Analyse statistique

Les variables qualitatives ont été décrites par les pourcentages et les effectifs ; les variables quantitatives par la moyenne \pm l'écart-type, la médiane et les valeurs minimales et maximales.

La comparaison d'un pourcentage (obtenu pour la BSP de Nancy) à un pourcentage théorique (pourcentage national) est réalisée par un test de signification avec un risque alpha de 5%. La table de l'écart-réduit est utilisée pour ce test.

Les tests de liaison entre le nombre de CNT, le nombre de cellules CD34+, le délai de réception à la banque et le volume sanguin des USP sont effectués par corrélation linéaire et par le calcul du coefficient de corrélation (r) ainsi que le calcul du coefficient de détermination (r^2). Les tests sont réalisés avec un risque alpha de 5%. Une valeur de $p < 0,05$ a été retenue comme significative.

Conditions d'application du test du « r » de Pearson, il faut que :

- ~ les deux variables soient quantitatives;
- ~ la distribution conjointe des deux variables soit bi-normale;
- ~ les observations soient indépendantes.

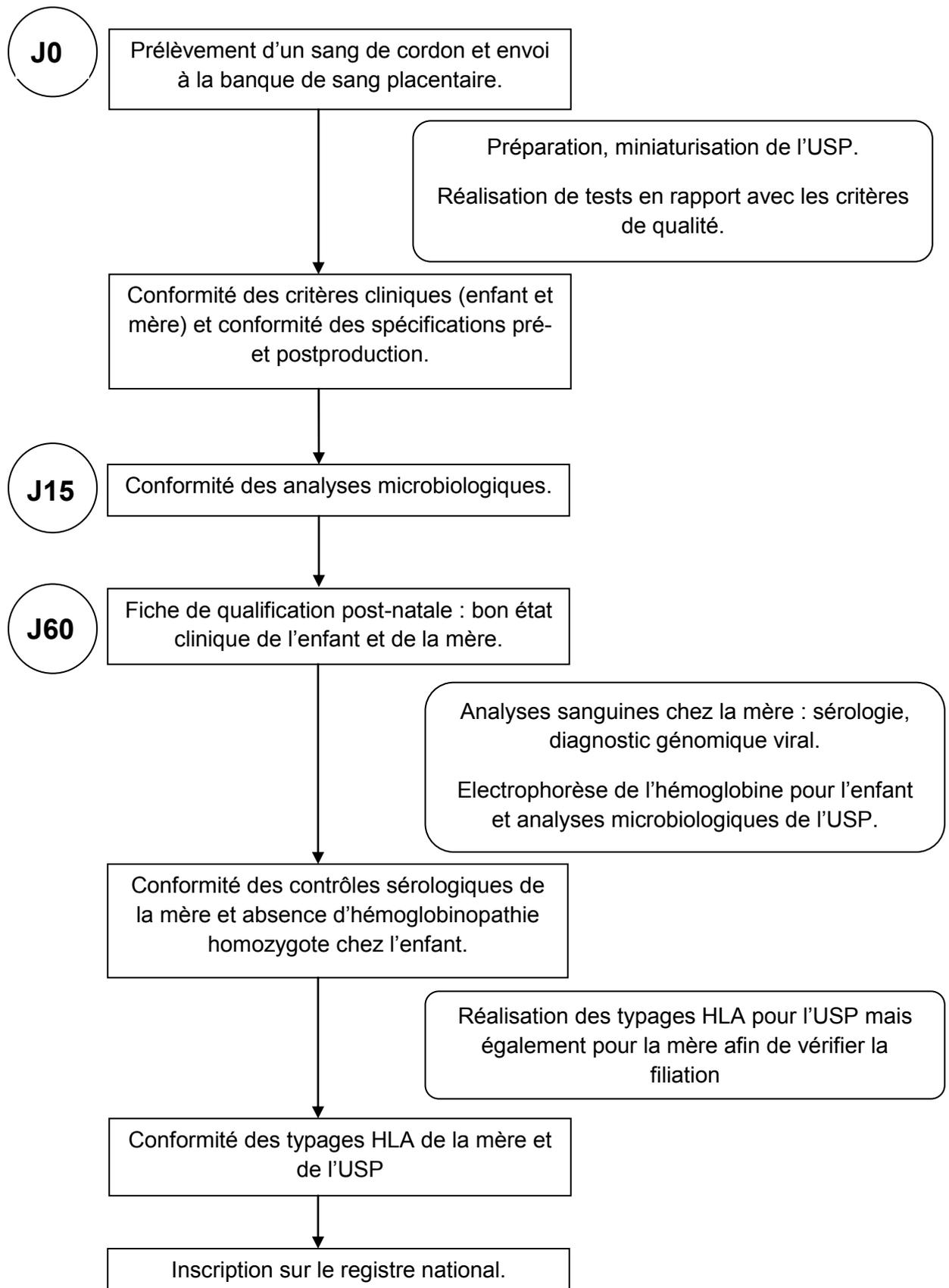


Figure 13 : Logigramme du prélèvement à l'inscription de l'USP sur le registre national

5. Résultats

5.1 Etat des USP prélevées

Nous avons réparti les USP en quatre états par ordre chronologique en fonction des étapes de manipulation de la poche.

5.1.1 USP détruites à la réception

Sur les 440 prélèvements réceptionnés, **298** ont été écartés dès le départ (67,7%). Ces prélèvements ont été éliminés pour les deux raisons principales suivantes : volume de la poche trop faible ou nombre de CNT à la réception trop faible. D'autres raisons plus rares ont été constatées : agrégats dans la poche, poche mal soudée...

5.1.2 USP détruites après préparation

Le volume et le nombre de CNT étaient conformes à la réception mais les résultats d'autres contrôles qualité sont revenus non-conformes par la suite, une bactériologie positive étant la principale raison de destruction à ce niveau. Parmi les autres causes de non-conformité, nous retrouverons : un nombre de cellules CD34+ ou de CNT trop faible au moment de la congélation, un problème technique au moment de la congélation, des contraintes techniques, une sérologie virale positive, un problème d'identification des tubes maternels, une CI au don... On compte **55** USP (12,5%) détruites à cette étape.

5.1.3 USP congelées

87 USP (19,7%) ont été congelées au cours de l'année 2013. Parmi ces 87 USP congelées, 85 ont été inscrites sur le registre FGM à ce jour. Les 2 USP non inscrites sont encore en attente de certains résultats pour pouvoir finaliser l'inscription.

5.1.4 USP utilisée pour la greffe

Tous les résultats étaient conformes. Parmi les 85 poches inscrites sur le registre, **1** a été recrutée par un centre de greffe étranger puis cédée afin d'être utilisée pour une allogreffe.

Au final, **353** USP sur les 440 prélevées ont été détruites au cours du procédé, soit 80,2%.

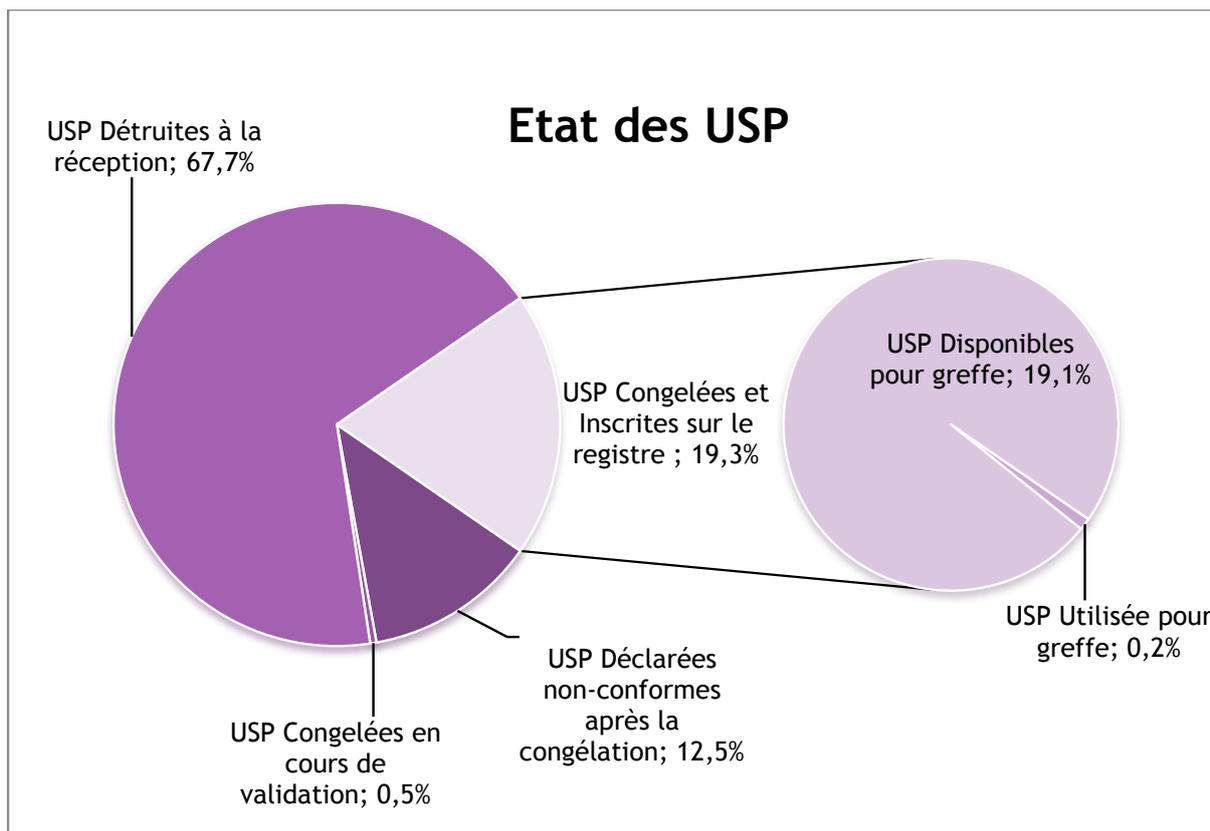


Figure 14 : Répartition des USP : 4 états différents

5.2 Délai de réception des USP

Les USP prélevées à la maternité Majorelle doivent être acheminées à la banque et congelées dans les 24 heures. Si le délai des 24 heures est dépassé, la poche de sang ne peut plus être congelée.

Les 440 USP ont été acheminées à l'UTCT en moyenne en $7,43 \pm 0,30$ heures. Une sous-analyse sur les USP congelées révèle un temps moyen très proche : $7,80 \pm 0,29$ heures.

Tableau IV : Délai d'acheminement des USP

| USP | Délai d'acheminement (h) | | |
|-----------|--------------------------|--------------------------|---------|
| | Nombre | Moyenne \pm Ecart-type | Médiane |
| Totales | 440 | $7,43 \pm 0,30$ | 3,75 |
| Congelées | 87 | $7,80 \pm 0,29$ | 4,17 |

Nous avons recherché si un lien entre le délai de réception de l'USP à la BSP et le nombre de CNT au moment de la réception à la BSP existait. Pour cela, nous réalisons un test de liaison (Annexe 5.1). On ne montre pas de lien entre le nombre de CNT et le délai de

réception des prélèvements à la BSP au risque de 5%. Ce résultat renseigne sur le fait que quel que soit le temps de conservation des USP à la maternité, il n'y a pas de lien direct avec la richesse en CNT.

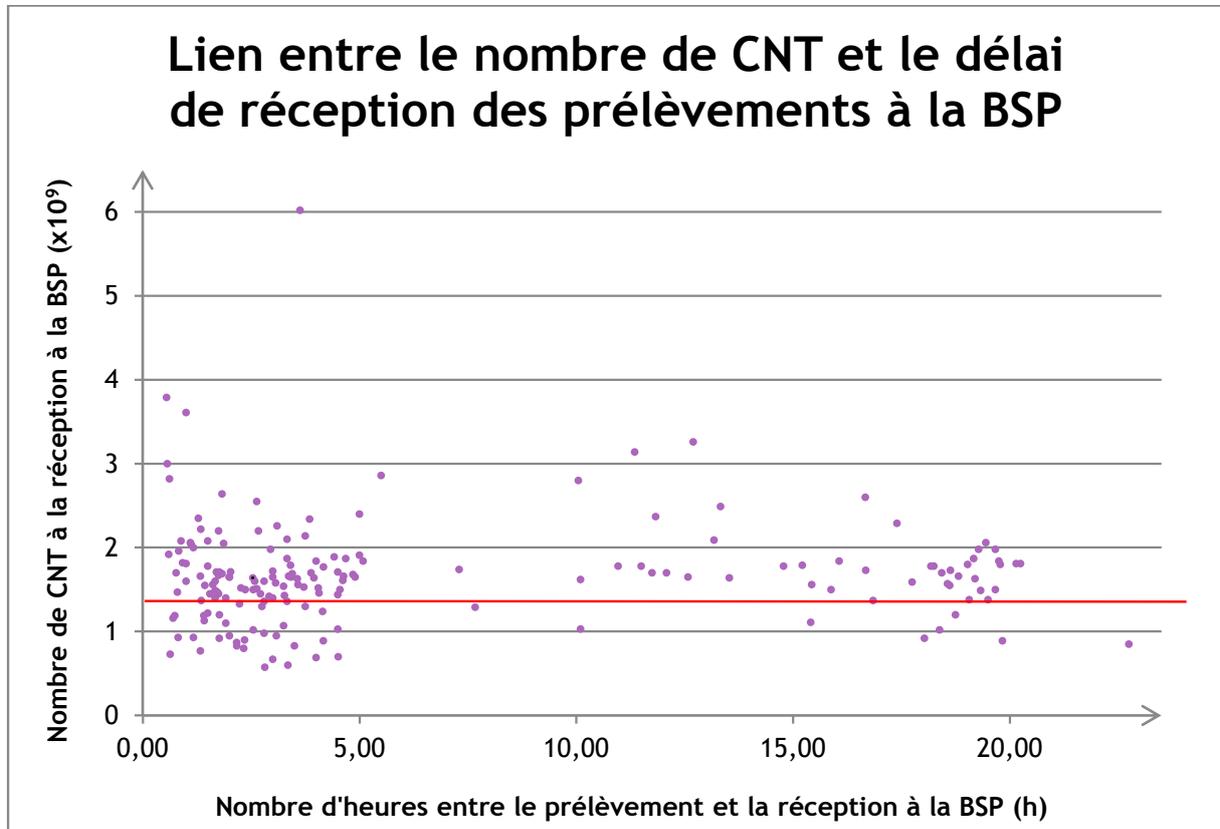


Figure 15 : Nombre de CNT à la réception en fonction du délai de réception des prélèvements à la BSP

5.3 Délai de congélation des USP

Comme nous l'avons dit plus haut, les USP doivent être prélevées, acheminées à la BSP, mises en production et congelées dans les 24 heures pour être considérées comme conformes. Pour les 87 USP congelées, on note un délai moyen entre le prélèvement et la congélation de $15,76 \pm 7,09$ heures avec un minimum de 2,60 heures et un maximum de 19,60 heures.

Ce délai très inférieur à 24 heures est lié au fait que deux navettes quotidiennes assurent le transport des USP de la maternité à la BSP. De plus la maternité est située à proximité de la BSP.

5.4 Causes de destruction des USP

Dans le tableau réalisé par l'UTCT, on répertorie 13 causes de destruction des USP. Nous ne traiterons ici que les 5 causes principales : le volume trop faible, le nombre de CNT < $1,4 \cdot 10^9$ à la réception, la contamination microbienne, le nombre de cellules CD34+ < $1,8 \cdot 10^6$ et le nombre de CNT < $1,0 \cdot 10^9$ au moment de la congélation.

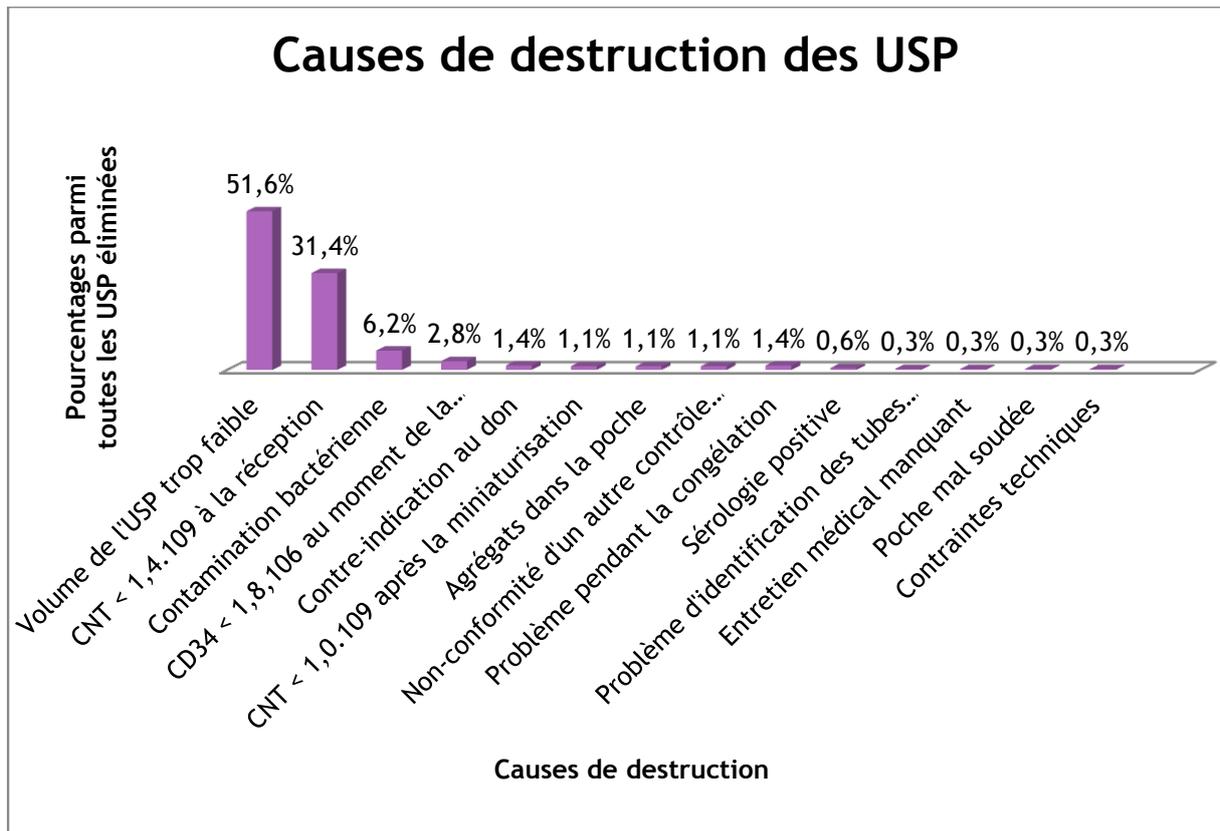


Figure 16 : Les causes de destruction et leurs pourcentages

5.4.1 Volume de l'USP trop faible

C'est la cause la plus fréquente de destruction des poches de sang placentaire. Sur les 440 prélèvements réceptionnés, **182** (soit **41,4%**) ont été éliminés à cause d'un volume trop faible c'est-à-dire inférieur à 70 ml.

Le volume moyen pour les 87 USP congelées est de 109 ± 29 ml (70 – 227 ml). Pour les USP éliminées pour volume trop faible, la moyenne est de 52 ± 12 ml (7 – 69 ml).

Tableau V : Volume des USP (ml)

| USP | Volume des USP (ml) | | | | |
|------------------------------|---------------------|--------------------------|---------|---------|---------|
| | Nombre | Moyenne \pm Ecart-type | Médiane | Minimum | Maximum |
| Totales | 440 | 80 \pm 31 | 78 | 7 | 227 |
| Éliminées pour volume faible | 182 | 52 \pm 12 | 54 | 7 | 69 |
| Congelées | 87 | 109 \pm 29 | 103 | 70 | 227 |

La moyenne nationale de poches éliminées pour volume trop faible est de 37,5%. Parmi les 10 BSP nationales pour lesquelles nous avons les chiffres (Annexe 5), on note un minimum de 18,6% et un maximum de 55,4% en ce qui concerne les poches éliminées pour cause de volume trop faible. On montre que le taux observé à la BSP de Nancy est significativement supérieur au taux national ($p < 0,045$) au risque 5% (Annexe 5.2).

5.4.2 CNT < $1,4 \cdot 10^9$ à la réception

La deuxième cause la plus fréquente d'élimination des USP est le nombre de CNT inférieur à $1,4 \cdot 10^9$ au moment de la réception. Sur les 440 prélèvements réceptionnés, **111** (soit **25,2%**) ont été éliminés à cause d'un nombre de CNT trop faible au moment de la réception.

Le nombre de CNT n'a été comptabilisé que pour 250 USP au total sur les 258 non éliminées pour volume trop faible. Les 8 USP, pour lesquelles le nombre de CNT n'est pas connu, ont été éliminées à cause d'agrégats dans la poche, de contraintes techniques ou de poche mal soudée.

Le nombre moyen de CNT à la réception pour les 87 USP congelées est de $1,93 \cdot 10^9 \pm 0,67$ (1,36 – 6,02). Pour les 111 USP éliminées, on note en moyenne $1,01 \cdot 10^9 \pm 0,19$ (0,51 – 1,33) CNT au moment de la réception.

Tableau VI : Nombre de CNT à la réception ($\times 10^9$)

| USP | Nombre de CNT à la réception ($\times 10^9$) | | | | |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------|---------|---------|---------|
| | Nombre | Moyenne \pm Ecart-type | Médiane | Minimum | Maximum |
| USP non éliminées pour volume trop faible | 250 | 1,48 \pm 0,61 | 1,45 | 0,51 | 6,02 |
| Éliminées pour nombre de CNT trop faible | 111 | 1,01 \pm 0,19 | 1,02 | 0,51 | 1,33 |
| Congelées | 87 | 1,93 \pm 0,67 | 1,71 | 1,36 | 6,02 |

Dans le tableau VI, on note que quelques USP ont été validées avec un nombre de CNT à la réception inférieur à $1,4 \cdot 10^9$. En effet, la BSP du CHU de Nancy a admis une tolérance quant au taux de CNT à la réception étant donné le rendement moyen de miniaturisation de la BSP (82%) et le fait que l'on contrôle de nouveau le taux de CNT au moment de la congélation, qui doit alors être supérieur ou égal à $1,0 \cdot 10^9$. Ainsi les poches contenant un nombre de CNT à la réception supérieur à $1,35 \cdot 10^9$ étaient tolérées et poursuivaient le processus de validation.

La moyenne nationale des poches éliminées pour un nombre de CNT trop faible à la réception est de 35,1% (17,0% - 54,1%). Les chiffres sont difficiles à interpréter car certaines banques ont appliqué les nouveaux seuils de CNT (CNT > $1,8 \cdot 10^9$ à la réception au lieu de $1,4 \cdot 10^9$) dès le mois de novembre 2013 alors que les autres, comme la banque de Nancy, ont attendu le 1^{er} février 2014. On montre que le taux observé à la BSP de Nancy est significativement inférieur au taux national ($p < 5 \cdot 10^{-5}$) au risque 5% (Annexe 5.3).

5.4.3 CNT < $1,0 \cdot 10^9$ au moment de la congélation

Sur les 440 prélèvements réceptionnés, 4 (soit **0,9%**) ont été éliminés car le nombre de CNT était inférieur à $1,0 \cdot 10^9$ après la miniaturisation c'est-à-dire au moment de la congélation. Dans le cas de ces 4 USP, le rendement de miniaturisation était compris entre 64 et 74%.

Le nombre de CNT à la congélation pour les 87 USP congelées est de $1,4 \cdot 10^9 \pm 0,5$ (1,0 – 4,7) en moyenne. Pour les 4 USP éliminées à ce stade, la moyenne est de $0,9 \cdot 10^9$.

Tableau VII : Nombre de CNT au moment de la congélation (x10⁹)

| USP | Nombre de CNT au moment de la congélation (x10 ⁹) | | | | |
|----------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------|---------------------|---------|---------|---------|
| | Nombre | Moyenne ±Ecart-type | Médiane | Minimum | Maximum |
| USP pour lesquelles le nombre de CNT a été calculé | 138 | 1,4 ± 0,4 | 1,3 | 0,9 | 4,7 |
| Éliminées pour nombre de CNT trop faible | 4 | 0,9 ± 0,03 | 0,9 | 0,9 | 0,9 |
| Congelées | 87 | 1,4 ± 0,5 | 1,3 | 1,0 | 4,7 |

5.4.4 Cellules CD34+ < 1,8.10⁶ au moment de la congélation

Sur les 440 prélèvements réceptionnés, **10** (soit **2,3%**) ont été éliminés car le nombre de cellules CD34+ était inférieur à 1,8.10⁶ au moment de la congélation de l'USP. Pour les 10 USP éliminées, le nombre moyen de cellules CD34+ est de 1,6.10⁶ ± 0,1 (1,4 – 1,7). Le nombre de cellules CD34+ à la congélation pour les 87 USP congelées est de 5,1.10⁶ ± 3,5 (1,8 – 22,3) en moyenne.

Tableau VIII : Nombre de cellules CD34+ au moment de la congélation de l'USP (x10⁶)

| USP | Nombre de cellules CD34+ au moment de la congélation (x10 ⁶) | | | | |
|---------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|---------------------|---------|---------|---------|
| | Nombre | Moyenne ±Ecart-type | Médiane | Minimum | Maximum |
| USP pour lesquelles le nombre de cellules CD34+ a été calculé | 131 | 4,6 ± 3,2 | 3,8 | 1,2 | 22,3 |
| Éliminées pour nombre de cellules CD34+ trop faible | 10 | 1,6 ± 0,1 | 1,6 | 1,4 | 1,7 |
| Congelées | 87 | 5,1 ± 3,5 | 4,1 | 1,8 | 22,3 |

Si on regroupe les deux causes, CNT et cellules CD34+ inférieures aux spécifications au moment de la congélation, on note **14** USP éliminées, soit 3,4%. La moyenne nationale

est de 2,0% avec un minimum de 0,1% et un maximum de 3,7%. On montre que le taux observé à la BSP de Nancy est significativement supérieur au taux national ($p < 0,02$) au risque 5% (Annexe 5.4).

5.4.5 Contaminations microbiennes de l'USP

Un seul contrôle microbiologique est effectué sur les USP à la fin du procédé. Sur les 440 prélèvements réceptionnés, **22** (soit **5,0%**) ont été éliminés à cause d'une contamination bactérienne. Les bactéries isolées proviennent de la peau, de la muqueuse vaginale ou de la muqueuse intestinale. Les bactéries les plus retrouvées dans les prélèvements sont : *Lactobaccillus sp*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus anginosus*, *Escherichia coli*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides fragilis* et *Propionibacterium acnes*. Même si on ne peut pas l'affirmer, la contamination bactérienne a probablement eu lieu au moment du prélèvement puisque toutes les manipulations effectuées sur la poche à la BSP sont réalisées en système clos et que la provenance de la majorité des bactéries est sans équivoque vaginale ou intestinale.

La moyenne nationale est de 1,7% pour des contrôles bactériologiques positifs de l'USP. Le minimum est de 0,6% et le maximum est de 5,0%. On montre que le taux observé à la BSP de Nancy est significativement supérieur au taux national ($p < 5.10^{-8}$) au risque 5% (Annexe 5.5).

5.4.6 Autres causes

Parmi les autres causes de destruction, on retrouve :

- ~ La présence d'agrégats dans la poche,
- ~ Une contre-indication au don,
- ~ Un problème pendant la congélation de la poche,
- ~ Un problème d'identification des tubes maternels,
- ~ Un souci de non-conformité au niveau d'un autre contrôle qualité,
- ~ Un entretien médical manquant,
- ~ Une poche mal soudée à sa réception,
- ~ Des contraintes techniques.

En regroupant toutes ces causes, on trouve **24** prélèvements éliminés, soit **5,5%**. La moyenne nationale pour les autres causes est de 2,6%, avec un minimum de 0,1% et un maximum de 7,0%. On montre que le taux observé à la BSP de Nancy est significativement supérieur au taux national ($p < 5.10^{-4}$) au risque 5% (Annexe 5.6).

5.5 Lien entre le volume et le nombre de CNT à la réception

Nous réalisons un test de liaison entre ces deux variables. On montre un lien entre le volume et de nombre de CNT à la réception des prélèvements à la BSP au risque 5% (Annexe 5.7).

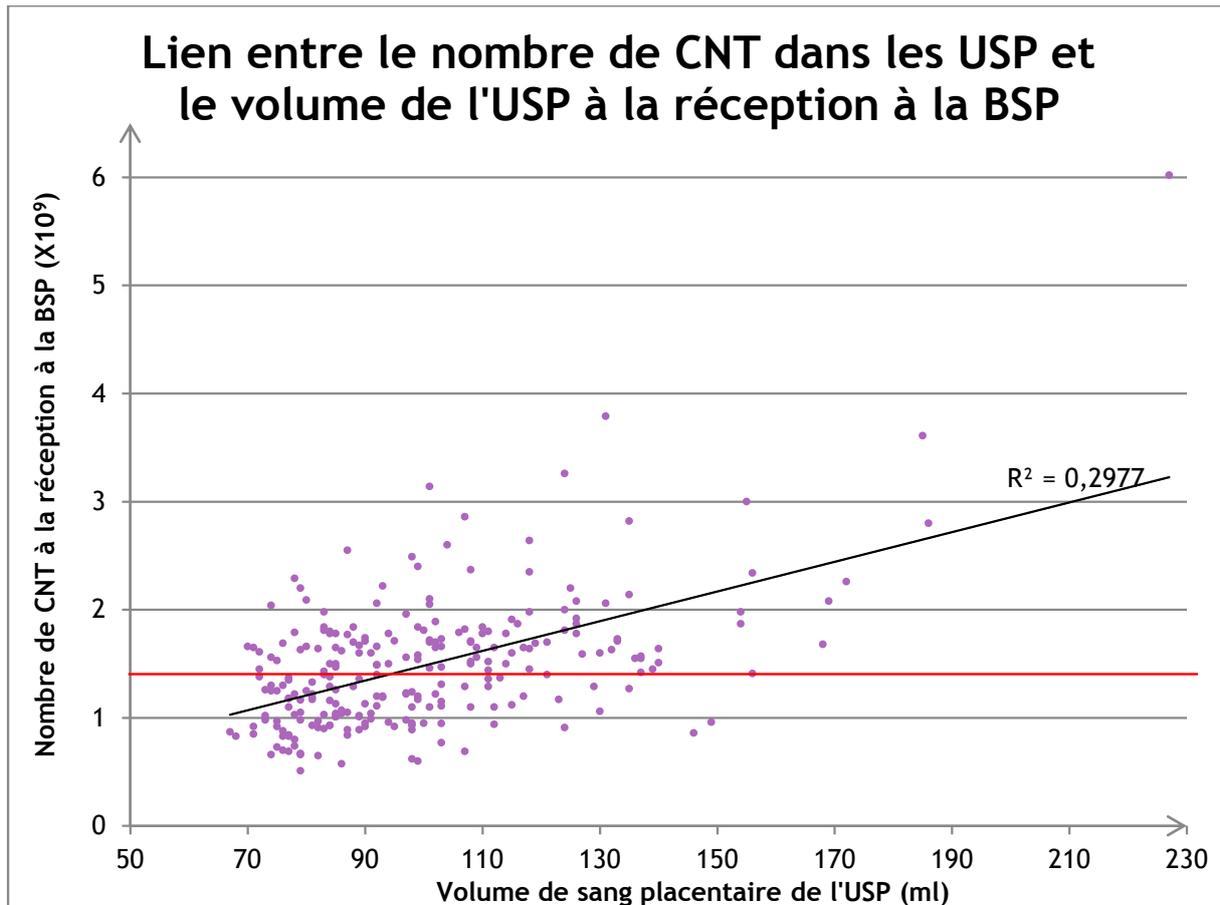


Figure 17 : Nombre de CNT à la réception à la BSP en fonction du volume de l'USP

5.6 Lien entre le nombre de cellules CD34+ à la congélation et le nombre de CNT à la réception

Nous réalisons un test de liaison entre ces deux variables. On montre un lien entre le nombre de cellules CD34+ à la congélation et de nombre de CNT à la réception des prélèvements à la BSP au risque 5% (Annexe 5.8).

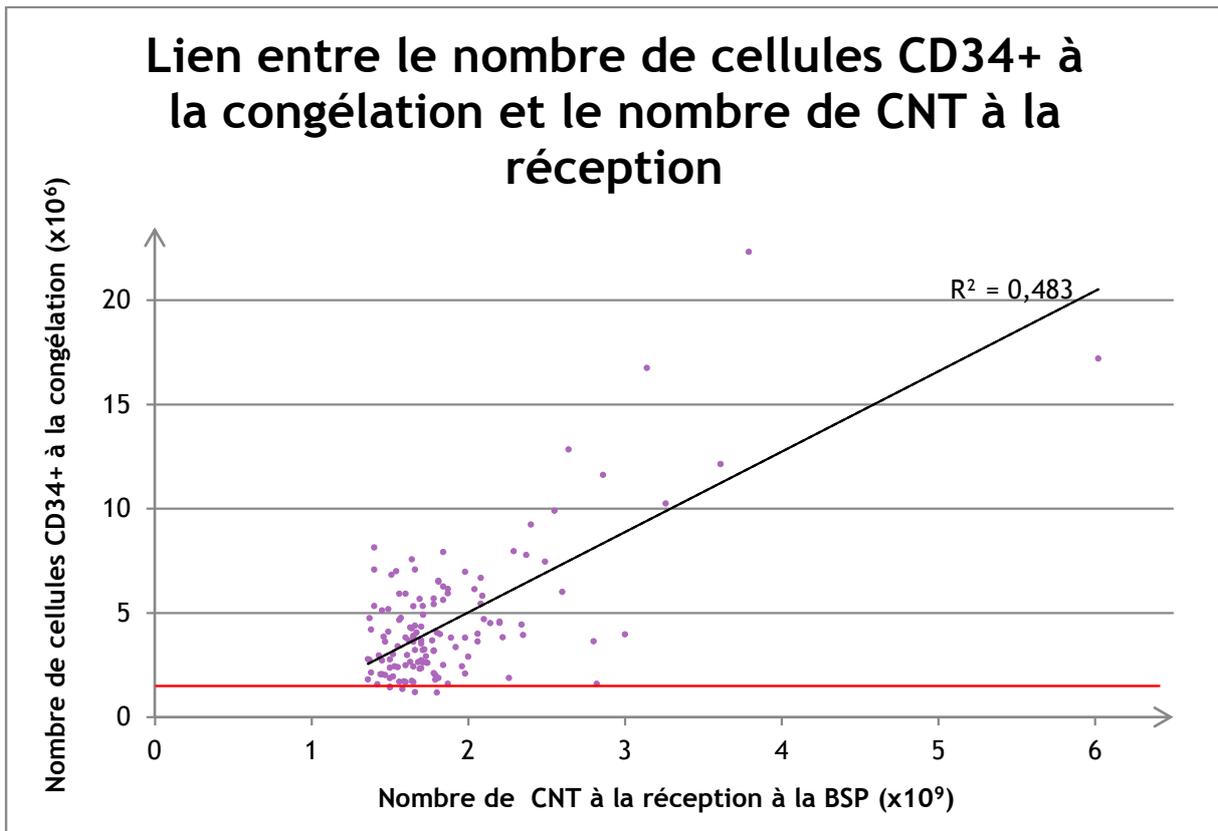


Figure 18 : Nombre de cellules CD34+ au moment de la congélation en fonction du nombre de CNT à la réception de l'USP

5.7 Hémoglobinopathies

Une recherche d'hémoglobinopathie est effectuée sur l'USP après l'obtention de la qualification post-natale.

Parmi les 440 prélèvements réceptionnés à la BSP de Nancy, 3 ont révélé une anomalie de l'hémoglobine :

- ~ Pour deux USP, on suspectait un trait alpha-thalassémique ou alpha thalassémie mineure. C'est une maladie génétique de l'hémoglobine due à une mutation de deux gènes α entraînant une anomalie de fabrication de la chaîne α de l'hémoglobine. L' α -thalassémie mineure est le plus souvent asymptomatique. Parfois une anémie modérée sans conséquence pour la santé peut être observée.
- ~ Une USP a montré une hémoglobinopathie C à l'état hétérozygote. Dans ce cas, on observe une mutation unique sur la chaîne β de l'hémoglobine entraînant ainsi la production d'hémoglobine C. Cette dernière possède une solubilité moindre par rapport à l'hémoglobine A1. A l'état hétérozygote, l'hémoglobinopathie C est en général asymptomatique.

L'une des USP possédant un trait α -thalassémique a été éliminée à cause d'un nombre de cellules CD34+ trop faible au moment de la congélation. Les deux autres USP ont été inscrites sur le registre national.

Le trait α -thalassémique et l'hémoglobinopathie C, dans le cas où elles sont hétérozygotes (un des parents est sain), ne sont pas des contre-indications à la greffe de l'USP. Cependant, il convient de mentionner l'anomalie lors d'un éventuel choix de l'USP pour un centre greffeur.

5.8 Caractéristiques des 85 USP inscrites sur le registre en 2013 comparativement aux chiffres nationaux

Un rapport d'activité du RFSP sur l'inscription et la cession des USP au niveau national sur l'année 2013 a été publié par l'ABM en mars 2014. Contrairement à notre étude qui tient compte des USP prélevées sur l'année 2013 à la BSP de Nancy, le rapport du RFSP tient compte uniquement des USP inscrites sur le registre national en 2013. Une comparaison stricte avec notre activité n'est donc pas possible mais nous les rapportons à titre indicatif.

5.8.1 Richesse en CNT et en cellules CD34+ à la congélation

Au cours de l'année 2013, 7989 USP ont été inscrites sur le registre national par les différentes BSP en France.

Sur le rapport du RFSP, on note 61 USP inscrites sur le registre en 2013 pour la BSP de Nancy. Dans notre analyse, on compte 85 USP inscrites sur le registre puisque nous tenons compte des USP prélevées en 2013 et qui ont été inscrites sur le registre ensuite.

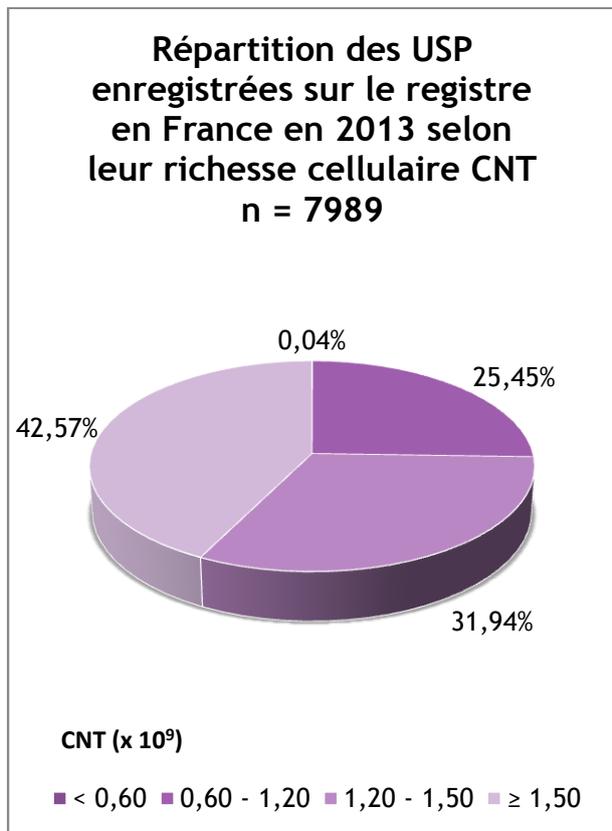


Figure 19 : Répartition des USP stockées en France en 2013 selon leur richesse cellulaire (CNT)

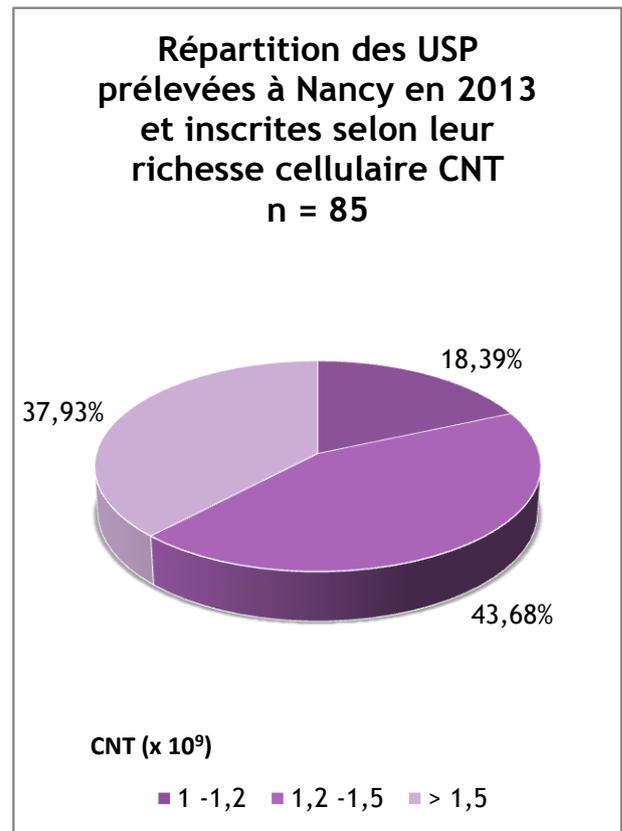


Figure 20 : Répartition des USP prélevées à Nancy en 2013 et inscrites selon leur richesse cellulaire (CNT)

Au 31 décembre 2013, on compte au total 31230 USP enregistrées sur le registre français. Sur ces 31230 USP stockées, 745 ont fait l'objet d'une demande pour une potentielle greffe de CSH au cours de l'année 2013 et 256 ont pu être cédées dont 133 pour des patients nationaux et 123 pour des patients internationaux.

Deux USP de la BSP de Nancy ont fait l'objet d'une demande en 2013 dont l'une qui a été cédée.

A l'échelle nationale, les USP cédées sont majoritairement (75%) des USP renfermant un taux de CNT > 1,5.10⁹. En effet, comme mentionné précédemment, le critère de richesse cellulaire est l'un des deux critères de choix d'un greffon pour une allogreffe.

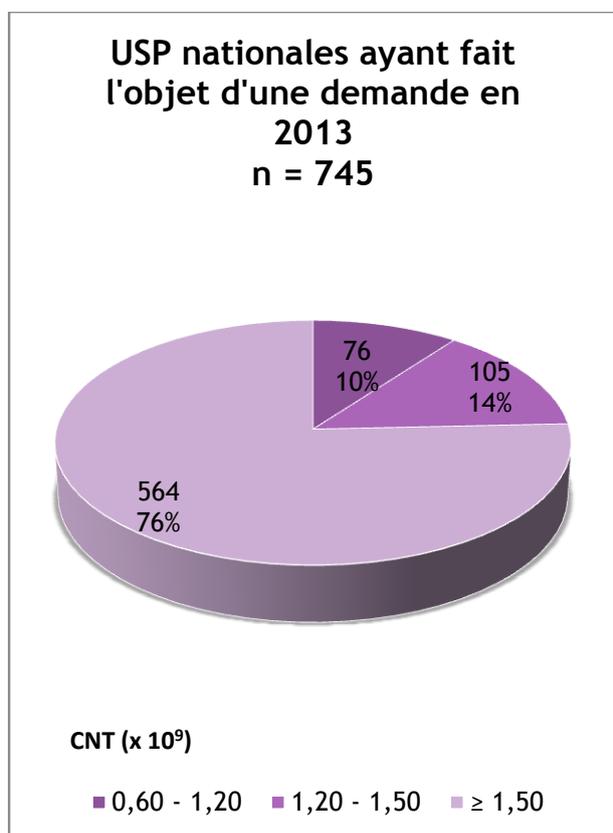


Figure 21 : USP nationales ayant fait l'objet d'une demande en 2013

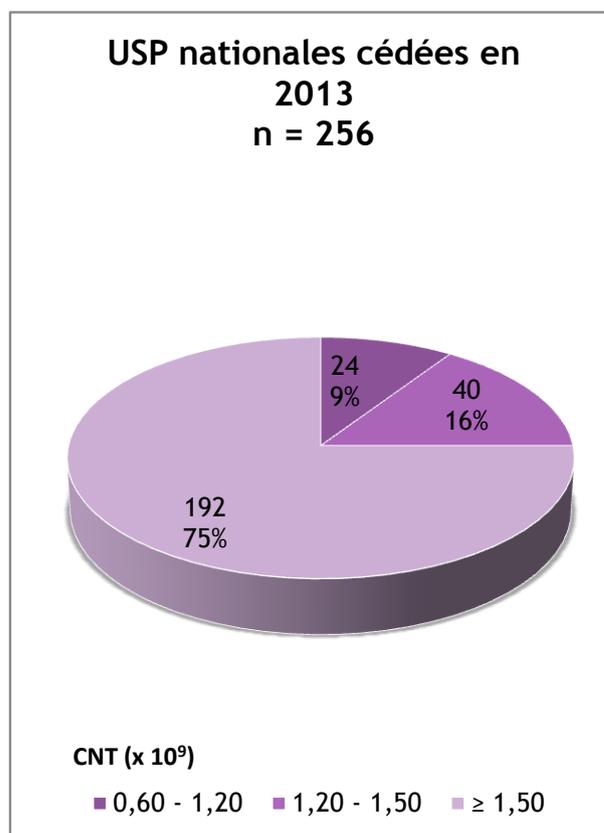


Figure 22 : USP nationales cédées en 2013

Tableau IX : Nombre de CNT et de cellules CD34+ pour les USP ayant fait l'objet d'une demande et les USP cédées au cours de l'année 2013

| | USP ayant fait l'objet d'une demande | | | USP cédée | | |
|----------------|--------------------------------------|---------------------------------|--------------------------------------------|-----------|---------------------------------|--------------------------------------------|
| | Nombre | Médiane CNT (x10 ⁹) | Médiane cellules CD34+ (x10 ⁶) | Nombre | Médiane CNT (x10 ⁹) | Médiane cellules CD34+ (x10 ⁶) |
| BSP nationales | 745 | 1,93 | 7,1 | 256 | 1,95 | 7,2 |

L'USP cédée le 9 septembre 2013 contenait 2,25.10⁹ CNT et 3,97.10⁶ cellules CD34+. Une USP a fait l'objet d'une demande le 27 novembre 2013. Elle contient 2,4.10⁹ CNT et 16,75.10⁶ cellules CD34+.

Le fait qu'il n'y ait eu qu'une seule USP cédée par la BSP de Nancy au cours de l'année 2013, ne nous permet pas de comparer la richesse en CNT et en cellules CD34+ par rapport à toutes les USP cédées par les BSP françaises.

Parmi les 87 USP congelées, 30 possèdent un nombre de CNT supérieur à 1,5.10⁹ et ont, si l'on s'en réfère à la tendance nationale, plus de chance d'être cédées que les autres USP, moins riches en CNT.

Tableau X : Nombre d'USP disponibles pour greffe en fonction de la richesse en CNT

| | Nombre de CNT à la congélation (x10 ⁹) | | |
|--------------|----------------------------------------------------|-----------------|--------|
| | ≥ 1,00 - < 1,20 | ≥ 1,20 - < 1,50 | ≥ 1,50 |
| Nombre d'USP | 16 | 40 | 30 |

5.8.2 Typage HLA

La compatibilité HLA entre le donneur et le receveur est l'un des critères principaux lors de la cession d'une USP. Certains typages HLA sont considérés comme fréquents dans la population française alors que d'autres sont rares voire très rares. Dans le tableau ci-dessous, se retrouve la liste des 25 haplotypes HLA-A, B, DR les plus fréquents présents sur le registre national pour l'année 2013.

Tableau XI : Liste des 25 haplotypes HLA-A, B, DR les plus fréquents du registre (source ABM)

| | A | B | DR |
|-----------|----------|----------|-----------|
| 1 | 1 | 8 | 17 |
| 2 | 29 | 44 | 7 |
| 3 | 3 | 7 | 15 |
| 4 | 2 | 44 | 4 |
| 5 | 30 | 18 | 17 |
| 6 | 3 | 35 | 17 |
| 7 | 2 | 7 | 15 |
| 8 | 23 | 44 | 7 |
| 9 | 2 | 62 | 4 |
| 10 | 1 | 57 | 7 |
| 11 | 2 | 44 | 7 |
| 12 | 2 | 18 | 11 |
| 13 | 30 | 13 | 7 |
| 14 | 2 | 51 | 11 |
| 15 | 2 | 44 | 13 |
| 16 | 2 | 44 | 11 |
| 17 | 2 | 8 | 17 |
| 18 | 11 | 35 | 1 |
| 19 | 2 | 51 | 13 |
| 20 | 24 | 7 | 15 |
| 21 | 31 | 60 | 4 |
| 22 | 2 | 50 | 7 |
| 23 | 2 | 60 | 13 |
| 24 | 2 | 44 | 1 |
| 25 | 2 | 62 | 13 |

Les 85 USP inscrites sur le registre ainsi que le sang de la mère ont fait l'objet d'un typage HLA. Ainsi, nous avons pu reconstituer les haplotypes HLA pour chaque USP et les comparer à la liste des 25 haplotypes HLA les plus fréquents dans le registre. Dans le tableau XII, les haplotypes HLA des USP de la BSP de Nancy prélevées en 2013 ont été classés en trois catégories en fonction de leur fréquence.

Tableau XII : Analyse des Haplotypes HLA- A, B, DR retrouvés à la BSP de Nancy selon la liste des 25 haplotypes les plus fréquents du registre

| Nombre d'haplotypes HLA-A, B, DR fréquents retrouvés à la BSP de Nancy parmi la liste des 25 haplotypes les plus fréquents dans le registre | | | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|---|-------|--------|
| 0 | 1 | 2 | Total | % de 0 |
| 48 | 28 | 9 | 85 | 56,5 % |

On peut ainsi observer que 56,5 % des USP inscrites sur le registre par la BSP de Nancy n'apportent pas les 25 haplotypes les plus fréquents. Elles apportent donc des haplotypes peu fréquents et constituent un intérêt tout particulier pour les patients qui présentent un typage HLA avec des haplotypes peu fréquents et pour lesquels il sera difficile de trouver un donneur non apparenté. En analysant les allèles peu fréquents, onze présentent un allèle qualifié de rare (Dr Anne Kennel, Laboratoire HLA CHU de Nancy).

Nous pouvons essayer de comparer ces chiffres avec les chiffres des 12 BSP françaises. Le rapport du RFSP nous donne les chiffres pour les haplotypes des USP inscrites sur le registre en 2013.

Tableau XIII : Analyse des Haplotypes HLA- A, B, DR selon la liste des 25 haplotypes les plus fréquents dans le fichier des USP inscrites en 2013 sur le registre national

| Nombre d'haplotypes HLA-ABDR fréquents parmi la liste des 25 haplotypes les plus fréquents dans le fichier des USP inscrites en 2013 | | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|------|-----|-------|--------|
| BSP | 0 | 1 | 2 | Total | % de 0 |
| Besançon | 518 | 376 | 60 | 954 | 54,3% |
| Bordeaux | 517 | 350 | 44 | 911 | 56,8% |
| Créteil | 647 | 345 | 59 | 1051 | 61,6% |
| Lille | 467 | 292 | 50 | 809 | 57,7% |
| Marseille | 191 | 67 | 9 | 267 | 71,5% |
| Montpellier | 371 | 247 | 31 | 649 | 57,2% |
| Nancy | 39 | 19 | 3 | 61 | 63,9% |
| Paris Saint-Louis | 434 | 234 | 30 | 698 | 62,2% |
| Poitiers | 247 | 192 | 28 | 467 | 52,9% |
| Rennes | 244 | 190 | 36 | 470 | 51,9% |
| Rhône-Alpes | 953 | 625 | 74 | 1652 | 57,7% |
| Total | 4628 | 2937 | 424 | 7989 | 57,9% |

La distribution des allèles varie en fonction du groupe ethnique. Ainsi, ici, on définit quatre groupes ethniques :

- ~ Caucasiens (CAU) ;
- ~ Hispaniques (HIS) ;
- ~ Asiatiques et Américains du Pacifique (API) ;
- ~ Africains et Américains (AFA).

L'allèle DRB1 est très important lors des allogreffes de CSH. Cet allèle est retrouvé avec des fréquences très différentes dans les différents groupes ethniques.

Parmi les 85 USP inscrites sur le registre pour l'année 2013, on en dénombre 11 pour lesquelles l'allèle DRB1 est assez rare par rapport au registre national. On retrouve ainsi :

- ~ DRB1*03:02 : Cet allèle a une fréquence de 6,53% chez les AFA où il est au 5^{ème} rang, c'est-à-dire que c'est le 5^{ème} allèle le plus fréquent dans cette population, mais n'est qu'au 37^{ème} rang chez les CAU.
- ~ DRB1*04:03 ou DRB1*04:52 ou DRB1*04:142N : L'allèle DRB1*04:03 est au 23^{ème} rang pour les CAU. La présence de la lettre « N » pour l'allèle DRB1*04:142N signifie que le gène est présent mais que la protéine n'est pas exprimée à la surface des cellules.
- ~ DRB1*04:05 : Cet allèle a une fréquence de 5,80% chez les API où il est au 6^{ème} rang, mais n'est qu'au 25^{ème} rang chez les CAU.
- ~ DRB1*04:06 ou DRB1*04:144 : L'allèle DRB1*04:06 est au 33^{ème} rang pour les CAU.
- ~ DRB1*04:07 ou DRB1*04:92 : L'allèle DRB1*04:07 a une fréquence de 6,43% chez les HIS où il est au 6^{ème} rang.
- ~ DRB1*04:152.
- ~ DRB1*11:02 : Cet allèle est au 28^{ème} rang pour les CAU.
- ~ DRB1*11:03 : Cet allèle est au 24^{ème} rang pour les CAU.
- ~ DRB1*15:03 : Cet allèle a une fréquence de 11,75% chez les AFA où il est au 1^{er} rang, mais n'est qu'au 35^{ème} rang chez les CAU.
- ~ DRB1*16:02 : Cet allèle est au 30^{ème} rang chez les CAU.

Le typage de l'USP cédée par la BSP de Nancy au cours de l'année 2013 est : A*24 A*29, B*35 B*40, DRB1*09 DRB1*12. L'allèle DRB1*09 est assez rare pour les types CAU (0,82%) mais très fréquent pour les types API (10,18%) pour lesquels il est au 1^{er} rang. L'allèle DRB1*12 est très rare pour les CAU mais fréquent pour les API (7,41%) où il est au 5^{ème} rang.

6. Discussion

Le don de sang placentaire est possible en France grâce à la collaboration de 12 BSP et de près de 75 maternités. Il existe différents types de BSP en France selon les régions dans lesquelles elles se trouvent. Ainsi, elles peuvent être situées dans des sites de l'Etablissement Français du Sang (EFS), dans des établissements de santé du type CHU ou bien dans des Centres de Lutte Contre le Cancer (CLCC). Les prélèvements de sang placentaire sont coordonnés au sein du RFSP et pilotés par l'ABM. Cette dernière gère les USP inscrites sur le registre FGM. Celui-ci est, par ailleurs, relié à tous les registres internationaux, ce qui lui donne l'accès à près de 14 millions de donneurs et 450 000 USP. La BSP du CHU de Nancy, a été la 12^{ème} BSP à ouvrir ses portes au mois de novembre 2012. Elle travaille en collaboration avec la Polyclinique Majorelle, qui s'occupe de l'information pré-don auprès des femmes enceintes ainsi que des prélèvements.

Le rapport du sénateur Marie-Thérèse Hermange, datant de novembre 2008, a fait prendre conscience à l'ABM qu'il fallait augmenter le nombre de BSP et de maternités présentes sur le territoire français. Ce rapport évoquait le fait qu'un trop faible nombre d'USP était stocké en France et que cela avait une conséquence directe en matière financière : « Le nombre relativement faible d'unités stockés [...] augmente la probabilité qu'il n'y ait pas de greffon compatible en France pour un malade. Il est alors fait appel à l'importation de greffons. [...] Le taux de dépendance de la France était en 2007 de 64 %, ce qui, avec un coût moyen d'importation de 18 000 euros, a entraîné un déficit de 3,6 millions d'euros pris en charge par l'assurance maladie. Etant donné le coût de stockage des unités, le coût produit par les importations de greffons aurait pu permettre de stocker près de 1700 unités supplémentaires en France. Certes, rien ne garantit que parmi ces unités supplémentaires se seraient trouvés les greffons dont avaient besoin les malades : l'autosuffisance ne signifie pas l'absence totale de recours à l'importation mais le retard français en matière de stockage ne fait que croître, et son coût avec lui. » (Hermange, 2008). Le coût d'une USP menée à son terme à la BSP de Nancy au cours de l'année 2013, c'est-à-dire prélevée, mise en production, contrôlée, congelée, inscrite sur le registre et cédée est de 2669 euros.

Suite au constat que le stock français d'USP était insuffisant par rapport aux autres pays européens et internationaux, l'ABM a fixé un objectif de 30000 USP inscrites sur le registre français pour la fin de l'année 2013. Le réseau de BSP et de maternités tel que présenté précédemment a été développé. De plus, les BSP françaises pouvaient compter sur des subventions de l'Etat, pour la moitié de leur investissement initial, grâce à la mise en place du « plan cancer » en 2009-2013 (Rouard *et al.*, 2013). Ces subventions ont été mises en place pour une durée de cinq ans : du 1^{er} janvier 2009 au 31 décembre 2013. De plus, chaque BSP est subventionnée pour chaque USP inscrite sur le registre.

Nous avons analysé la première année d'activité (2013) de la BSP du CHU de Nancy. Contrairement à la plupart des BSP française, la BSP de Nancy ne travaille qu'avec une seule maternité, ce qui explique l'activité peu importante de cette BSP pour le moment. Ainsi, au cours de l'année 2013, la BSP de Nancy a dénombré 440 USP prélevées, 87 USP congelées et 85 USP inscrites sur le registre. Les principales causes de non-inscription des USP sur le registre sont pour cette BSP : un volume sanguin trop faible à la réception (41,4%), un nombre de CNT trop faible au moment de la réception (25,2%) ou au moment de la congélation (0,9%), un nombre de cellules CD34+ trop faible au moment de la congélation (2,3%) ou une contamination bactérienne de l'USP (5,0%). On note donc un rendement de 19,3% (soit près d'1 USP sur 5) quant au nombre d'USP inscrites sur le registre par rapport au nombre d'USP prélevées, ce qui est conforme aux critères d'acceptation mis en place par l'ABM en novembre 2012.

6.1 Les causes de non inscription des USP sur le registre

6.1.1 Le volume de départ

On note une grande disparité quant au nombre d'USP éliminées pour volume sanguin trop faible au moment de la réception du prélèvement à la BSP parmi les différentes BSP françaises. Ainsi, nous avons observé que le taux d'élimination de la BSP de Nancy est significativement supérieur au taux national, au risque 5% (41,4% vs 37,5%). En ce qui concerne la Polyclinique Majorelle, tous les prélèvements, quels qu'ils soient, ont été envoyés à la BSP. En effet, on sait que certaines maternités de France se sont mises d'accord avec leur BSP afin d'éliminer directement les prélèvements de volume très faible, sans les transmettre à la BSP. Ainsi certains prélèvements ne sont pas comptabilisés dans les prélèvements réceptionnés à la BSP et donc éliminés pour volume trop faible à leur réception.

6.1.2 Le taux de CNT

Les recommandations du RFSP concernant le nombre de CNT au moment de la réception ont changé fin 2013. Ce changement de seuil de conformité pour les CNT peut expliquer le fait que le taux de prélèvements éliminés pour nombre de CNT trop faible à la réception à la BSP de Nancy soit significativement inférieur au taux national, au risque 5% (25,2% vs 35,1%). En effet, certaines banques ont appliqué le nouveau seuil de CNT dès le mois de novembre 2013 alors que d'autres, comme la banque de Nancy par exemple, ont attendu le 1^{er} février 2014. Par conséquent, certaines BSP ont éliminé des USP à cause d'un nombre de CNT non conforme alors que la BSP de Nancy les aurait considérées comme conformes. De ce fait on ne peut pas véritablement comparer les chiffres ni conclure quant à

la réelle infériorité du taux d'élimination de la BSP de Nancy par rapport aux autres BSP du réseau. De plus, à Nancy, la numération cellulaire n'est faite que si le volume est supérieur à 70 ml. En effet, nous avons démontré un lien entre le volume de l'USP et le nombre de CNT que celle-ci contient au moment de sa réception à la BSP, au risque 5%. Toutefois, les autres BSP ne possèdent pas forcément des critères séquentiels (mesure du volume puis numération des CNT) et font d'emblée les CNT à la réception des USP. Ainsi, des USP ont sans doute été éliminées pour volume faible à la BSP de Nancy alors qu'elles auraient été éliminées pour nombre de CNT trop faible dans d'autres BSP. La comparaison avec les chiffres nationaux doit donc se faire avec prudence, les processus d'élimination n'étant pas strictement identiques d'une BSP à l'autre.

Bien qu'il existe un lien entre volume et CNT, cela ne signifie pas que pour un volume égal ou tout juste supérieur à 70 ml au moment du prélèvement, le nombre de CNT à la réception sera correct. De ce fait, les sages-femmes référentes sont informées qu'il ne faut pas arrêter le prélèvement dès que le volume sanguin atteint les 70 ml, car le seuil conforme de CNT n'est pas forcément atteint à ce volume, mais elles doivent essayer d'obtenir le plus grand volume sanguin possible.

6.1.3 Le taux de CNT avant congélation

Au cours de l'année 2013, à la BSP de Nancy, 4 USP (0,9%) ont été éliminées à cause d'un taux de CNT $< 1,0 \cdot 10^9$ au moment de la congélation. Nous avons constaté, pour ces quatre cas, que le rendement de miniaturisation n'était pas bon ($< 75\%$). Il y a donc eu un problème au moment de la miniaturisation sur le Sepax à la BSP. Cette dernière étudie les causes d'un rendement plus faible pour ces 4 USP. Pour cela, un travail avec le fabricant du Sepax va être mené (Biosafe) afin d'améliorer le rendement de miniaturisation. A Nancy ce rendement est en moyenne de 82%. Si nous parvenons à l'améliorer, il serait alors possible de faire passer en production des USP avec moins de $1,4 \cdot 10^9$ CNT au départ. En effet, d'autres BSP avaient en 2013 un seuil au prélèvement à $1,2 \cdot 10^9$ CNT, puisqu'elles bénéficiaient d'un rendement de miniaturisation systématiquement au moins égal à 83%.

6.1.4 Le taux de cellules CD34+

Nous avons observé que le taux d'USP éliminées à la BSP de Nancy pour un taux de CNT ou de cellules CD34+ au moment de la congélation (3,4%) est significativement supérieur au taux national (2,0%), au risque 5%.

Nous avons démontré un lien entre le nombre de CNT à la réception et le nombre de cellules CD34+ à la congélation de l'USP, au risque 5%. Par conséquent, on peut supposer que les USP conformes au moment de la réception pour le nombre de CNT vont être également conformes pour le nombre de cellules CD34+ au moment de la congélation. A la

BSP de Nancy, parmi les 147 USP conformes quant au nombre de CNT à la réception, 10 ont ensuite été éliminées pour non-conformité quant au nombre de cellules CD34+, malgré un taux de CNT conforme après miniaturisation.

Selon le logigramme de la BSP de Nancy, il n'est pas prévu de réaliser une numération des cellules CD34+ avant l'étape de miniaturisation. En effet, cette analyse des cellules CD34+ systématique a un coût financier. La réalisation de la quantification des cellules CD34+ pour les 147 USP, pour lesquelles le nombre de CNT était correct au moment de la réception, aurait représenté un coût de 3969 euros. La miniaturisation des 10 USP, qui n'étaient pas conformes pour le nombre de cellules CD34+ au moment de la congélation, a coûté quant à elle : 2510 euros. De ce fait, une économie de 1459 euros a été réalisée. Toutefois, même si l'argument financier est important, ce n'est pas ce qui a guidé le choix de ne pas réaliser la numération des cellules CD34+ avant la miniaturisation. En effet, réaliser ce contrôle aurait demandé du temps (2 heures en moyenne) retardant d'autant la mise en production des USP et augmentant le délai entre le prélèvement et la congélation, limité à 24 heures. Ainsi des USP possiblement valides auraient alors été éliminées à cause d'un délai prélèvement-congélation supérieur à 24 heures. Les avantages logistiques, ayant guidé le choix de ce logigramme séquentiel, s'avèrent confortés par un avantage financier, certes mineur.

6.1.5 Le contrôle bactériologique

Les 7 bactéries isolées dans les 22 USP éliminées à cause d'une contamination bactérienne, proviennent de la peau, de la muqueuse vaginale ou de la muqueuse intestinale. Il est très probable que les contaminations bactériennes aient eu lieu au moment du prélèvement et non au moment de la technique de l'USP, puisque celle-ci est réalisée en système clos. De plus, comme nous l'avons mentionné précédemment, les germes étant à tropisme vaginal ou intestinal proviennent très certainement de la mère.

Le pourcentage d'USP éliminées pour contamination microbienne à la BSP de Nancy est significativement supérieur au pourcentage national au risque 5%, puisqu'on observe un taux de 5,0% pour Nancy alors que les neuf autres BSP pour lesquelles nous avons les chiffres ont toutes un taux inférieur à 2,3% (en moyenne 1,7%). Ces résultats, bien que devant être analysés avec prudence nous interpellent. La Polyclinique Majorelle en était à sa première année de fonctionnement en 2013. Par conséquent, un nombre important de nouveaux préleveurs ont été formés tout au long de l'année par les deux sages-femmes référentes, qui ont elles-mêmes été formées à la fin de l'année 2012. Ceci peut expliquer une plus forte proportion de contamination microbienne par rapport aux autres centres préleveurs de France où tout le processus de prélèvement était déjà en place depuis plusieurs mois voire plusieurs années.

Si on analyse l'activité plus en détails, on constate que 15 contaminations microbiennes ont été recensées les six premiers mois de l'année 2013 versus 7 contaminations les six derniers mois de l'année 2013. De plus, sur les huit premiers mois d'activité en 2014, 3 contaminations microbiennes ont été retrouvées. Ces éléments accréditent le fait que les conditions d'asepsie ont été largement prises en compte au fur et à mesure que le personnel a été formé. Ces résultats seront discutés avec la maternité Majorelle, dans un souci d'amélioration continue des pratiques.

6.2 Intérêt des USP de la BSP de Nancy congelées en 2013

Deux facteurs prioritaires sont pris en compte lors de la cession d'une USP en vue d'une greffe de CSH : la compatibilité HLA entre le donneur et le receveur et le nombre de CNT en fonction du poids du receveur.

6.2.1 HLA

Au cours d'une greffe de CSH avec un greffon de sang placentaire, le typage HLA est très important et en particulier l'allèle DRB1. L'USP cédée par la BSP de Nancy en 2013 possédait les allèles DRB1*09:01 et les allèles DRB1*12:01 qui sont des allèles relativement rares sur le registre national. En revanche, ces deux allèles sont très fréquents dans les populations API, Asiatiques et Américains du Pacifique, ce qui peut expliquer que l'USP a été cédée à un centre hospitalier des Etats-Unis. De plus, il faut préciser que la cession de cette USP a eu lieu le 9 septembre 2013, date à laquelle, la BSP de Nancy n'avait inscrit que treize USP sur le registre national.

La BSP de Nancy a inscrit des USP présentant 11 allèles DRB1 rares sur le registre FGM. De plus, 56,5% des USP inscrites en 2013 ne possèdent pas d'haplotypes fréquents. Ces USP apportent donc des haplotypes peu fréquents par rapport au fichier de DVMO et offrent donc une chance supplémentaire pour les patients présentant un typage HLA avec des allèles peu fréquents de pouvoir bénéficier quand même d'une allogreffe. Elles représentent une alternative importante aux DVMO et de ce fait peuvent être cédées au cours de ces prochaines années.

En revanche, la BSP de Nancy n'a pas inscrit sur le registre d'USP avec un allèle DRB1 très rare au cours de l'année 2013. Par définition, un allèle très rare sera également très rare chez des patients. Si ces USP peuvent représenter une chance pour des patients qui n'ont pas de DVMO compatible, la probabilité qu'elles soient cédées un jour demeure très faible et ces USP risquent de rester en stock longtemps à la BSP. De ce fait, avoir un grand stock d'USP avec un typage très rare n'est pas forcément intéressant.

6.2.2 La quantité de CNT

Lors d'une greffe de sang de cordon, la richesse cellulaire, c'est-à-dire le nombre de CNT, est également très important. En effet, le temps de prise de la greffe et le délai de la reconstitution immunitaire chez le receveur dépend de la richesse cellulaire du greffon. La BSP de Nancy a inscrit 30 USP pour lesquelles le nombre de CNT est supérieur à $1,5 \cdot 10^9$. Ces USP sont considérées comme très riches et ont de grandes chances d'être cédées à l'avenir.

6.3 Evolutions et perspectives du RFSP et de BSP nationales

Les recommandations du RFSP concernant le nombre de CNT au moment de la réception ont changé fin 2013. Le seuil de CNT conforme est passé de $1,4 \cdot 10^9$ à $1,8 \cdot 10^9$ au moment de la réception à la BSP. Ce changement de seuil fait suite au fait que la France a atteint fin 2013 l'objectif qu'elle s'était fixé : le stockage de 30 000 USP. De plus, les BSP françaises ont constaté que les USP les plus riches sont celles cédées le plus souvent. Enfin, la qualité des USP françaises est très appréciée à l'international, ce qui fait qu'en augmentant la richesse, elles seront encore plus prisées.

En appliquant ces nouvelles spécifications sur les données de la BSP de Nancy pour l'année 2013, on constate que 54 poches supplémentaires auraient été éliminées pour cause de CNT trop faibles, soit au total 165 poches (37,5%). Au final, 33 USP seulement auraient été inscrites sur le registre par la BSP de Nancy pour l'année 2013, soit 7,5%.

Ces seuils ont été mis en application à la BSP de Nancy en Février 2014. Au plan national il avait été annoncé alors que 10% des USP prélevées seraient réellement inscrites sur le registre national. A titre indicatif, la BSP de Nancy a congelé 15% des USP prélevées depuis février 2014 (chiffres du 22 Aout 2014).

Depuis janvier 2014, les subventions nationales des BSP ont pris fin. Le financement pérenne de l'activité de prélèvement des maternités est actuellement en discussion à la Direction Générale de l'Offre de Soins (DGOS). Cependant, l'activité des BSP ne bénéficie plus de subventions. Les CHU comme l'EFS national peuvent difficilement assumer la charge financière de cette activité. Par conséquent, plusieurs BSP ont fermé ou ont réduit leur activité depuis début 2014 : l'EFS ne conserverait que deux ou trois BSP ; deux autres CHU poursuivent leur activité mais ont fermé des maternités afin de limiter les coûts de transport. De même, la BSP du CHU de Nancy, qui ne possède qu'une petite activité au regard des autres BSP nationales, n'a pas étendu son réseau de maternités. Le

fonctionnement après un an sans subvention permettra de voir si les cessions réalisées ont couvert l'activité de prélèvement.

Il faut également souligner que les USP congelées mais non inscrites sur le registre car non conformes ne sont pas obligatoirement détruites mais utilisées par des groupes de chercheurs. En effet, les CSH du sang placentaire sont étudiées pour leur potentiel à donner d'autres cellules spécialisées comme par exemple des cellules nerveuses, des cellules cardiaques ou des cellules pancréatiques. Ces USP sont donc une source de CSH très utilisée en recherche. Ainsi, des conventions sont signées avec des organismes de recherche ou des sociétés privées afin de céder, au coût réel, ces USP non-conformes pour le registre. La BSP de Nancy vient de signer une convention avec une société privée commercialisant des milieux de culture cellulaire.

Conclusion

L'utilisation d'un greffon de sang placentaire pour réaliser une greffe allogénique de CSH a fait la preuve de son efficacité et de son potentiel considérable. Le fait de pouvoir réduire au moins partiellement l'exigence de compatibilité HLA laisse entrevoir la possibilité d'un greffon disponible pour tout patient en attente de greffe. Toutefois, les limitations, telles que le retard de reconstitution hématopoïétique et immunitaire, méritent d'être prises en compte au moment de la greffe (Tiberghien et al., 2009).

Les BSP se sont multipliées en France ces dernières années afin de rendre disponible, auprès des cliniciens et des patients, un nombre croissant d'USP de qualités optimales. Le travail des sages-femmes et obstétriciens au service de cette activité et de son accroissement est considérable et doit être souligné (Sullivan, 2008).

Le pharmacien d'officine peut également avoir un rôle à jouer dans l'information des patients sur le don de sang placentaire. En effet, le pharmacien est un professionnel de santé facilement accessible à tous. Il participe activement à toutes les campagnes de prévention et de dépistage et, cela, surtout depuis la mise en place de la loi Hôpital Patient Santé et Territoire (HPST) qui a défini pour lui une mission d'éducateur sanitaire relayant les campagnes nationales de santé publique (Hazebroucq *et al.*, 2009). Il peut ainsi aviser les femmes enceintes de l'existence du don de sang de cordon en leur remettant, par exemple, une brochure explicative réalisée par l'ABM et remplir entièrement, auprès de ces femmes, sa fonction de conseiller.

La BSP de Nancy, après une année de fonctionnement, a inscrit 85 USP sur le registre national dont l'une qui a été cédée à un centre greffeur étranger au mois de septembre 2013. Cette analyse des causes de non-inscription des USP sur le registre national, va permettre à la BSP de Nancy et à la Polyclinique Majorelle d'identifier ces dernières, de les limiter et ainsi d'améliorer le rendement d'USP inscrites par rapport au nombre de prélèvements effectués.

En France, avec l'effort des 12 BSP et 75 maternités du RFSP, l'objectif des 30 000 USP stockées a été atteint en décembre 2013. On peut toutefois s'interroger sur l'avenir du réseau mis en place en l'absence de subventions nationales.

Bibliographie

- Antin JH. Graft-versus-leukemia: no longer an epiphenomenon. *Blood* 1993; 82: pp. 2273–2277.
- B. Anthony Armson. Mise en banque du sang de cordon ombilical : Implications pour les fournisseurs de soins périnataux. Directives cliniques de le SOGC 2005: pp. 275–290.
- Barker JN, Krepski TP, DeFor TE, Davies SM, Wagner JE, Weisdorf DJ. Searching for unrelated donor hematopoietic stem cells: availability and speed of umbilical cord blood versus bone marrow. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2002; 8: pp. 257–260.
- Barker JN, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation: current practice and future innovations. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2003; 48: pp. 35–43.
- Bensa J. Le complexe majeur d'histocompatibilité et la définition du soi. *Transfusion Clinique et Biologique* 2003; 10: pp. 209–213.
- Bidri M, Arock M. Différenciation des cellules hématopoïétiques : intervention des cytokines et expression des marqueurs membranaires. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique* 1996; 36: pp. 859–878.
- Bijou F, Ivanovic Z, Boiron J-M, Nicolini F. Mobilisation des cellules souches hématopoïétiques : état de l'art en 2011 et perspectives. *Transfusion Clinique et Biologique* 2011; 18: pp. 503–515.
- Binet C, Zandecki M, Société française d'hématologie. *Hématologie*. Issy-les-Moulineaux: Elsevier-Masson; 2011.
- BISMUTH C. Les cellules souches chez l'adulte, applications possibles en médecine vétérinaire. 2008. 129 p.
- Carstanjen D, Ulbricht N, Iacone A, Regenfus M, Salama A. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is elevated during mobilization of peripheral blood progenitor cells by G-CSF. *Transfusion* 2002; 42: pp. 588–596.
- Cassens U, Ostkamp-Ostermann P, van der Werf N, Garritsen H, Ostermann H, Sibrowski W. Volume-dependent collection of peripheral blood progenitor cells during large-volume leukapheresis for patients with solid tumours and haematological malignancies. *Transfus Med* 1999; 9: pp. 311–320.
- Cesbron Gautier A, Gagne K, Retière C, Devys A, Bignon J-D. Système HLA. *EMC - Hématologie* 2007; 2: pp. 1–20.
- Charbord P, Livne E, Gross G, Häupl T, Neves NM, Marie P, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells: a systematic reappraisal via the genostem experience. *Stem Cell Rev* 2011; 7: pp. 32–42.
- Chatenoud L. *Immunologie*. Paris: Médecine sciences publications-Lavoisier; 2012.

- Choo SY. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med. J.* 2007; 48: pp. 11–23.
- Clutterbuck EJ, Sanderson CJ. Human eosinophil hematopoiesis studied in vitro by means of murine eosinophil differentiation factor (IL5): production of functionally active eosinophils from normal human bone marrow. *Blood* 1988; 71: pp. 646–651.
- Coulombel L, Eaves AC, Eaves CJ. Enzymatic treatment of long-term human marrow cultures reveals the preferential location of primitive hemopoietic progenitors in the adherent layer. *Blood* 1983; 62: pp. 291–297.
- Coulombel L. Cellules souches : un seul nom pour de multiples entités. *Revue Francophone des Laboratoires* 2010; 2010: pp. 29–39.
- Danby R, Rocha V. Improving engraftment and immune reconstitution in umbilical cord blood transplantation. *Front Immunol* 2014; 5: pp. 68.
- DAUSSET J. [Iso-leuko-antibodies]. *Acta Haematol.* 1958; 20: pp. 156–166.
- Drouet F, Lagrange J-L. Dose de tolérance à l'irradiation des tissus sains : la moelle osseuse. *Cancer/Radiothérapie* 2010; 14: pp. 392–404.
- Eaves AC, Eaves CJ. Erythropoiesis in culture. *Clin Haematol* 1984; 13: pp. 371–391.
- Fauchet R, Ifrah N. *Hématologie*. Rennes; Cachan: Centre national d'enseignement à distance ; Editions Médicales Internationales; 1995.
- Fliedner TM, Graessle D, Paulsen C, Reimers K. Structure and function of bone marrow hemopoiesis: mechanisms of response to ionizing radiation exposure. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2002; 17: pp. 405–426.
- Forbes SA, Trowsdale J. The MHC quarterly report. *Immunogenetics* 1999; 50: pp. 152–159.
- Fritsch G, Stimpfl M, Kurz M, Printz D, Buchinger P, Fischmeister G, et al. The composition of CD34 subpopulations differs between bone marrow, blood and cord blood. *Bone Marrow Transplant.* 1996; 17: pp. 169–178.
- Gewirtz AM. Human megakaryocytopoiesis. *Semin. Hematol.* 1986; 23: pp. 27–42.
- Ghanassia É, Procureur V. *Embryologie: biologie du développement et de la reproduction*. De Boeck Secundair; 1999. 432 p.
- Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N. Engl. J. Med.* 1989; 321: pp. 1174–1178.
- Gluckman E, Rocha V, Arcese W, Michel G, Sanz G, Chan K-W, et al. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp. Hematol.* 2004; 32: pp. 397–407.
- Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, et al. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. *Eurocord*

- Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N. Engl. J. Med.* 1997; 337: pp. 373–381.
- Gluckman E, Rocha V. Donor selection for unrelated cord blood transplants. *Curr. Opin. Immunol.* 2006; 18: pp. 565–570.
- Gluckman E, Rocha V. Cord blood transplantation: state of the art. *Haematologica* 2009; 94: pp. 451–454.
- Gluckman E. Milestones in umbilical cord blood transplantation. *Blood Rev.* 2011; 25: pp. 255–259.
- Gratwohl A, Baldomero H, Schwendener A, Rocha V, Apperley J, Frauendorfer K, et al. The EBMT activity survey 2007 with focus on allogeneic HSCT for AML and novel cellular therapies. *Bone Marrow Transplant.* 2009; 43: pp. 275–291.
- Gregory CJ, Eaves AC. Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood* 1978; 51: pp. 527–537.
- De Guerra A, Faucher C, Prada-Bordenave E. Cellules souches hématopoïétiques, du cordon, embryonnaires et autres : un aperçu réglementaire. *Revue Francophone des Laboratoires* 2010; 2010: pp. 69–77.
- Hazebroucq G, Moreau R, Brandon M-T, Casaurang P, Chevallet J, Faure P, et al. Rôle du Pharmacien Correspondant Internet. *Académie nationale de pharmacie*; 2009.
- Hequet O. Les différentes modalités de prélèvement des cellules souches hématopoïétiques. *Transfusion Clinique et Biologique* 2011a; 18: pp. 230–234.
- Hequet O. Les différentes modalités de prélèvement des cellules souches hématopoïétiques. *Transfusion Clinique et Biologique* 2011b; 18: pp. 230–234.
- Hermange M-T. Rapport d'information fait au nom de la commission des Affaires sociales sur le potentiel thérapeutique des cellules souches extraites du sang de cordon ombilical Internet. *Sénat*; 2008. Disponible sur : <http://www.senat.fr/rap/r08-079/r08-0791.pdf>
- Ho AD, Punzel M. Hematopoietic stem cells: can old cells learn new tricks? *J Leukoc Biol* 2003; 73: pp. 547–555.
- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990; 75: pp. 555–562.
- Kamani N, Spellman S, Hurley CK, Barker JN, Smith FO, Oudshoorn M, et al. State of the art review: HLA matching and outcome of unrelated donor umbilical cord blood transplants. *Biol. Blood Marrow Transplant.* 2008; 14: pp. 1–6.
- Kang HJ, Yoo KH, Lee JW, Kim H, Lee SH, Sung KW, et al. Double umbilical cord blood transplantation for children and adolescents. *Ann. Hematol.* 2010; 89: pp. 1035–1044.
- Knudtzon S. In vitro growth of granulocytic colonies from circulating cells in human cord blood. *Blood* 1974; 43: pp. 357–361.

- Komanduri KV, St John LS, de Lima M, McMannis J, Rosinski S, McNiece I, et al. Delayed immune reconstitution after cord blood transplantation is characterized by impaired thymopoiesis and late memory T-cell skewing. *Blood* 2007; 110: pp. 4543–4551.
- Kurtzberg J, Laughlin M, Graham ML, Smith C, Olson JF, Halperin EC, et al. Placental blood as a source of hematopoietic stem cells for transplantation into unrelated recipients. *N. Engl. J. Med.* 1996; 335: pp. 157–166.
- L'Italien R, Lord-Dubé H, Lebel M, Robitaille G, Collège de Sainte-Foy, Québec (Province). Direction générale des moyens d'enseignement. Hématologie. Montréal: Décarie; 1983.
- Lasky LC, Lane TA, Miller JP, Lindgren B, Patterson HA, Haley NR, et al. In utero or ex utero cord blood collection: which is better? *Transfusion* 2002; 42: pp. 1261–1267.
- Lataillade J-J, Brunet De La Grange P, Uzan G, Le Bousse-Kerdiles M-C. Les cellules souches ont-elles l'âge de leur niche ? : À la recherche d'un sérum de jeunesse... *MS. Médecine sciences*; 26: pp. 582–585.
- Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang M-J, Champlin RE, et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351: pp. 2265–2275.
- Li L, Xie T. Stem cell niche: structure and function. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2005; 21: pp. 605–631.
- Lichtman MA. The ultrastructure of the hemopoietic environment of the marrow: a review. *Exp. Hematol.* 1981; 9: pp. 391–410.
- De Lima M, McMannis J, Gee A, Komanduri K, Couriel D, Andersson BS, et al. Transplantation of ex vivo expanded cord blood cells using the copper chelator tetraethylenepentamine: a phase I/II clinical trial. *Bone Marrow Transplant.* 2008; 41: pp. 771–778.
- Long MW, Briddell R, Walter AW, Bruno E, Hoffman R. Human hematopoietic stem cell adherence to cytokines and matrix molecules. *J. Clin. Invest.* 1992; 90: pp. 251–255.
- Manceron V, Guignard S, de Broucker F, Paycha F, Pouchot J, Vinceneux P. Le phénomène de reconversion médullaire et son aspect en imagerie par résonance magnétique : à propos d'un cas. *La Revue de Médecine Interne* 2003; 24: pp. 830–834.
- Marmier-Savet C, Larosa F, Legrand F, Witz B, Michallet M, Ranta D, et al. Persistence of lymphocyte function perturbations after granulocyte-colony-stimulating factor mobilization and cytapheresis in normal peripheral blood stem cell donors. *Transfusion* 2010; 50: pp. 2676–2685.
- MCCULLOCH EA, TILL JE. The radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells, determined by quantitative marrow transplantation into irradiated mice. *Radiat. Res.* 1960; 13: pp. 115–125.

- Najman A, Potron G. *Hématologie: précis des maladies du sang*. Paris: Marketing-Ellipses; 1994.
- Nervi B, Link DC, DiPersio JF. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J. Cell. Biochem.* 2006; 99: pp. 690–705.
- Niehues T, Rocha V, Filipovich AH, Chan KW, Porcher R, Michel G, et al. Factors affecting lymphocyte subset reconstitution after either related or unrelated cord blood transplantation in children -- a Eurocord analysis. *Br. J. Haematol.* 2001; 114: pp. 42–48.
- Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood* 1993; 81: pp. 2844–2853.
- Peled A, Petit I, Kollet O, Magid M, Ponomaryov T, Byk T, et al. Dependence of human stem cell engraftment and repopulation of NOD/SCID mice on CXCR4. *Science* 1999; 283: pp. 845–848.
- Petersdorf EW. Optimal HLA matching in hematopoietic cell transplantation. *Curr. Opin. Immunol.* 2008; 20: pp. 588–593.
- Raba M, Souillet G. Greffe de sang de cordon: données actuelles et perspectives. *Revue Française des Laboratoires* 1998; 1998: pp. 71–74.
- Raoul Y, Gounelle J-C, Gairard A. *Abrégé d'anatomie et de physiologie humaines*. Paris: Masson; 1978.
- Rhodes DA, Trowsdale J. Genetics and molecular genetics of the MHC. *Rev Immunogenet* 1999; 1: pp. 21–31.
- Rocha V, Cornish J, Sievers EL, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001; 97: pp. 2962–2971.
- Rocha V, Gluckman E, Eurocord-Netcord registry and European Blood and Marrow Transplant group. Improving outcomes of cord blood transplantation: HLA matching, cell dose and other graft- and transplantation-related factors. *Br. J. Haematol.* 2009; 147: pp. 262–274.
- Rocha V, Wagner JE Jr, Sobocinski KA, Klein JP, Zhang MJ, Horowitz MM, et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. Eurocord and International Bone Marrow Transplant Registry Working Committee on Alternative Donor and Stem Cell Sources. *N. Engl. J. Med.* 2000; 342: pp. 1846–1854.
- Rossant J, Tam PPL. Blastocyst lineage formation, early embryonic asymmetries and axis patterning in the mouse. *Development* 2009; 136: pp. 701–713.
- Rouard H, Birebent B, Vaquer G, Gautier E. La collecte de sang placentaire : du concept à la réalité. *Transfusion Clinique et Biologique* 2013; 20: pp. 95–98.

- Rubinstein P, Rosenfield RE, Adamson JW, Stevens CE. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood* 1993; 81: pp. 1679–1690.
- Rubinstein P. Cord blood banking for clinical transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 2009; 44: pp. 635–642.
- Ruggeri A, Ciceri F, Gluckman E, Labopin M, Rocha V. Alternative donors hematopoietic stem cells transplantation for adults with acute myeloid leukemia: Umbilical cord blood or haploidentical donors? *Best Pract Res Clin Haematol* 2010; 23: pp. 207–216.
- Scaradavou A, Brunstein CG, Eapen M, Le-Rademacher J, Barker JN, Chao N, et al. Double unit grafts successfully extend the application of umbilical cord blood transplantation in adults with acute leukemia. *Blood* 2013; 121: pp. 752–758.
- Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 1978; 4: pp. 7–25.
- Siena S, Bregni M, Brando B, Ravagnani F, Bonadonna G, Gianni AM. Circulation of CD34+ hematopoietic stem cells in the peripheral blood of high-dose cyclophosphamide-treated patients: enhancement by intravenous recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1989; 74: pp. 1905–1914.
- Sieveking DP, Ng MK. Cell therapies for therapeutic angiogenesis: back to the bench. *Vasc Med* 2009; 14: pp. 153–166.
- Silbernagl S, Despopoulos A, Laurent D. Atlas de poche de physiologie. Paris: Flammarion médecine sciences; 1992.
- Simmons PJ, Levesque JP, Zannettino AC. Adhesion molecules in haemopoiesis. *Baillieres Clin. Haematol.* 1997; 10: pp. 485–505.
- Smith A. A glossary for stem-cell biology. *Nature* 2006; 441: pp. 1060–1060.
- Sullivan MJ. Banking on cord blood stem cells. *Nat. Rev. Cancer* 2008; 8: pp. 555–563.
- Sutherland DR, Keating A, Nayar R, Anania S, Stewart AK. Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry. *Exp. Hematol.* 1994; 22: pp. 1003–1010.
- Takahashi S, Ooi J, Tomonari A, Konuma T, Tsukada N, Oiwa-Monna M, et al. Comparative single-institute analysis of cord blood transplantation from unrelated donors with bone marrow or peripheral blood stem-cell transplants from related donors in adult patients with hematologic malignancies after myeloablative conditioning regimen. *Blood* 2007; 109: pp. 1322–1330.
- Therml H, Diem H, Haferlach T. Atlas de poche d'hématologie. 2ème édition. Paris: Flammarion Médecine-Sciences; 2006.
- Thomson BG, Robertson KA, Gowan D, Heilman D, Broxmeyer HE, Emanuel D, et al. Analysis of engraftment, graft-versus-host disease, and immune recovery following unrelated donor cord blood transplantation. *Blood* 2000; 96: pp. 2703–2711.

- Tiberghien P, Chabod J, Deconinck E, Pouthier F. Conservation et indications des greffons de sang placentaire. *Transfusion Clinique et Biologique* 2009; 16: pp. 204–208.
- Tm D, Eg W, F K, Lg L. Regulation of haemopoietic stem cell proliferation in long term bone marrow cultures. *Biomedicine* 1977; 27: pp. 344–349.
- Trentin JJ. Hemopoietic Microenvironments Internet. In: Tavassoli M, editor(s). *Handbook of the Hemopoietic Microenvironment*. Humana Press; 1989. pp. 1–86.
- Tsuji M, Taguchi A, Ohshima M, Kasahara Y, Sato Y, Tsuda H, et al. Effects of intravenous administration of umbilical cord blood CD34+ cells in a mouse model of neonatal stroke. *Neuroscience* 2014; 263: pp. 148–158.
- Varet B. *Hématologie*. 3ème édition. Paris: Médecine sciences publications-Lavoisier; 2012.
- Vaubourdolle M. *Infectiologie*. Rueil-Malmaison: Wolters Kluwer; 2007.
- Verhasselt B, De Smedt M, Verhelst R, Naessens E, Plum J. Retrovirally transduced CD34++ human cord blood cells generate T cells expressing high levels of the retroviral encoded green fluorescent protein marker in vitro. *Blood* 1998; 91: pp. 431–440.
- Vilmer E. Greffes de sang de cordon: perspectives et problèmes. *Archives de Pédiatrie* 1995; 2: pp. 415–417.
- Wagner JE, Rosenthal J, Sweetman R, Shu XO, Davies SM, Ramsay NK, et al. Successful transplantation of HLA-matched and HLA-mismatched umbilical cord blood from unrelated donors: analysis of engraftment and acute graft-versus-host disease. *Blood* 1996; 88: pp. 795–802.
- Whetton AD, Graham GJ. Homing and mobilization in the stem cell niche. *Trends in Cell Biology* 1999; 9: pp. 233–238.
- Williams SF, Zimmerman T, Grad G, Mick R. Source of stem cell rescue: bone marrow versus peripheral blood progenitors. *J Hematother* 1993; 2: pp. 521–523.
- Wognum AW, Eaves AC, Thomas TE. Identification and isolation of hematopoietic stem cells. *Archives of Medical Research* 2003; 34: pp. 461–475.
- Zittoun R, Samama MM, Marie JP. *Manuel d'hématologie*. Paris: Doin Editeurs; 1998.

Ressources internet :

Hématopoïèse. Disponible sur : <http://fmc.med.univ-tours.fr/Pages/Hemato/Hematopoiese/hematopoiese.html> (Page consultée le 4 Mai 2013)

Le don, le prélèvement et la greffe de moelle osseuse - Agence de la biomédecine. Disponible sur : <http://www.agence-biomedecine.fr/Don-prelevement-et-greffe-de,51> (Page consultée le 30 Novembre 2013)

Le don de moelle osseuse: tout savoir sur le don. Disponible sur : <http://www.france-adot.org/le-don-de-moelle-osseuse.html> (Page consultée le 30 Novembre 2013)

Les enjeux de la conservation du sang de cordon en France » Introduction. Disponible sur : <http://controverses.sciences-po.fr/archive/sangdecordon/wordpress/index-17307.html> (Page consultée le 6 Novembre 2013)

Agence de la biomédecine - rapports médicaux et scientifiques. Disponible sur : <http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2011/accueil.htm> (Page consultée le 17 Novembre 2013)

Annexes

Annexe 1 : Information sur le don placentaire et consentement



Le don de sang de cordon (ou sang placentaire)



Qu'est ce que le sang de cordon ou sang placentaire ?

Le sang de cordon est le sang qui reste dans le placenta et le cordon ombilical après la naissance de votre enfant. Pendant votre grossesse ce sang est vital pour votre bébé mais après la naissance de votre bébé, ce sang n'a plus d'utilité pour vous et votre enfant et il est habituellement détruit.

Un don qui peut sauver une vie

La greffe de moelle osseuse permet aujourd'hui de sauver la vie à des personnes atteintes de maladies graves du sang ou de cancer. Dans de nombreux cas, le sang de cordon représente une alternative à l'utilisation de cellules issues de la moelle osseuse. Pour offrir la possibilité d'une greffe au nombre croissant de ces patients, il est important de constituer des banques de sang de cordon.

Ce sang de cordon peut permettre de traiter ces patients car il contient des cellules semblables à celles contenues dans la moelle osseuse et capables de reconstituer le système sanguin et le système immunitaire du patient compatible.

Une fois prélevé, le sang de cordon peut être congelé, stocké et mis à la disposition, via un réseau international, des malades nécessitant une greffe. Nous vous offrons la possibilité de faire don de ce sang de cordon, dans le cadre du Réseau Français de Sang Placentaire, car il peut donner une chance réelle de traitement à des patients qui ont besoin d'une greffe.

Le prélèvement ne présente aucun risque ni pour l'enfant, ni pour vous-même

Le prélèvement de sang de cordon a lieu dans les minutes qui suivent l'accouchement lorsque le cordon ombilical vient d'être coupé et que le placenta est encore dans l'utérus. Le prélèvement est totalement indolore et ne présente pas de risque ni pour votre bébé ni pour vous puisqu'il ne modifie pas les gestes médicaux de l'accouchement. Il n'a pas lieu si les sages-femmes doivent porter leur attention sur des gestes médicaux prioritaires après l'accouchement.

Ce don est libre, volontaire, anonyme et gratuit.

Ce don ne sera possible qu'avec votre consentement signé et un entretien avec un médecin ou une sage-femme qui vous posera des questions vous concernant ainsi que vos proches. La franchise de vos réponses sera déterminante pour garantir la sécurité du malade qui va recevoir le sang de cordon prélevé lors de votre accouchement.

Soyez assurée que si vous choisissiez de ne pas participer au don de sang de cordon, cela ne portera en rien préjudice aux soins qui vous seront prodigués à vous et votre bébé.

Le don de sang de cordon est anonyme. Ainsi il ne vous sera pas possible de savoir à qui il a été greffé pas plus que la personne qui aura reçu la greffe ne pourra connaître votre identité.

Traitement des données vous concernant :

En application des dispositions de la loi n°78-17 du 6 janvier 1978 modifiée relative à l'informatique, aux fichiers et aux libertés, nous vous informons que les résultats des analyses de biologie pratiquées ainsi que certaines informations recueillies à l'occasion de l'entretien prénatal et post-natal vous concernant ainsi que votre famille proche et votre enfant feront l'objet d'un enregistrement informatique par la banque de sang placentaire qui va gérer votre don, dont les coordonnées figurent en dernière page de ce document, afin d'assurer la gestion et la traçabilité des dons de sang de cordon.

Les données relatives aux caractéristiques du greffon comprenant les résultats d'analyses biologiques seront transmises sous forme anonyme :

- en vue de l'inscription du greffon sur le registre national géré par l'Agence de la biomédecine,
- ou en vue de son utilisation à des fins de recherche scientifique dans le cadre légal national ou pour améliorer et valider les procédés et les contrôles qualité.

Toutes les mesures nécessaires sont prises pour assurer la protection, la sécurité et la confidentialité des données personnelles collectées afin d'empêcher la divulgation non autorisée des données traitées.

Vous disposez d'un droit d'accès et, en cas d'inexactitude, de rectification et de suppression de ces données que vous pouvez exercer en vous adressant au responsable de la banque de sang placentaire.

Si, après avoir lu attentivement cette information, vous acceptez de donner votre sang de cordon, nous vous remercions de bien vouloir remettre votre consentement rempli et signé au gynécologue ou à la sage-femme lors de votre prochaine consultation.

Le suivi du don après l'accouchement

Le sang de cordon est transporté à la banque de sang placentaire associée à l'établissement dans lequel vous avez accouché. S'il répond aux caractéristiques fixées par le Réseau Français de Sang Placentaire (volume et nombre de cellules suffisants), des analyses seront effectuées sur des échantillons de sang prélevés sur vous au moment de l'accouchement (HIV, hépatites B et C, syphilis, HTLV, CMV, EBV, toxoplasmose) et sur le sang de cordon (électrophorèse de l'hémoglobine, sérologies : HIV, hépatites B et C, Syphilis, HTLV), soit immédiatement, soit lors de la cession du prélèvement. Si ces analyses ne révèlent aucune anomalie, le sang de cordon sera conservé sous forme congelée dans l'azote ainsi que des échantillons de votre sang et du sang de cordon permettant des analyses ultérieures. Vous serez sollicitée dans les 2 mois qui suivent l'accouchement pour fournir les informations médicales relatives à votre état de santé et celui de votre enfant. Ces informations sont nécessaires pour confirmer que l'unité de sang placentaire est utilisable à des fins de greffe.

Une mention particulière sera alors apposée sur le carnet de santé de votre enfant mentionnant que son sang de cordon a été prélevé en vue de greffe allogénique, c'est à dire pour autrui. Cette information permettra à votre médecin de prévenir l'Agence de la biomédecine en cas de nécessité. Cette information est importante pour le devenir et l'usage de ce don de sang de cordon pour le traitement d'un malade. En cas de besoin pour une greffe familiale allogénique, si le prélèvement n'a pas été cédé, la traçabilité permettra de le retrouver.

Après validation, le greffon (ainsi que ses caractéristiques) sera inscrit sous un numéro sur le registre national centralisant les demandes de greffe. Il sera choisi selon son degré de compatibilité tissulaire avec le receveur et sa richesse cellulaire.

La banque de sang placentaire ou la maternité dans laquelle vous avez accouché est susceptible de vous contacter à tout moment pour un complément d'information ou si une anomalie est détectée lors des analyses effectuées. Vous serez tenue informée par courrier du devenir du don de sang de cordon auquel vous avez consenti.

Cas particulier :

Si une personne de votre famille est atteinte d'une maladie nécessitant une greffe, le médecin responsable de la prise en charge de cette personne pourra demander le recueil et la conservation du sang de cordon qui sera alors réservé pour un usage familial strict.

Si votre don ne peut finalement pas constituer un greffon...

Si votre don ne répond pas aux critères fixés par le Réseau Français de Sang Placentaire, le sang de cordon pourra être détruit selon les procédures validées et en place (dans ce cas, les analyses de dépistage des maladies transmissibles ne seront pas réalisées). Alternativement, il pourra être utilisé à des fins de recherche scientifique dans le cadre légal national ou être utilisé pour améliorer et valider les procédés et les contrôles qualité effectués sur ces produits (dans ce cas, des analyses de dépistage des maladies transmissibles seront réalisées).

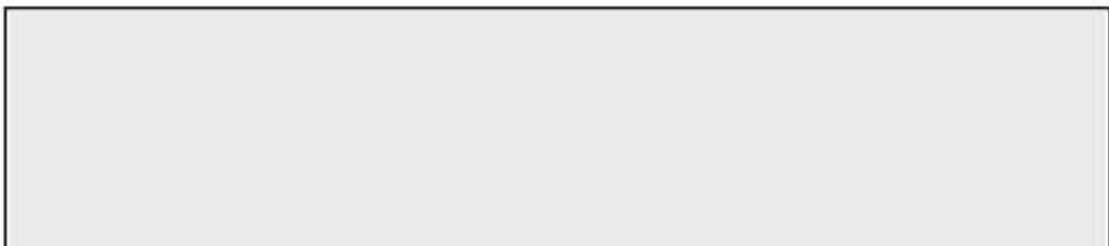
Un don au service d'autrui

La conservation du sang de cordon n'est autorisée en France que pour un usage allogénique (le donneur et le receveur sont des personnes différentes) dans des banques publiques agréées qui constituent le Réseau Français de Sang Placentaire. Ces banques publiques recueillent les greffons de sang de cordon à partir d'un réseau de maternités autorisées par le Ministère de la santé. Ce réseau permet de garantir la qualité des procédures et l'égal accès aux soins pour l'ensemble de la population. La responsabilité et l'objectif de ces banques sont de mettre ces unités de sang de cordon, à disposition de tout patient, quelque soit son pays d'origine, et à tout instant.

La conservation du sang de cordon pour son enfant n'a aucun fondement scientifique Des sociétés privées à but lucratif font miroiter de possibles utilisations du sang de cordon dans le futur pour soigner son enfant. Conserver le sang de cordon de son enfant dans une banque pour le soigner avec ses propres cellules au cas où il serait malade plus tard ne repose actuellement sur aucun fondement scientifique. De plus, certaines de ces sociétés demandent aux parents de transporter ou d'envoyer par colis le sang de cordon prélevé, cette pratique est illégale et punie par la loi.*

A ce jour, aucune banque commerciale n'a été autorisée en France par les autorités de santé.

Nous sommes à votre disposition pour vous fournir les informations supplémentaires que vous jugerez nécessaires.



* Pour plus d'informations : <http://www.agence-biomedecine.fr>

Consentement pour le prélèvement, l'analyse et l'utilisation d'un don de sang de cordon



Partie 1 : prélèvement du sang de cordon

- Je consens volontairement et gratuitement à ce don à l'occasion de cette grossesse et confie ce don au Réseau Français de Sang Placentaire dans le but d'être mis à la disposition des malades pour un bénéfice médical.
- J'ai lu et compris toutes les notions relatives au don de sang de cordon et à son utilisation contenues dans la notice d'information qui m'a été remise ; un médecin ou une sage-femme a répondu à toutes mes questions.
- Mon consentement n'oblige pas la maternité à collecter le sang de cordon si elle juge que les circonstances ne s'y prêtent pas.
- Enfin, je conserve la possibilité de revenir sur ce consentement jusqu'à la naissance de mon enfant, sans avoir à donner de justifications et sans préjudice quel qu'il soit.

Partie 2 : entretien médical et analyses biologiques effectués

- J'accepte de répondre avec sincérité aux questions qui me seront posées dans le cadre d'un entretien médical prénatal et post natal sur mes antécédents médicaux et ceux de mes proches.
- J'accepte qu'une mention spéciale mentionnant le don soit portée sur le carnet de santé de mon enfant, après analyse de son dossier médical.
- J'accepte que les analyses exigibles par la réglementation, ou recommandées, y compris la détermination de mon groupage tissulaire, soient réalisées et que l'on prélève pour cela mon sang, à l'accouchement. En cas d'anomalie, ou à ma demande, je serai informée du résultat de ces analyses. J'accepte que ces mêmes analyses soient réalisées sur le sang de cordon prélevé, ainsi que la détermination du groupage tissulaire, indispensable à l'évaluation de la compatibilité entre le sang de cordon et le patient nécessitant une greffe.
- J'accepte que des échantillons de mon sang et du sang de cordon soient conservés à long terme dans l'éventualité d'analyses complémentaires, selon la réglementation en vigueur à ce jour.
- J'ai bien compris que, ce don étant et devant rester anonyme, il ne me sera pas possible de savoir à qui il a été greffé. Néanmoins, j'accepte le principe d'être éventuellement contactée pour un complément d'information par la banque de sang placentaire associée à l'établissement dans lequel j'ai accouché.

Partie 3 : devenir des prélèvements conformes à un usage thérapeutique

- Je confie sans limite de temps la responsabilité de ce don au Réseau Français du Sang Placentaire pour que ce prélèvement soit stocké dans l'attente d'être mis à disposition et utilisé à des fins thérapeutiques à tout moment, pour tout patient dont l'état de santé nécessiterait une greffe.
- Je comprends que ce prélèvement pourrait ne plus être disponible pour un usage intrafamilial à une date ultérieure, s'il a été cédé au bénéfice d'un patient.

Partie 4 : devenir des prélèvements non conformes pour un usage thérapeutique

Dans l'éventualité où le prélèvement ne répond pas aux critères de conformité, j'accepte qu'il puisse être détruit selon les procédures en vigueur au sein de la banque de sang placentaire ou utilisé en Recherche et Développement dans le respect de l'anonymat et de la confidentialité des données et dans le cadre :

- ✓ d'études de validation de procédés ou de technique de contrôle qualité ou d'études de biocompatibilité.
- ✓ de programmes de recherche médicale approuvés sur le plan éthique en collaboration avec des organismes de recherche reconnus, publics, hospitaliers ou universitaires (décret du 10 août 2007).

Partie 5 : protection des informations personnelles

Je consens à ce que les résultats des examens biologiques pratiqués dans le cadre du don de sang de cordon et certaines des informations me concernant ainsi que ma famille proche et mon enfant, collectées tant à l'occasion de l'entretien prénatal que postnatal fassent l'objet d'un enregistrement informatique par la banque de sang placentaire (BSP).

Les données relatives aux caractéristiques du greffon comprenant des résultats d'analyses biologiques seront transmises sous forme anonyme à l'Agence de la biomédecine en vue de l'inscription du greffon sur le registre national centralisant les demandes de greffe et le cas échéant pourront être transmises en conformité avec les dispositions de la loi Informatique et Libertés en vue de permettre son utilisation à des fins non thérapeutiques.

Conformément aux dispositions de la loi n°78-17 du 6 janvier 1978 modifiée relative à l'informatique, aux fichiers et Libertés, je dispose d'un droit d'accès, et, en cas d'inexactitude, de rectification et de suppression de ces données en m'adressant au responsable de la banque de sang placentaire.

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| Nom marital : | Nom de jeune fille : |
| Prénom : | Date de naissance : ___ / ___ / ____ |
| Date : ___ / ___ / ____ | Signature : |
| Nom et signature de la personne recueillant le consentement et ayant vérifié l'identité de la mère : | |

Annexe 2 : Fiche de qualification clinique néo-natale

LABO4350-FORM-0016 Date d'application : 21/08/2012 Fin de Validité : 20/08/2014 Version 1



Centre Hospitalier Universitaire de Nancy
UTCT – Banque de Sang Placentaire
 Tel 03 83 15 37 79 – Fax 03 83 15 37 56



Fiche de qualification clinique néo-natale (dans les 48 heures suivant la naissance)

RENSEIGNEMENTS

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| NOUVEAU-NE NOM : Prénom : Sexe : F <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> Date et heure de naissance : Terme (SA) : PC : Poids : Taille : | MERE NOM : Prénom : Nom de jeune fille : Date de naissance : |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|

EXAMENS DU NOUVEAU-NE

| | | | | | |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|------------------------------------|----------------------------------|--|
| Coloration | <input type="checkbox"/> Normale | <input type="checkbox"/> Pâleur | <input type="checkbox"/> Ictère | <input type="checkbox"/> Cyanose | |
| Examen pulmonaire | <input type="checkbox"/> Normal | <input type="checkbox"/> Anormal | <i>Si anormal, détailler :</i> | | |
| Examen cardio-vasculaire | <input type="checkbox"/> Normal | <input type="checkbox"/> Anormal | | | |
| Examen neurologique et réflexes | <input type="checkbox"/> Normal | <input type="checkbox"/> Anormal | | | |
| Abdomen | <input type="checkbox"/> Normal | <input type="checkbox"/> Anormal | | | |
| Hépatosplénomégalie | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui | | | |
| | | | | | |
| Infection (hémoculture +) | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Suspicion | <i>Si oui, détailler :</i> | |
| Ictère | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Suspicion | | |
| Malformation | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Suspicion | | |
| Maladie hématologique | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Suspicion | | |
| Atteinte neurologique | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Suspicion | | |
| Déficit immunitaire primitif | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Suspicion | | |
| Maladie métabolique | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Suspicion | | |
| Dysmorphie | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Suspicion | | |
| Autre pathologie | <input type="checkbox"/> Non | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Suspicion | | |

Conclusion

| | | |
|---------------------------------------|---------------------------------------------------|---------------------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Bilan normal | <input type="checkbox"/> Bilan anormal invalidant | <input type="checkbox"/> Bilan anormal à discuter |
| | Cause : | Cause : |

Date de l'examen : Age du nouveau né : heures

Médecin ayant réalisé l'examen médical

NOM :

Signature

CONTROLES EFFECTUES CHEZ LA MERE

| | | |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| Mère CMV (-) | <input type="checkbox"/> Non réalisé | <input type="checkbox"/> Si examen réalisé, résultat |
| Contrôle effectué à l'accouchement | <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui | |
| Contrôle effectué en suites de couches | <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Négatif <input type="checkbox"/> Positif |
| | | |
| Mère toxo (-) | <input type="checkbox"/> Non réalisé | |
| Contrôle effectué à l'accouchement | <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui | |
| Contrôle effectué en suites de couches | <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Négatif <input type="checkbox"/> Positif |
| | | |
| Antécédent d'herpès récurrent | <input type="checkbox"/> Non réalisé | |
| Contrôle effectué à l'accouchement | <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui | |
| Contrôle effectué en suites de couches | <input type="checkbox"/> Non <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Négatif <input type="checkbox"/> Positif |

Feuille à faire remplir par le pédiatre de la Maternité ayant fait l'examen de l'enfant dans les 48h post-naissance et à renvoyer au secrétariat de l'UTCT/Banque de sang placentaire

Annexe 3 : Fiche de qualification clinique post-natale

LABO4350-FORM-0017

Date d'application : 21/08/2012

Fin de Validité : 20/08/2014

Version 1



Centre Hospitalier Universitaire de Nancy
UTCT – Banque de Sang Placentaire
Tel 03 83 15 37 79 – Fax 03 83 15 37 56



Fiche de qualification clinique post-natale (Visite à partir de la 6^{ème} semaine de l'enfant)

RENSEIGNEMENTS

Identification de l'enfant

NOM :

Prénom :

Sexe : F M

Date de naissance :

Identification de la mère

NOM :

Prénom :

Nom de jeune fille :

Date de naissance :

EVENEMENT INTERESSANT LA SANTE DE L'ENFANT SURVENU DEPUIS LA NAISSANCE

| | | | |
|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------|
| Maladie fébrile ou éruption | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non | <i>Si oui, détailler:</i> |
| Hospitalisation | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non | |
| Transfusion | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non | |
| Médicaments | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non | |
| Herpès | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non | |

EXAMEN DE L'ENFANT

| | | |
|-------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Croissance staturo-pondérale normale | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non |
| Coloration normale | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non |
| Examen pulmonaire normal | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non |
| Examen cardio-vasculaire normal | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non |
| Examens neurologiques et réflexes normaux | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non |
| Examen abdominal normal | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non |
| Aires ganglionnaires normales | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non |
| Absence d'anomalies morphologiques | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non |
| Développement psychomoteur normal | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non |
| Vaccinations effectuées | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non |

PATHOLOGIE DETECTEE

| | | |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Infection | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non |
| Malformation | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non |
| Maladie hématologique | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non |
| Tumeur | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non |
| Atteinte neurologique | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non |
| Déficit immunitaire primitif | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non |
| Maladie métabolique | <input type="checkbox"/> Oui | <input type="checkbox"/> Non |

Date de l'examen :

Pédiatre ou médecin ayant réalisé l'examen médical

NOM :

Signature/tampon

PATHOLOGIE OU TOUT EVENEMENT INTERESSANT LA SANTE DE LA MERE SURVENUS DEPUIS ACCOUCHEMENT (à compléter par la mère)

Feuille à faire remplir par un pédiatre/médecin à renvoyer au secrétariat de l'UTCT/Banque de sang placentaire à l'aide de l'enveloppe fournie

Annexe 4 : Entretien médical

DON DE SANG PLACENTAIRE ENTRETIEN MEDICAL

Les zones grisées du questionnaire seront complétées par la mère.

Les zones non-grisées du questionnaire seront complétées par la mère accompagnée d'un professionnel de santé.

IDENTIFICATION DE LA MERE (DONNEUSE)

Nom : Prénom :

Nom de jeune fille :

N° code barres USP (réservé BSP)

Date de Naissance :

Adresse :

Téléphone domicile :

Téléphone Portable :

E-mail :

ANTECEDENTS MEDICAUX MATERNELS

Avez-vous ou avez-vous eu au cours de votre vie :

- | | | | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------|
| Maladie auto-immune – déficit immunitaire | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Allergie sévère | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Cancer | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Maladies du sang (même mineures) | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Troubles de la coagulation | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Pathologies endocriniennes traitées (Diabète – hyper / hypothyroïdie ...) | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Pathologie cardiaque | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Hypertension artérielle traitée | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Pathologies rénales ou urinaires | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Pathologies pulmonaires | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Pathologies neurologiques (Maladies neuro-dégénératives – Maladie de Creutzfeldt Jacob) | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Epilepsie | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Traitement antidépresseur / neuroleptique | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Pathologies gastro-intestinales | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Pathologies hépatiques | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Pathologies dermatologiques | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Pathologies ophtalmologiques | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Pathologies O.R.L. | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Pathologies gynécologiques | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |
| Maladies professionnelles | <input type="checkbox"/> non | <input type="checkbox"/> oui | |

Antécédents ou comportements à risques de la patiente vis à vis des virus HIV, Hep B et C

Dans les 8 derniers mois :

Avez-vous eu un tatouage, un piercing de l'oreille, de la peau ou du corps fait à partir d'instruments ou aiguilles à usage multiple ? non oui
 Votre partenaire ? non oui

Avez-vous été en contact avec du sang humain par piqûre, plaie, projection ? non oui
 Votre partenaire ? non oui

Avez-vous eu des relations sexuelles avec quelqu'un malade du Sida ou séropositif ? non oui
 Avez-vous eu des relations sexuelles avec un homme qui a eu des relations sexuelles avec un autre homme dans les 5 dernières années ? non oui

Avez-vous changé de partenaire sexuel ? non oui

Avez-vous eu des traitements par infiltrations, auriculothérapie, acupuncture, mésothérapie ? non oui
 Votre partenaire ? non oui

Dans les 12 derniers mois :

Avez-vous été traitée pour une maladie sexuellement transmissible ? non oui
 Votre partenaire ? non oui

Dans votre vie :

Avez-vous déjà utilisé une seringue pour vous injecter de la drogue ou des substances dopantes ? non oui
 Votre partenaire ? non oui

Avez-vous déjà accepté de l'argent ou de la drogue en échange de relations sexuelles ? non oui
 Votre partenaire ? non oui

Avez-vous eu un test positif pour la syphilis, le SIDA, l'hépatite B ou l'hépatite C ? non oui
 Votre partenaire ? non oui

Risques vis à vis des agents transmissibles non conventionnels

Séjour dans les îles Britanniques de plus d'un an cumulé entre 1980 et 1996 non oui

Antécédents personnels ou familiaux de la maladie de Creutzfeldt Jakob non oui

Traitement par hormone de croissance avant 1989 non oui

Traitement par hormones gonadotrophines chorioniques humaines d'origine hypophysaire avant 1985 non oui

Greffes de tissus ou d'organes à partir d'un donneur non oui

Interventions neurochirurgicales non oui

Risques liés aux voyages

Maladies infectieuses ou parasitaires non oui

Avez-vous séjourné ou êtes vous née dans une zone à risque de :

Maladie de Chagas (Amérique du Sud) non oui date / durée / pays :

West Nile Virus non oui date / durée / pays :

Paludisme, HTLV non oui date / durée / pays :

Séjour en dehors d'Europe non oui date / durée / pays :

Donneuse de sang non oui date du dernier don :

ATCD de transfusions sanguines non oui date :

Traitement par médicaments dérivés du sang non oui date :

Maladies génétiques héréditaires dans la famille non oui

ANTECEDENTS FAMILIAUX MATERNELS

Avez-vous été adoptée ? non oui

Si oui, avez-vous des informations médicales sur la famille ? *Si non, c'est une contre indication au don de sang placentaire*

Mère

Père

Collatéraux

Maladie hématologique (leucémie – myélodysplasie) d'un membre de la famille non oui

Si oui : lien de parenté et pathologie :

ANTECEDENTS MEDICAUX PATERNELS

Père non connu non oui

L'absence de renseignement sur le père est une contre-indication au prélèvement de sang placentaire

Date de naissance

Lieu de naissance (Ville – dépt – pays) :

Maladie nécessitant un suivi médical régulier non oui

Maladies infectieuses ou parasitaires non oui

Hépatite virale non oui

Pathologies hématologiques non oui

Trallement chronique non oui

Pathologies urinaires non oui

Maladie génétique héréditaire non oui Si oui, recherche génétique faite chez le père ?

Don du sang non oui

ANTECEDENTS FAMILIAUX PATERNELS

A-t-il été adopté ? non oui

Si oui, a-t-il des informations médicales sur la famille ? *Si non, c'est une contre indication au don de sang placentaire*

Mère

Père

Collatéraux

Maladie hématologique (leucémie – myélodysplasie) d'un membre de la famille non oui

Si oui : lien de parenté et pathologie :

ANTECEDENTS MEDICAUX DE LA FRATRIE

Année de naissance F M

DONNEES DE LA GROSSESSE ACTUELLE

D.D.R / / / D.D.G / / / Terme prévu / / /

1 - Suivi S.F Médecin

Gestation Parté Groupe sanguin RAI P.M.A. F.I.V Insémination artificielle

Y-a-t-il eu au cours de la grossesse une infection ou un syndrome infectieux ?

Si oui, diagnostic : Traitement : Date :

2 - Traitements

Traitement pris au cours de la grossesse :

Traitement pris au long cours

Traitement contre l'H.T.A. gravidique non oui

3 - Echographie

| Terme | Résultat |
|-------|----------|
| | |
| | |
| | |

4 - Autres

| | Non fait | Fait | Résultat | |
|--------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|--------------------------|
| HT 21 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | |
| Amniocentèse | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | Anomalies |
| Caryotype | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> Normal | <input type="checkbox"/> |

5 - Autres événements

.....
.....

CONCLUSION

Entretien médical conforme non conforme

Recueil du consentement écrit signé oui non

Nom et signature du médecin ou de la sage-femme

Date de l'entretien

Remarques

Annexe 5 : Tests statistiques

Annexe 5.1

Nous souhaitons savoir s'il existe un lien entre le délai de réception de l'USP à la BSP et le nombre de CNT au moment de la réception à la BSP.

Pour ce test de liaison, le nombre de prélèvements réceptionnés, pour lesquels le nombre de CNT a été calculé à la réception à la BSP, est $n=178$.

Les hypothèses du test de corrélation linéaire sont :

- ~ $H_0 : \rho = 0$; il n'y a pas de lien entre les deux variables.
- ~ $H_1 : \rho \neq 0$; il existe un lien entre les deux variables.

Nous calculons le coefficient de corrélation, $r = 0,032$. Nous effectuons un test du t de Student. Nous obtenons, $t_0 = 0,420$ et $t_\alpha = 1,96$. Nous avons donc : $t_0 < t_\alpha$. On accepte H_0 au risque 5%, on ne montre pas de lien entre le nombre de CNT et le délai de réception des prélèvements à la BSP.

Annexe 5.2

Nous réalisons un test de signification afin de comparer le pourcentage de prélèvements éliminés pour volume trop faible à Nancy ($P_0 = 41,4\%$) au pourcentage national de prélèvements éliminés pour volume trop faible ($P_{th} = 37,5\%$).

Les hypothèses du test de signification sont :

- ~ $H_0 : P_0 = 37,5\%$.
- ~ $H_1 : P_0 > 37,5\%$.

Nous obtenons : $\varepsilon_0 = 1,690$ et $\varepsilon_\alpha = 1,645$. Nous avons donc : $\varepsilon_0 > \varepsilon_\alpha$. On rejette H_0 au risque 5%, on montre que le taux observé est significativement supérieur au taux national ($p < 0,045$).

Annexe 5.3

Nous réalisons un test de signification afin de comparer le pourcentage de prélèvements éliminés pour nombre de CNT trop faible à la réception à Nancy ($P_0 = 25,2\%$) au pourcentage national de prélèvements éliminés pour nombre de CNT trop faible ($P_{th} = 35,1\%$).

Les hypothèses du test de signification sont :

- ~ $H_0 : P_0 = 35,1\%$.
- ~ $H_1 : P_0 < 35,1\%$.

Nous obtenons : $\varepsilon_0 = -4,351$ et $\varepsilon_\alpha = 1,645$. Nous avons donc : $|\varepsilon_0| > \varepsilon_\alpha$. On rejette H_0 au risque 5%, on montre que le taux observé est significativement inférieur au taux national ($p < 5 \cdot 10^{-5}$).

Annexe 5.4

Nous réalisons un test de signification afin de comparer le pourcentage de prélèvements éliminés pour nombre de CNT ou nombre de cellules CD34+ non conforme au moment de la congélation à la BSP de Nancy ($P_0 = 3,4\%$) au pourcentage national de prélèvements éliminés pour nombre de CNT ou nombre de cellules CD34+ non conforme au moment de la congélation ($P_{th} = 2,0\%$).

Les hypothèses du test de signification sont :

- ~ $H_0 : P_0 = 2,0\%$.
- ~ $H_1 : P_0 > 2,0\%$.

Nous obtenons : $\varepsilon_0 = 2,10$ et $\varepsilon_\alpha = 1,645$. Nous avons donc : $\varepsilon_0 > \varepsilon_\alpha$. On rejette H_0 au risque 5%, on montre que le taux observé est significativement supérieur au taux national ($p < 0,02$).

Annexe 5.5

Nous réalisons un test de signification afin de comparer le pourcentage de prélèvements éliminés pour contamination microbienne à la BSP de Nancy ($P_0 = 5,0\%$) au pourcentage national de prélèvements éliminés pour contamination microbienne ($P_{th} = 1,7\%$).

Les hypothèses du test de signification sont :

$$\sim H_0 : P_0 = 1,7\%.$$

$$\sim H_1 : P_0 > 1,7\%.$$

Nous obtenons : $\varepsilon_0 = 5,35$ et $\varepsilon_\alpha = 1,645$. Nous avons donc : $\varepsilon_0 > \varepsilon_\alpha$. On rejette H_0 au risque 5%, on montre que le taux observé est significativement supérieur au taux national ($p < 5 \cdot 10^{-8}$).

Annexe 5.6

Nous réalisons un test de signification afin de comparer le pourcentage de prélèvements éliminés pour d'autres causes que celles précédemment citées ($P_0 = 5,5\%$) à la BSP de Nancy au pourcentage national de prélèvements éliminés pour d'autres causes ($P_{th} = 2,6\%$).

Les hypothèses du test de signification sont :

$$\sim H_0 : P_0 = 2,6\%.$$

$$\sim H_1 : P_0 > 2,6\%.$$

Nous obtenons : $\varepsilon_0 = 3,825$ et $\varepsilon_\alpha = 1,645$. Nous avons donc : $\varepsilon_0 > \varepsilon_\alpha$. On rejette H_0 au risque 5%, on montre que le taux observé est significativement supérieur au taux national ($p < 5 \cdot 10^{-4}$).

Annexe 5.7

Nous souhaitons voir s'il existe un lien entre le volume de sang prélevé dans la poche et le nombre de CNT à la réception contenu dans cette poche. Les poches éliminées pour volume trop faible à la réception et quelques-unes éliminées pour d'autres causes ne sont pas prises en compte ici, puisqu'elles ont été éliminées avant que le nombre de CNT ne soit comptabilisé. Ce graphique comprend donc 250 USP.

Les hypothèses du test de corrélation linéaire sont :

- ~ $H_0 : \rho = 0$; il n'y a pas de lien entre les deux variables.
- ~ $H_1 : \rho \neq 0$; il existe un lien entre les deux variables.

Nous obtenons : $r = 0,546$, $t_0 = 10,25$ et $t_\alpha = 1,96$. Nous avons donc : $t_0 > t_\alpha$. On rejette H_0 au risque 5%, on montre un lien entre le volume et de nombre de CNT à la réception des prélèvements à la BSP.

Annexe 5.8

Nous souhaitons savoir s'il existe un lien entre le nombre de CNT au moment de la réception de l'USP et le nombre de cellules CD34+ au moment de la congélation. Pour cela, nous prenons en compte 134 USP pour lesquelles le nombre de cellules CD34+ à la congélation a été calculé.

Les hypothèses du test de corrélation linéaire sont :

- ~ $H_0 : \rho = 0$; il n'y a pas de lien entre les deux variables.
- ~ $H_1 : \rho \neq 0$; il existe un lien entre les deux variables.

Nous obtenons : $r = 0,695$, $t_0 = 11,11$ et $t_\alpha = 1,96$. Nous avons donc : $t_0 > t_\alpha$. On rejette H_0 au risque 5%, on montre un lien entre le nombre de cellules CD34+ à la congélation et de nombre de CNT à la réception des prélèvements à la BSP.

Annexe 6 : Les principales causes de destruction dans 10

BSP françaises

| BSP n° | Nombre d'USP prélevées et réceptionnées | Prélèvements dont le volume < 70 ml (%) | Prélèvements avec un taux de CNT non- conforme à réception ($< 1,4 \cdot 10^6$) (%) | Non conformité après miniaturisation, en CNT ($< 1,0 \cdot 10^8$) ou CD34 ($< 1,8 \cdot 10^6$) (%) | Non conformité pour contrôles microbiologiques positifs (%) | Non conformité autres (%) |
|--------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|
| 1 | 4364 | 30,3 | 38,0 | 3,2 | 1,1 | 3,8 |
| 2 | 4601 | 45,0 | 23,8 | 3,6 | 1,5 | 3,3 |
| 4 | 2282 | 24,0 | 44,6 | 2,5 | 0,6 | 0,1 |
| 5 | 3808 | 18,6 | 54,1 | 0,6 | 2,3 | 1,3 |
| 5 | 2916 | 39,5 | 39,2 | 1,5 | 1,1 | 1,0 |
| 6 | 440 | 41,4 | 25,0 | 3,2 | 5,0 | 5,5 |
| 7 | 2149 | 39,6 | 33,8 | 0,6 | 1,9 | 3,0 |
| 8 | 258 | 49,2 | 28,3 | 0,8 | 0,8 | 0 |
| 9 | 2760 | 55,4 | 17,0 | 3,7 | 1,0 | 7,0 |
| 10 | 6942 | 31,5 | 47,3 | 0,1 | 1,4 | 1,6 |
| Total | 30520 | 37,5 | 35,1 | 2,0 | 1,7 | 2,6 |

La BSP n°6 représente la BSP de Nancy.

Annexe 7 : Le coût d'une USP à la BSP de Nancy

Le prélèvement, les analyses et la conservation des USP sont assez onéreux. Certaines étapes sont réalisées à la fin du processus de validation de l'USP afin d'éviter des dépenses inutiles. De même certains contrôles dont le coût est faible sont réalisés assez tôt dans le processus de validation afin d'éliminer des USP pour lesquelles des opérations coûteuses ne seront alors pas effectuées.

Le coût d'une USP comprend :

- ~ Le prélèvement à la maternité : coût de la poche de prélèvement avec l'anticoagulant (25 €) et frais de prélèvement (83 €) ;
- ~ Les analyses au moment de la réception à la BSP : pesée de la poche et numération du nombre de CNT (8,37 €) ;
- ~ La technique de l'USP : le kit Sepax (170 €), le DMSO (7 €), l'HES (74 €) ;
- ~ Les contrôles qualité : sérologie de la mère (157,68 €), diagnostic génomique viral de la mère (172,8 €), électrophorèse de l'hémoglobine de l'USP (32,4 €), groupage sanguin (20,25 €), bactériologie (67,5 €), numération CNT (8,37 €) et cellules CD34+ (27 €) ;
- ~ Le typage HLA de la mère et du sang de cordon qui est effectué après la validation des contrôles qualité (702 €).

La congélation de l'USP est réalisée après la technique de l'USP et avant les contrôles qualité. Ainsi, un certain nombre d'USP sont congelées mais non validées pour une inscription sur le registre. La validation s'effectue plus tard, lorsque tous les contrôles qualité sont conformes. Le fait de mettre l'USP en production avant d'avoir validé les contrôles qualité permet d'éviter que le délai entre le prélèvement et la congélation dépasse les 24 heures.

D'autres contrôles qualité ne sont réalisés qu'au moment de la cession de l'USP. Le coût total d'une cession est de 1074 euros :

- ~ La viabilité cellulaire (27 €) ;
- ~ La numération des CFU-GM (203 €) ;
- ~ Le contrôle HLA en haute résolution (567 €) ;
- ~ La sérologie de l'USP (105 €) ;
- ~ Le diagnostic génomique viral de l'USP (173 €).

Le coût d'une USP menée à son terme c'est-à-dire prélevée, mise en production, contrôlée, congelée, inscrite sur le registre et cédée est de 2669 euros.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : Le 29 septembre 2014

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR
EN PHARMACIE**

présenté par : Clotilde MOLTER

Sujet : PRELEVEMENT DE SANG PLACENTAIRE POUR
LA BANQUE DE SANG PLACENTAIRE ALLOGENIQUE
DU CHU DE NANCY : ANALYSE DES CAUSES DE NON
INSCRIPTION DES UNITES DE SANG PLACENTAIRE
SUR LE REGISTRE NATIONAL.

Jury :

Présidente et Directrice :

Mme BENSOUSSAN, Professeur

Juges : Mme BULTEL, Praticien hospitalier

Mme KENNEL, Praticien hospitalier

M. PERRIN, Maître de conférence

M. JEANDAT, Pharmacien

Vu,

Nancy, le 26/08/2014



La Présidente du Jury et Directrice de Thèse

UNITE DE THERAPIE CELLULAIRE
BANQUE de TISSUS et SANG PLACENTAIRE
Professeur Dr. BENSOUSSAN
Praticien Hospitalier M. JEAN-LOUIS BRABOIS
Praticien Hospitalier M. PIERRE VANDOEUVRE
Tél. : 03 83 58 37 79
Tél. : 03 83 58 45 57

Vu et approuvé,

Nancy, le 28.08.2014

Doyen de la Faculté de Pharmacie
de l'Université de Lorraine,



Vu,

Nancy, le - 9 SEP. 2014

Le Président de l'Université de Lorraine,



N° d'enregistrement : 6620.

N° d'identification :

TITRE

Prélèvement de sang placentaire pour la banque de sang placentaire allogénique du CHU de Nancy : Analyse des causes de non inscription des unités de sang placentaire sur le registre national

Thèse soutenue le 29 septembre 2014

Par Clotilde MOLTER

RESUME :

Située au CHU de Brabois, la Banque de Sang Placentaire (BSP) de Nancy a ouvert ses portes le 19 novembre 2012. Cette BSP est associée à la Polyclinique Majorelle qui s'occupe du recrutement des mères et du prélèvement des Unités de Sang Placentaire (USP).

Le Réseau Français de Sang Placentaire (RFSP), créé en janvier 1999 par l'Agence de la Biomédecine (ABM), a mis en place des critères stricts de sélection des USP mis en banque. Ainsi dès leur réception à la BSP, les USP sont mises en production et éliminées pour qu'il ne reste que les USP conforme à toutes les spécifications du RFSP. Les causes d'élimination sont très diverses : volume sanguin trop faible, nombre de cellules nucléées totales (CNT) trop faible, nombre de cellules CD34+ trop faible, contamination microbienne, problème au moment de la congélation... Nous allons détailler ici toutes ces causes et voir s'il existe des moyens de les limiter afin d'obtenir un meilleur rendement d'USP inscrites sur le registre national France Greffe de Moelle (FGM) par rapport à tous les prélèvements effectués.

Deux facteurs prioritaires sont pris en compte lors de la cession d'une USP en vue d'une greffe de CSH : la compatibilité HLA entre le donneur et le receveur et le nombre de CNT en fonction du poids du receveur. Nous décrivons ici les caractéristiques des USP inscrites sur le registre national par la BSP de Nancy afin de déterminer si ces nouvelles USP inscrites apportent un plus par rapport à toutes les USP déjà inscrites sur le registre.

MOTS CLES : Unité de Sang Placentaire, Banque de Sang Placentaire, Cellules Souches hématopoïétiques, Prélèvement, CHU de Nancy, Polyclinique Majorelle

| Directeur de thèse | Intitulé du laboratoire | Nature |
|----------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------|
| <u>Madame le Docteur Danièle BENSOUSSAN</u> | UTCT : Unité de Thérapie Cellulaire, banque de Tissus et banque de sang placentaire | Travail personnel Thème 5 |

Thèmes

1 – Sciences fondamentales

3 – Médicament

5 - Biologie

2 – Hygiène/Environnement

4 – Alimentation – Nutrition

6 – Pratique professionnelle