

Les cellules souches du sang du cordon ombilical

Jakob R. Passweg*, Yves Chalandon*, Thomas Lehmann**, Vincent Kindler*, André Tichelli**

Introduction

Cela fait déjà plus de 20 ans que la richesse en cellules souches hématopoïétiques du sang foeto-placentaire, correspondant au sang fœtal restant dans le cordon ombilical et le placenta après la naissance du nouveau né (cord blood, CB) a été mise en évidence. Cette découverte a rendu possible d'utiliser cette nouvelle source de cellules souches hématopoïétiques pour effectuer la première greffe de CB chez un enfant atteint d'anémie de Fanconi, patient qui est toujours en vie à ce jour, inaugurant ainsi une nouvelle ère^{1, 2)}.

La greffe de cellules souches hématopoïétiques est un traitement fréquemment utilisé (en 2008: 27 000 patients greffés en Europe dont 11 000 par greffe allogénique et 16 000 par greffe autologue) pour traiter des hémopathies bénignes et malignes et en pédiatrie également des troubles métaboliques et immunitaires. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) proviennent de la moelle osseuse ou du sang périphérique après leur mobilisation par des facteurs de croissance. La découverte de cellules souches dans le sang foeto-placentaire a mis à disposition une troisième source de CSH. La raison de cette richesse s'explique probablement par la préparation du fœtus à la vie après la naissance avec une expansion de ces cellules. Les CSH du sang foeto-placentaire correspondent à des CSH adultes: elles sont multipotentes, se différencieront en toutes les cellules du système lympho-hématopoïétique, mais ne correspondent pas à des cellules souches totipotentes fœtales qui elles peuvent se différencier en tout types de cellules composant le corps humain. Cette distinction est importante vu les discussions récentes dans les médias concernant l'utilisation ou non de cellules souches fœtales en recherche.

* Service d'hématologie, Hôpitaux Universitaires de Genève

** Diagnostische Hämatologie, Universitätsspital Basel

La récolte de CSH du sang foeto-placentaire se pratique à la naissance, après section du cordon ombilical, par ponction des vaisseaux ombilicaux, avant ou après délivrance du placenta, et elle est sans danger pour la mère comme pour le nouveau né. La technique n'est pas difficile à apprendre et des kits sont mis à disposition pour les obstétriciens en cas de besoin. Après récolte du sang foeto-placentaire (approximativement 100–150 ml), les cellules sont transportées au laboratoire dans une poche contenant de l'anticoagulant.

Au laboratoire le contenu est mesuré en cellules nucléées et en cellules souches (CD34+) et analysé pour exclure un risque infectieux³⁾. Avant la récolte, la mère a été testée pour différents marqueurs infectieux et a été déclarée apte au don sur la base d'un questionnaire d'aptitude (questionnaire utilisé dans tous les centres de transfusion sanguine modifié sur certains points spécifiques). Les cellules sont typisées HLA (human leukocyte antigens) pour définir le phénotype de compatibilité tissulaire et, après réduction de volume et de globules rouges, elles sont cryoconservées dans de l'azote liquide. La poche contenant les cellules est anonymisée avant la mise en banque. Les banques publiques mettent, une fois les résultats de ce bilan réunis, les cellules du sang ombilical à disposition pour une greffe. Les données concernant ces cellules cryoconservées sont gérées par des registres nationaux, en Suisse par la SBSC (Swiss blood stem cells, www.bloodstemcells.ch) qui travaille en réseau avec les autres pays par le biais de la WMDA (world marrow donor association, www.worldmarrow.org).

Il y a trois situations particulières à discuter: le don du sang ombilical anonyme pour une banque publique, le don dirigé, prévu pour un membre de la famille atteint d'une maladie pouvant nécessiter une greffe de CSH et le don privé pour une utilisation autologue (donc pour soi-même).

Définitions

Greffe allogénique: greffe de CSH d'une personne à une autre. Greffe autologue: greffe de CSH d'une personne pour elle-même. Greffe syngénique: greffe de CSH d'un donneur jumeau univitellin.

Donneur apparenté: donneur provenant de la même famille que le receveur; les chances d'avoir un donneur compatible HLA parmi la fratrie est de 25%, les donneurs compatibles familiaux fournissent les meilleurs résultats. Néanmoins vu la taille des familles, souvent restreinte à 1–2 enfants en Europe occidentale, la probabilité d'identifier des donneurs parmi la fratrie est faible.

Donneur non-apparenté: donneur ne provenant pas de la même famille que le receveur. Des registres de donneurs non-apparentés ont été créés dans les années 90 pour fournir une nouvelle source de CSH aux patients qui n'ont pas de fratrie compatible. En utilisant les méthodes modernes de la typisation HLA à haute résolution, les résultats des greffes avec des donneurs non-apparentés s'approchent de ceux effectués avec des donneurs de la fratrie ou apparentés. En général, vu la distribution des antigènes HLA, on peut espérer trouver un donneur compatible pour 50–60% des patients. Ces probabilités varient selon l'ethnie du patient.

Sources de CSH

Moëlle osseuse: récolte après anesthésie générale du donneur, par multiples ponctions de l'os iliaque.

Sang périphérique: mobilisation de CSH provenant de la moelle vers le sang par injection sous-cutanée préalable de facteurs

	Moëlle	Cellules souches périphériques	Cordon ombilical
Récolte	Anesthésie générale	Par aphérèse	Récolte facile
Cellules nucléées (pour patient moyen)	3 x 10 ⁸ /kg	9 x 10 ⁸ /kg	0.3 x 10 ⁸ /kg
CD34+ (cellules souches)	2.8 x 10 ⁶ /kg	7 x 10 ⁶ /kg	0.2 x 10 ⁶ /kg
Lymphocytes T	2.2 x 10 ⁷ /kg	27 x 10 ⁷ /kg	0.4 x 10 ⁷ /kg

Tableaux 1: Caractéristiques des greffons en comparant les différentes sources de cellules souches

de croissance hématopoïétiques. Récolte de ces CSH après 4–5 jours d’infusion, par aphérèse (circulation extracorporelle).

Sang foeto-placentaire: récolte du sang foeto-placentaire à la naissance du bébé après avoir coupé le cordon ombilical.

Indications à la greffe

La liste des indications à la greffe allogénique ou autologue est longue et inclut différents types d’hémopathies malignes comme des leucémies et des néoplasies lymphoïdes, des maladies non-malignes comme l’aplasie médullaire, une panoplie de maladies congénitales, un déficit cellulaire (immunodéficience congénitale, hémoglobinopathies) ou encore un déficit métabolique qui sera corrigé par l’apport de CSH saines ne possédant pas le déficit en question. La Société européenne de greffe de moelle (EBMT) publie régulièrement des listes avec les indications reconnues⁴⁾.

Avantages et inconvénients des CSH du cordon ombilical

Les avantages sont que les cellules sont déjà congelées et donc disponibles plus rapidement que les CSH d’un donneur adulte. Vu leur immaturité, les CSH du CB induisent moins de rejet dirigé vers le patient (maladie de greffe contre l’hôte) et par conséquence des incompatibilités HLA sont plus facilement tolérées. De plus, elles ont une capacité de prolifération augmentée comparée aux CSH d’un donneur adulte. On peut trouver des donneurs de CB «compatibles» pour des patients qui n’ont pas de donneur adulte compatible par typisation HLA à haute résolution. Parmi les désavantages, il faut mentionner le risque élevé de rejet des CSH du CB à cause de la dose de CSH moindre comparée à celle obtenue à partir d’un donneur adulte. La reconstitution immunitaire est lente ce qui est associé à un risque infectieux accru comparé aux CSH provenant de donneurs adultes (tableaux 1 et 2). En cas de rechute ou de rejet, on ne peut pas réutiliser le même donneur.

Don anonyme pour une banque publique

Il existe actuellement en Suisse deux banques de CSH du cordon ombilical, à Bâle et à Genève. En revanche il y a en Suisse pour le moment cinq centres (maternités)

qui collectent des CSH du cordon ombilical: Berne, Tessin, Liestal, Bâle et Genève). Les parturientes sont recrutées par les maternités respectives. Le processus de recrutement est strictement contrôlé, les banques sont sous supervision de l’OFSP (Office fédéral de la santé publique). Les CSH sont congelées suite à un algorithme strict avec un contrôle de qualité strict. De manière générale, sur quatre parturientes aptes au don recrutées, deux sont retenues et finalement une seule poche est mise en banque. Les poches sont anonymisées et congelées dans de l’azote liquide et peuvent y demeurer durant de nombreuses années sans perdre leur fonctionnalité (la durée maximale de stockage n’est par connue). Les causes d’exclusion sont multiples: critères d’exclusion de la donneuse mentionnés plus haut, surcharge du laboratoire en passant par un nombre insuffisant de cellules. Dans le monde entier plus de 450 000 unités, réparties dans plus de 100 banques sont à disposition des médecins greffeurs (www.bmdw.org). Ces banques travaillent en réseau et fournissent les centres de transplantation du monde entier, constituant ainsi une source additionnelle de cellules souches.

Pour comparaison les réseaux des donneurs adultes de cellules souches enregistrés dénombrent, dans le monde entier, 14 000 000 de donneurs.

Le sang foeto-placentaire présente un autre avantage par rapport aux donneurs de CSH non apparenté adultes. En effet, dans ces derniers les ethnies caucasiennes sont surreprésentées et il est parfois difficile d’identifier un donneur compatible pour les minorités ethniques en raison de la diversité des antigènes HLA associée à l’ethnicité. Par contre les maternités des grandes villes desservent plus fréquemment une population composée de personnes ayant une origine ethnique atypique, offrant dès lors un plus grand choix de compatibilité pour ces minorités, ce d’autant plus facilement que cette source de CSH nécessite une compatibilité moindre.

Don dirigé pour un membre de la famille

En pédiatrie, il n’est pas rare que la mère d’un enfant atteint d’une hémopathie maligne soit enceinte d’un deuxième bébé. Dans ce cas les CSH du CB du nouveau-né en devenir seront mises en banque mais,

Cellules souches du donneur adulte non apparenté	Cordon ombilical
Don sous anesthésie générale ou après injection de facteurs de croissance	Aucun risque ni pour la maman ni pour le nouveau né
Quantité de cellules souches importante, prise de greffe rapide	Quantité de cellules souches faible, prise de greffe lente, aplasie prolongée
Durée de recherche pour identifier un donneur et organiser une greffe: 3-4 mois	Mise à disposition rapide des cellules parce que déjà cryoconservées
Le donneur identifié peut refuser le don ou être inapte au don pour des raisons médicales	Les cellules cryoconservées ne demandent pas de processus pour déterminer l’aptitude au don
Le donneur peut donner une deuxième fois des cellules souches ou des lymphocytes T pour immunothérapie adoptive	Pas de deuxième don possible
Après récolte des CSH, organisation méticuleuse de transport et de transplantation	Les CSH peuvent rester cryoconservées > 10 ans
Besoin de compatibilité de 9/10 voir 10/10 allèles HLA-A, B, C, DR, DQ	Une compatibilité HLA élevée est moins importante
Haplotypes HLA rares peu fréquents	Haplotypes HLA rares fréquents parce que ciblage facile de minorités ethniques

Tableaux 2: Avantages et désavantages de cellules souches provenant du cordon ombilical et de donneurs adultes non apparentés

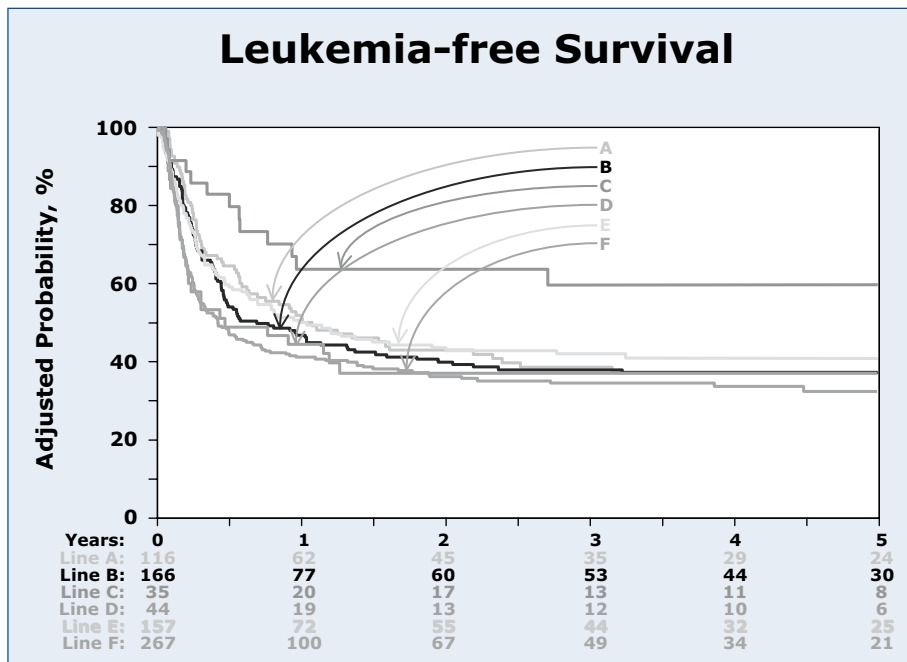


Figure 1: Survie sans leucémie à 5 ans, d'enfants atteints de leucémie aiguë, greffés avec des CSH du sang de cordons ombilicaux ou avec de la moelle osseuse, ajusté pour le stade de la maladie, par compatibilité HLA et par nombre de cellules dans le greffon. (Avec permission du Lancet¹¹), A: moelle, HLA compatible; B: moelle, HLA incompatible; C: CB, HLA compatible; D: CB, HLA incompatible sur 1 antigène, dose faible ($\leq 0.3 \times 10^8$ /kg cellules nucléées); E: CB, HLA incompatible sur 1 antigène, dose élevée ($>0.3 \times 10^8$ /kg cellules nucléées); F: CB, HLA incompatible sur 2 antigènes.

cette fois-ci pas de façon anonyme mais attribuées à l'enfant malade. Cette activité est distincte de la banque publique. Même si l'enfant malade est en rémission de sa maladie les cellules restent congelées afin d'être disponibles en cas de rechute⁵.

Il existe une situation particulière lorsque les parents désirent concevoir un enfant qui serait compatible avec leur enfant souffrant d'une hémopathie nécessitant une greffe de CSH pour pouvoir le guérir. Ceci est rarement possible dans les cas d'hémopathies malignes en raison de l'urgence du traitement, mais dans le cadre d'une maladie congénitale où la greffe n'est pas urgente ceci peut se discuter. Cette pratique de FIV (fécondation in vitro) et de sélection d'embryon qui soit HLA-compatible et ne présentant pas la maladie en question n'est pas légale en Suisse mais peut s'effectuer dans certains pays étrangers.

Don et mise en banque autologue

Le don de cellules souches autologues du cordon ombilical pour utilisation de ces CSH à des fins propres n'est pas remboursé par les assurances et de nombreuses

banques privées mettent à disposition ce service contre rémunération. La communauté médicale, les sociétés de greffe de moelle ainsi que les obstétriciens et les pédiatres se sont prononcés à plusieurs reprises contre cette activité pour les raisons suivantes: L'incidence des maladies qui nécessitent une greffe est très faible chez les enfants. La majorité des greffes pédiatriques sont des greffes allogéniques où la «réserve» de cellules autologues n'est pas utile. Quand une greffe autologue est indiquée en pédiatrie, les CSH sont mobilisées au moment voulu par les techniques appropriées et le nombre de patients en échec de mobilisation est faible. La promesse engendrée par la publicité des banques privées est que ces cellules seraient utiles ultérieurement pour toutes sortes de traitements dits de médecine régénérative. On évoque entre autre le diabète, l'insuffisance cardiaque, l'insuffisance hépatique; mais ceci est encore très spéculatif et, même si la recherche en médecine régénérative avance à grand pas, il n'y a encore aucune utilisation clinique disponible à ce jour. Finalement la mise en banque autologue est perçue comme un acte qui va à l'encontre du principe de

solidarité d'une banque publique mise à disposition de toute personne qui en nécessiterait.

Malgré ces faits, les banques privées fleurissent un peu partout dans le monde. Le nombre d'unités de CB congelés par les banques privées dépasserait le million représentant le double du nombre d'unités congelées dans les banques publiques^{6,7}. Par contre le nombre de greffes effectuées avec des cellules souches autologues provenant du cordon ombilical conservées par des banques privées est très faible et en partie les indications doivent être considérées comme douteuses. Les banques autologues sont illégales en Italie et en Espagne.

Résultats des greffes à partir de cellules souches provenant du cordon ombilical des banques anonymes

Depuis l'introduction des banques de CSH de sang foeto-placentaire, le nombre de greffes en Europe s'est établi aux environs de 700 par an⁸. Durant la dernière décennie, 20% des greffes de CSH effectuées chez les enfants ou les adolescents ont utilisé du sang de cette provenance.

Malgré le pourcentage élevé de CSH dans le sang du cordon ombilical, la quantité totale est faible et limite l'utilisation chez les patients adultes^{9,10}. La stratégie utilisée pour diminuer le risque de rejet dans ces conditions provoquée soit par un nombre de CSH trop faible, soit à par un nombre d'incompatibilités HLA trop important, est de combiner 2 unités de CB lors de la greffe. Cette méthode paraît diminuer le risque de rejet mais par contre semble augmenter le risque de maladie du greffon contre l'hôte. On observe un effet de dose de CSH et du nombre d'incompatibilités HLA qui vont à l'encontre l'un de l'autre. D'un côté, un nombre plus important de CSH permet de tolérer plus d'incompatibilités, de l'autre, une bonne compatibilité permet de tolérer un nombre de CSH moins important. De ce fait, la greffe des patients adultes avec des CSH de sang foeto-placentaire est en constante augmentation.

Par ailleurs cette source de CSH engendre toujours une certaine controverse en Europe, qui est d'autant plus évidente si l'on considère que 16% des greffes en France sont effectuées avec des CSH du CB mais que par contre seulement 1% des greffes en Allemagne utilise cette source. La Suisse avec 9% représente comme souvent un «juste» milieu⁸.

De nombreuses études ont comparé les résultats de la greffe utilisant des CSH d'un adulte avec celles d'un cordon ombilical. Ces comparaisons sont difficiles à interpréter parce que le nombre de CSH est toujours supérieur pour les donneurs adultes, et le nombre d'incompatibilités HLA plus élevé pour les CSH du CB. Il est probablement correct d'interpréter les données de la façon suivante: une greffe de CSH à partir d'un CB a un plus grand risque d'être rejetée et de laisser le patient avec une moelle peu fonctionnelle après traitement à haute dose par chimiothérapie ou chimio-radiothérapie. L'effet anti-tumoral, le «graft versus leukemia effect» est probablement équivalent entre le CB et le donneur adulte, le risque du rejet inverse, c'est-à-dire la maladie du greffon contre l'hôte est moindre avec les CSH du CB, ce d'autant plus si le CB choisi est bien compatible. Si on considère les résultats à long terme, donc la probabilité pour des patients atteints de leucémie d'être vivant sans rechute 5 ans après traitement, la grande majorité des études montre soit une équivalence, soit une survie sans leucémie légèrement moindre suite à l'utilisation des CSH du CB comparée aux CSH provenant d'un donneur adulte. Donc les CSH du CB ne donnent pas des résultats supérieurs à ceux obtenus avec d'autres sources de CSH mais peuvent être considérés, à ce jour, comme une alternative tout-à-fait valable, surtout en absence d'un donneur adulte complètement compatible⁽¹¹⁻¹⁵⁾ (figure 1).

Choix d'une unité de sang foeto-placentaire

Lorsque la décision d'une greffe par CSH du CB a été prise, le greffeur doit décider si une ou deux unités seront nécessaires, ce qui dépend en grande partie du poids du receveur. Il contacte la Swiss blood stem cells et le laboratoire de référence national d'histocompatibilité (LNRH) aux HUG (Hôpitaux Universitaires de Genève) pour déterminer les CBs les plus compatibles. Il demande dès lors des tests de typisation HLA à haute résolution et finalement se décide pour le CB avec les meilleures compatibilités ayant en même temps la cellularité la plus élevée^{(16), (17)}.

Recherche

Un grand nombre de projets s'intéresse à une expansion de CSH du cordon ombilical *in vitro*, avant infusion dans le

patient. Il est évident que si une expansion de CSH réussissait, le nombre limité de CSH du cordon ombilical cesserait d'être un problème. Cependant cette recherche est rendue difficile parce qu'il n'est pas aisé de définir la qualité d'une vraie CSH et qu'avec tout essai d'expansion les cellules prolifèrent mais perdent aussi leur qualité «cellule souche». A part l'expansion, il est possible que la co-transplantation d'autres types de cellules puisse accélérer la prise de la greffe, mais ces derniers essais pour le moment n'ont pas abouti en pratique clinique de tous les jours. En ce qui concerne la médecine régénérative, il existe nombre d'essais utilisant des CSH ou d'autres types de cellules comme les cellules mésenchymateuses provenant du cordon ombilical à but régénératif soit au niveau cardiaque, neurologique ou autre. Tous ces traitements doivent être considérés comme hautement expérimentaux et les résultats obtenus en ce moment sont fascinants, principalement au niveau pré-clinique, certes, mais ne nous donnent aucune information sur leur utilité pour le traitement de patients dans la pratique quotidienne de l'avenir.

Perspectives

En Suisse, les banques publiques de CSH de sang foeto-placentaire établies offrent également la possibilité de mettre en banque le sang de cordon ombilical à utilisation dirigée. Par contre la mise en banque privée (autologue) n'est pas soutenue par les auteurs. Les banques publiques ont une croissance très modérée, ceci entre autre suite aux problèmes de financement. Il n'existe pas en Suisse de réglementation pour la prise en charge aussi bien de la banque publique que du don dirigé. La banque publique est soutenue par la fondation Swiss Blood Stem Cells (SBSC) et par des fondations privées. Aux USA le congrès a adopté en 2005 une loi qui établit et finance un réseau national américain. Une loi similaire fait défaut en Suisse. Nous entretenons l'espoir que la recherche nous propulsera dans les années à venir vers un monde où les thérapies cellulaires contribueront à une médecine plus efficace. Pour le moment il faut continuer à investir dans ce type de recherche, mais aussi optimiser les traitements qui ont déjà été démontrés efficaces.

Références

- 1) Wagner JE, Gluckman E. Umbilical cord blood transplantation: the first 20 years. *Semin Hematol.* 2010; 47(1): 3-12.
- 2) Broxmeyer HE, Cooper S, Hass DM, Hathaway et al. Experimental basis of cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2009; 44(10): 627-33.
- 3) Surbek DV, Schonfeld B, Tichelli A, et al. Optimizing cord blood mononuclear cell yield: a randomized comparison of collection before vs after placenta delivery. *Bone Marrow Transplant* 1998; 22: 311-2.
- 4) Ljungman P, Bregni M, Brune M et al.; European Group for Blood and Marrow Transplantation. Allogeneic and autologous transplantation for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe 2009. *Bone Marrow Transplant.* 2010 Feb; 45(2): 219-34.
- 5) Reed W, Smith R, Dekovic F et al. Comprehensive banking of sibling donor cord blood for children with malignant and nonmalignant disease. *Blood* 2003; 101: 351-7.
- 6) WMDA Policy Statement on the Utility of Autologous or Family Cord Blood Unit Storage.
- 7) PP Rosell GV. Ethical Aspects of Umbilical Cord Blood Banking. Opinion of the European Group on Ethics in Science and new Technologies to the European Commission. Nr 19. http://ec.europa.eu/european_group_ethics/docs/avis19_en.pdf:2004.
- 8) Gratwohl A, Baldomero H. European survey on clinical use of cord blood for hematopoietic and non-hematopoietic indications. *Transfus Apher Sci.* 2010; 42(3): 265-75.
- 9) Brunstein CG, Laughlin MJ. Extending cord blood transplant to adults: dealing with problems and results overall. *Semin Hematol.* 2010; 47(1): 86-96.
- 10) Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE et al. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 2005; 105: 1343-7.
- 11) Eapen M, Rubinstein P, Zhang MJ, Stevens C, et al. Outcomes of transplantation of unrelated donor umbilical cord blood and bone marrow in children with acute leukaemia: a comparison study. *Lancet.* 2007; 369(9577): 1947-54.
- 12) Eapen M, Rocha V, Sanz G et al. National Cord Blood Program of the New York Blood Center. Effect of graft source on unrelated donor haemopoietic stem-cell transplantation in adults with acute leukaemia: a retrospective analysis. *Lancet Oncol.* 2010; 11(7): 653-60.
- 13) Rocha V, Cornish J, Sievers EL et al. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001; 97: 2962-71.
- 14) Rocha V, Wagner JE, Jr., Sobocinski KA et al. Graft-versus-host disease in children who have received a cord-blood or bone marrow transplant from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 2000; 342: 1846-54.
- 15) Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P et al. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 2004; 351: 2265-75.
- 16) Gluckman E, Rocha V. Donor selection for unrelated cord blood transplants. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 565-70.
- 17) Scaradavou A; National Cord Blood Program, New York Blood Center. Unrelated umbilical cord blood unit selection. *Semin Hematol.* 2010; 47(1): 13-21.

Correspondance

Pr Jakob R. Passweg
Service d'Hématologie
Hôpitaux Universitaires de Genève
4, Gabrielle-Perret-Gentil, 1211 Genève 14
jakob.passweg@hcuge.ch