

Conservation des cellules souches hématopoïétiques et des tissus d'origine humaine

Mr Jean-Paul Bourgeot Responsable de la préparation

Banque de tissus et de cellules

EFS Rhône-Alpes Site de LYON Hôpital E. HERRIOT
Responsable Dr Valérie Mialou



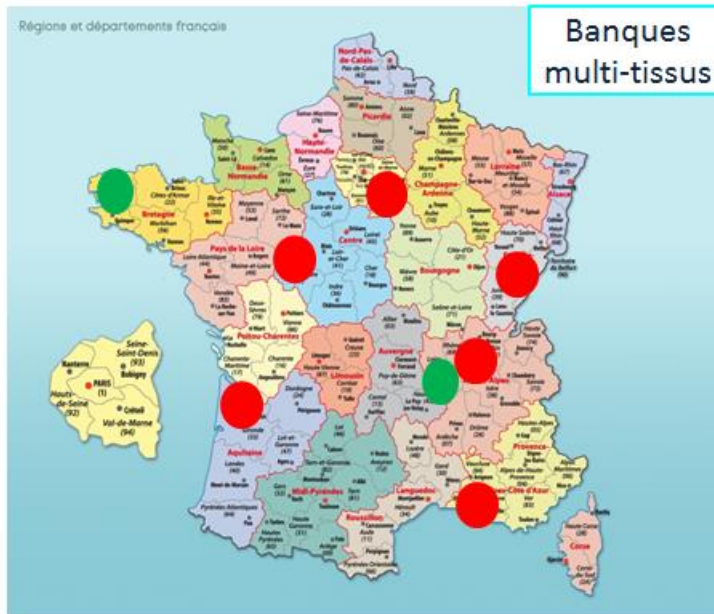
Les banques de cellules



Banques de cellules EFS

- Lille
- Rouen
- St Antoine
- Créteil
- Reims
- Brest
- Rennes
- Angers
- Tours
- Limoges
- Besançon
- Lyon
- Bordeaux
- Toulouse
- Nice

Les banques de tissus de l'EFS



6 Banques multi-tissus EFS (regroupement à partir de 2008) :

- Créteil
- Tours
- Besançon
- Lyon
- Bordeaux
- Marseille

2 banques de cornées EFS

- Brest
- St Etienne

Au cœur du CHU de Lyon

Depuis la création du laboratoire en 1978 par le Dr A. Ehram, nous avons toujours été en contact étroit avec les cliniciens du CHU et des établissements privés affiliés

D'abord installé dans les locaux du centre de lutte contre le cancer pour accompagner les premières autogreffes lyonnaises, nous avons rejoint en 1983, date du début des greffes de cellules souches au CHU, le nouveau plateau technique du CRTS implanté à Gerland et ce jusqu'en 1998.

A cette date, il est apparu certain que les exigences réglementaires, notamment en matière de locaux, allaient évoluer et demander des gros investissements. Un partenariat avec les Hospices civil de Lyon a permis à l'Etablissement de Transfusion de Lyon de s'installer dans les locaux du pavillon I de l'hôpital E. Herriot pour construire un laboratoire de thérapie cellulaire au norme, comprenant 3 Zones à atmosphère contrôlée, 2 laboratoires de contrôle qualité, 1 zone « biothèque » pouvant contenir 30 cuves de stockage très basse température, 10 congélateurs -80° C. L'installation a eu lieu en février 1999.

Le savoir faire des unités de thérapie cellulaire est double.

En premier lieu la maîtrise des techniques de congélations des cellules d'origine humaine, lymphocytes, cellules souches a permis à la fin des années 70 de conserver ces cellules contenues dans la moelle osseuse (MO) et à donner au clinicien hématologue de nouvelles perspectives de traitement

En second lieu, il nous a fallu développer des techniques de manipulation de ces prélèvements pour séparer les leucocytes, contenant les cellules souches, des hématies, cela nous permet de réduire les volumes à congeler et les effets secondaires délétères au moment de la greffe . Ces techniques permettent de s'affranchir de la barrière ABO

Toutes ces techniques se sont inspirées des techniques déjà en œuvre dans les centres de transfusion, centrifugation, extraction de couches leuco-plaquettaire, séparation cellulaire sur macro molécule ...

Notre activité est scindée en deux pôles bien distincts

La thérapie cellulaire et la banque de tissus

Les deux sont autorisées et certifiées

Pour la thérapie cellulaire le processus **R2B Mettre à disposition des cellules**

C'est notre activité première, elle a débuté en 1978

Pour la banque de tissus le processus **R2A Mettre à disposition des tissus**

C'est notre savoir faire en matière de conservation à basse température, de gestion de la collecte et de la qualification des dons qui nous a permis d'initier en 1989 les premières collaborations avec les chirurgiens orthopédiques de la région, puis les vasculaires...

R2B Mettre à disposition des cellules souches

Définition : Gérer et mettre à disposition des cellules humaines conformes aux spécifications et adaptées à la prescription, pour un usage thérapeutique

Les cellules collectées, conservées et mise à disposition des cliniciens sont des cellules souches hématopoïétiques (CSH) ou lymphocytes (DLI).

Les cellules souches peuvent être prélevées dans la moelle osseuse, dans le sang périphérique après stimulation par des facteurs de croissance spécifique, dans le sang placentaire au moment de la naissance. Les lymphocytes sont prélevés dans le sang périphérique

Les greffes de ces cellules permettent de traiter les hémopathies malignes, les aplasies, certaines formes de maladies de l'hémoglobine, les tumeurs solides ...

Elles sont soit autologues, Ce sont les propres cellules du patient qui lui sont injectées.

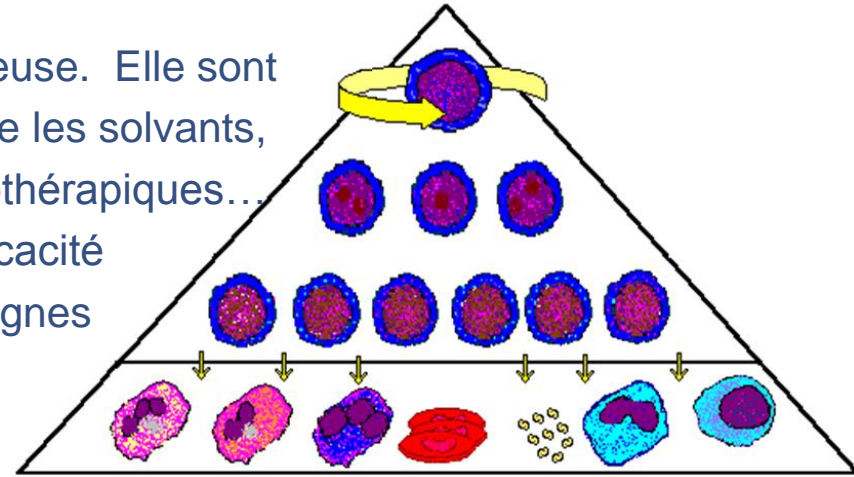
soit allogéniques, c'est les cellules d'un donneur compatible qui sont injectées au patient.

L'hématopoïèse et greffe de cellules souches

L'hématopoïèse est le processus physiologique permettant la création et le renouvellement des cellules du sang. Chaque jour dans l'organisme humain adulte 10^{11} - 10^{12} cellules hématopoïétiques sont produites. Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont à l'origine de toutes les cellules sanguines.

A l'âge adulte, elles sont localisées dans la moelle osseuse. Elles sont excessivement sensibles à différents agents comme les solvants, Les rayonnements ionisants, les traitements chimiothérapeutiques...

C'est cette double sensibilité qui a limité un temps l'efficacité des protocoles de traitement des hémopathies malignes et autres tumeurs



Les greffes de cellules souches

La possibilité de sauvegarder la moelle osseuse du patient a permis d'augmenter les doses des traitements. On a alors parlé d'intensification chimiothérapique et d'autogreffes de CSH. L'autogreffe permet de restaurer l'hématopoïèse après le traitement

Il est des indications où la moelle osseuse est le siège de la maladie et ne peut pas être le support de l'intensification. Il faut donc faire appel à un donneur de cellules souches sain pour remplacer la moelle malade. C'est l'avènement des protocoles d'immunosuppression qui a permis dans le début des années 1980, l'essor des greffes d'organes et des allogreffes de CSH.

Le traitement de conditionnement pour l'allogreffe se compose de l'intensification contre la maladie, de l'immunosuppression contre le rejet et la prophylaxie de la maladie du greffon contre l'hôte.

L'autogreffe

L'autogreffe permet une intensification thérapeutique au delà de la dose létale pour la moelle osseuse. Jusqu'au début des années 90, ces cellules provenait de la moelle osseuse, prélevée au niveau des crêtes iliaques au bloc opératoire sous anesthésie générale.

Depuis, les cellules souches proviennent du sang périphérique du patient, grâce à un traitement dit de mobilisation, elle sont prélevées grâce à des machines d'aphérèses initialement dérivée des machines de prélèvement des plaquettes et leucocytes

Dans les deux cas les CSH sont congelés.

Les étapes du processus d'autogreffe à la BTC : congélation

Réception du prélèvement	Enregistrement informatique Contrôle des sérologies virales du patient
Prélèvement Contrôle qualité	Numération des cellules souches (quantitatif) Culture des progéniteurs hématopoïétiques (qualitatif)
Préparation et congélation	Addition du cryoprotecteur Congélation et Stockage -150° C Contrôle Bactériologie
Validation du dossier	Matière première et déroulement du processus conforme Nb de cellules souches conforme à la prescription et fonctionnelles Bactériologie et Sérologie virale négative
Information au clinicien	Edition certificat de validation

Les étapes du processus d'autogreffe à la BTC greffe

J0 du conditionnement

Réception de la prescription Enregistrement informatique
 Contrôle des poches

J0 de la greffe Confirmation

Préparation et décongélation Dilution lavage

Contrôle qualité Numération des cellules souches,
 comparaison avec la quantité avant congélation
 Contrôle Bactériologie

Validation du dossier Déroulement du processus conforme et quantité de cellules
 souches conforme

Greffe

L'allogreffe

L'allogreffe fait appel à un donneur sain issu de la famille ou sélectionné sur un fichier de donneur volontaire. Le donneur et le receveur sont « compatibles », c'est à dire qu'ils possèdent les mêmes antigènes HLA mais pas forcément le même groupe sanguin

Les cellules souches sont issues de la moelle osseuse, du sang circulant (SP) ou du sang placentaire (USP). En fonction de la source de cellules souches, l'âge des patients, les indications et les conditionnements seront différents. Le prélèvement de cellules souches (MO et SP) a lieu la veille ou le matin de la greffe, Le sang placentaire (USP) est congelé le jour de la naissance

Une des complications possible de l'allogreffe est la maladie du greffon contre l'hôte. La réaction des lymphocytes du greffon vis-à-vis du receveur peut aller jusqu'à provoquer le décès du patient. Cette réaction est prise en compte dans le conditionnement de la maladie toutefois il a été démontré que l'injection de lymphocyte (DLI) du donneur à distance de la greffe permet de provoquer une réaction contrôlée qui à un effet anti-leucémique

Les étapes du processus d'allogreffe à la BTC

Prélèvement	<input checked="" type="checkbox"/> Moelle au bloc opératoire sous AG <input checked="" type="checkbox"/> Cellules souches circulantes au centre de santé
Décongélation	<input checked="" type="checkbox"/> Cellules souches du sang placentaire <input checked="" type="checkbox"/> DLI
Réception	Enregistrement informatique
Contrôle Qualité	Numération des cellules nucléées totales, des cellules souches des lymphocytes Culture des progéniteurs hématopoïétiques Bactériologie
Préparation	Déplasmatisation, désérythrocytation Ajustement du volume et de la quantité de CSH, Décongélation (DLI et USP)
Greffe	

Activité 2014

	AUTOGREFFE		ALLOGREFFE							
	CSP		CSP		MO		USP		DLI	
	Enfants	Adultes	Enfants	Adultes	Enfants	Adultes	Familiale	Fichier	Familiale	Fichier
Prélèvements										
Donneurs prélevés	13	202		56	17	50	8	25	19	16
- dont en France	13	202		37	17	31	8	16	19	5
- dont à l'étranger				19	0	19		9		11
Donneurs familiaux apparentés prélevés				17	17	24	8		19	
Donneurs non apparentés prélevés				39		19		25		16
Produits cellulaires réceptionnés	20	327		73	17	50	8	25	19	16
- prélevés en France	20	327		50	17	31	8	16	19	5
- prélevés à l'étranger				23	0	19		9		11
Prélèv issus donneurs familiaux apparentés				23	17	24	8		19	
Prélèv issus donneurs non apparentés				50		19		25		16
Transformations										
Filtration					31					
Dilution			9							
Réduction/Concentration/Déplaquectisation					6					
Déplasmatisation			11		8					
Désérythrocytation					15					
Décongélation	11	183					1	25	35	31
Greffes										
Cessions à un greffeur affilié	11	183		43	17	45	1	25	35	31
Patients greffés		190		56	67		1	25	16	15

Visite Guidée

Notre laboratoire est localisé au pavillon I
de l'hôpital E. Herriot

Ouverture de l'hôpital 1933

Installation de la banque 1999



Couloir principal



Vue extérieure de la ZAC Cellules



Allogeneic cord blood (CB) is a hematopoietic stem cell transplant. Donor lymphocytes infusions (DT) are a therapeutic tool to reduce opportunistic infections (OI) and increase graft-versus-leukemia (GVL) effect. Unfortunately donor lymphocyte transplant (DLT) is present here a problem from CB in order to use them as a significant disease or eventually specific engineering. Several teams have developed various doses of lymphocytes. But applicable in France, because the Good Medical Practices (GMP)³. We developed an expansion protocol from 10% as a fraction of a CB to sufficient amounts of T-cells for DT.

Methods:

10% of the volume from the the selection and Ex vivo expansion T-cells were positively selected (Miltenyi Biotec®) to magnetic beads (Miltenyi Biotec®) under GMP conditions. After selection, CD3+ T-cell CD2/CD3/CD28 beads (Miltenyi Biotec®) in TexMACS Medium supplement 18 to 20 days. Viability, phenotype and function (flow cytometry on Becton Dickinson) after 20 days cells were harvested. After beads removal, the expanded T-cells were cryopreserved in the fraction obtained. Cryopreservation scheme: 5x10⁶, 1x10⁷ and 5x10⁷ cells were performed in 5 conditions as usually performed in

Results:

Our technique of selection and expansion of T-cells has been developed.

Face à face le centre de calcul et l'entrée des ZAC tissus et cellules



Premier sas d'accès au ZAC



Deuxième sas



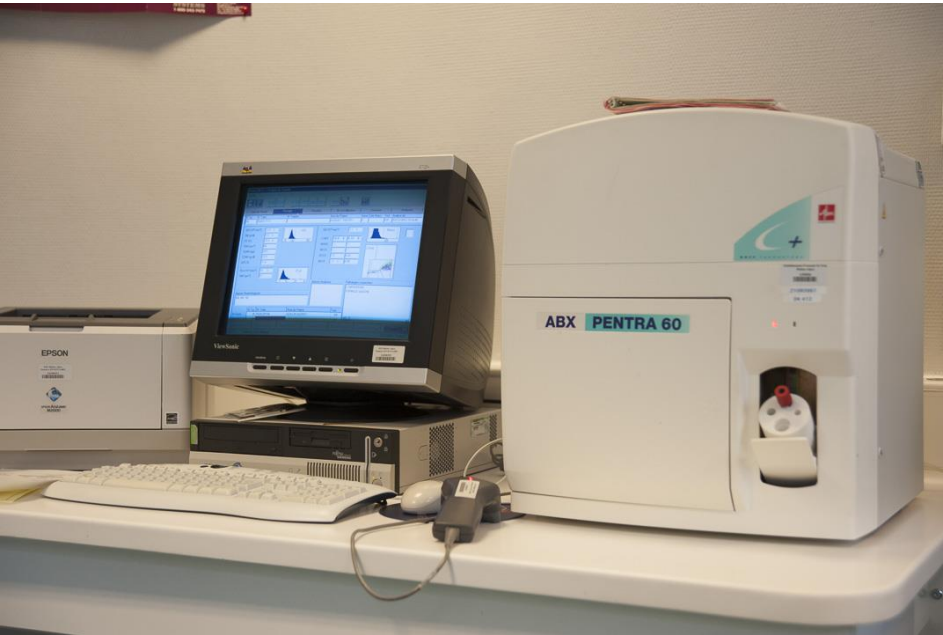
Pièce de manipulation des cellules souches



Prélèvement contrôle qualité



Numération des cellules souches



Détermination du phénotype



Culture cellulaire



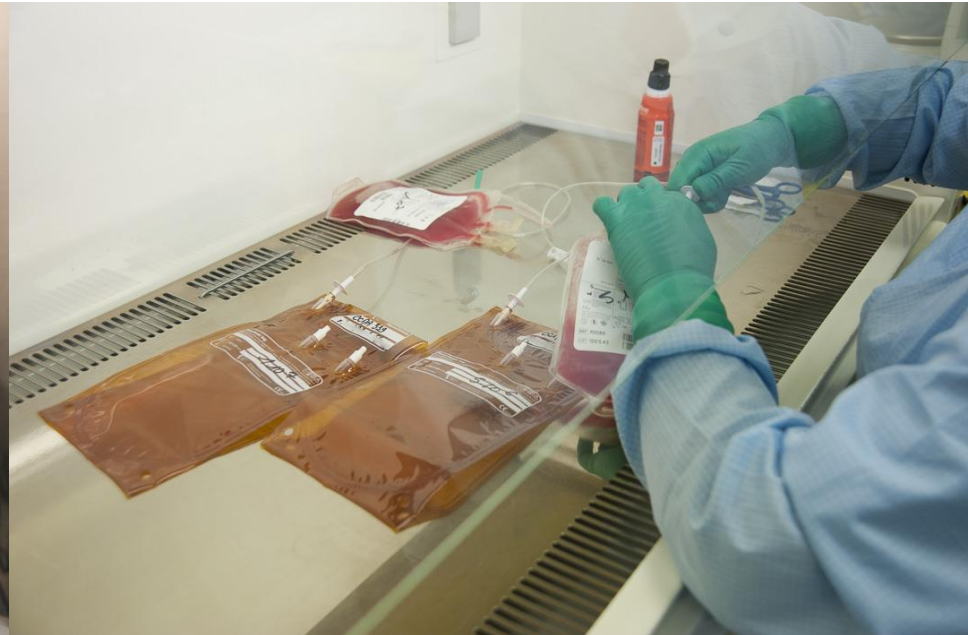
Enregistrement informatique



Préparation



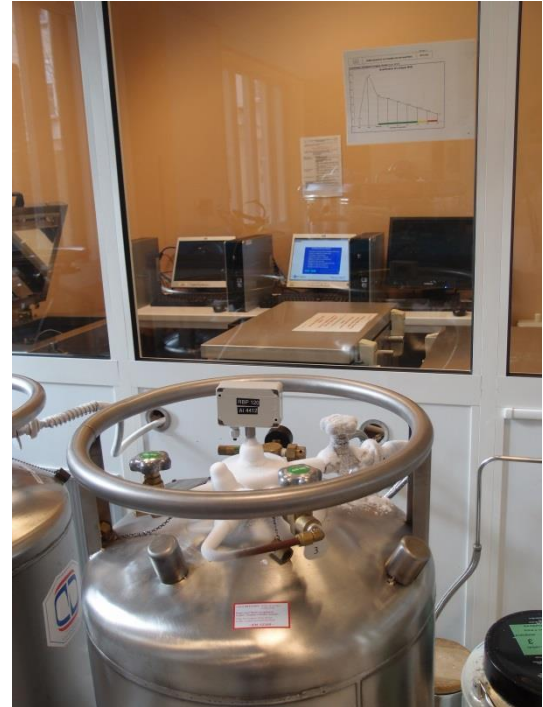
Conditionnement pour congélation



Congélation



Congélation Appareil de descente en température



Congélation des cellules souches et lymphocytes

Courbes de congélation

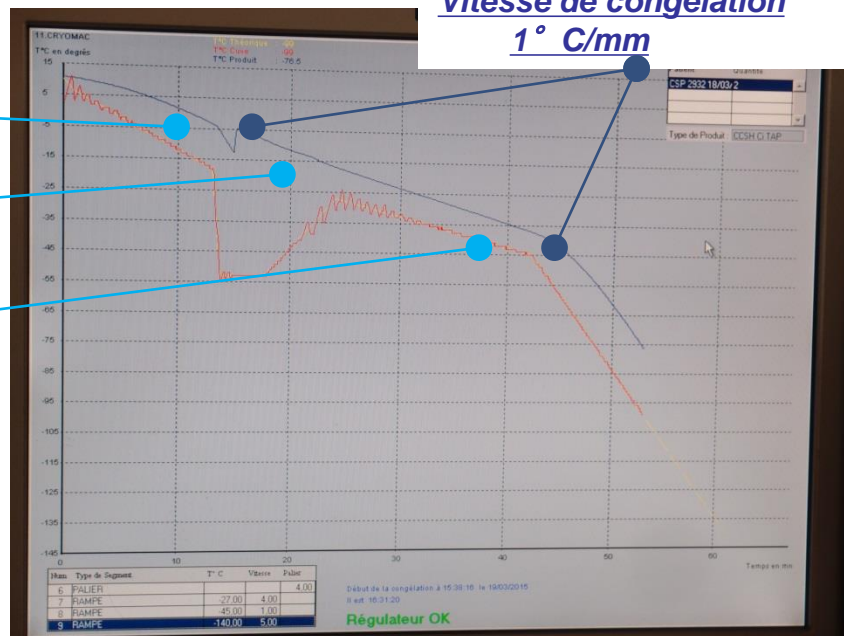
Suspension cellulaire liquide

Phase congélation début de cristallisation

Phase de refroidissement

Vitesse de congélation

1° C/mm



Congélation : Stockage



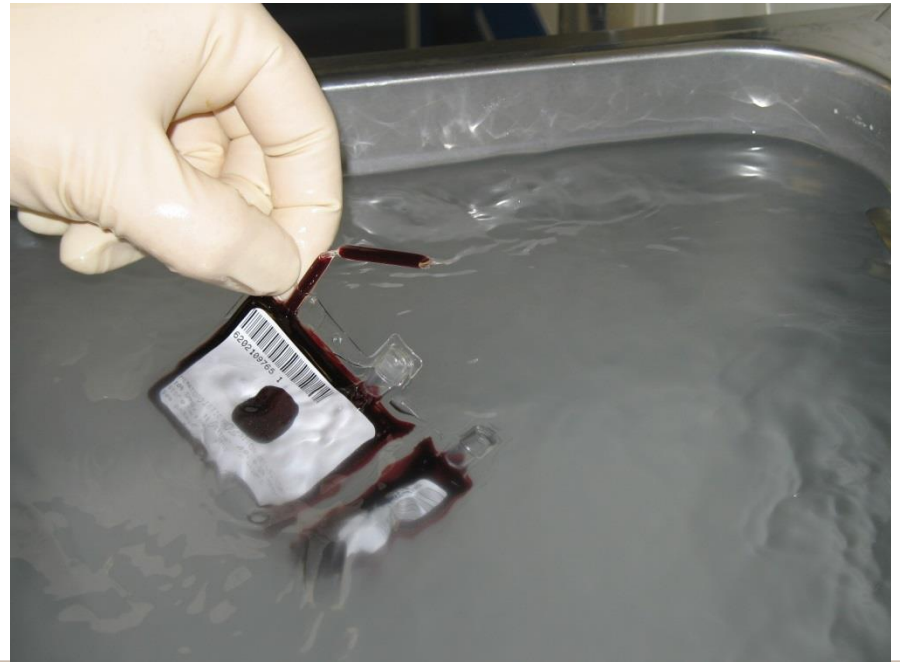
Stockage



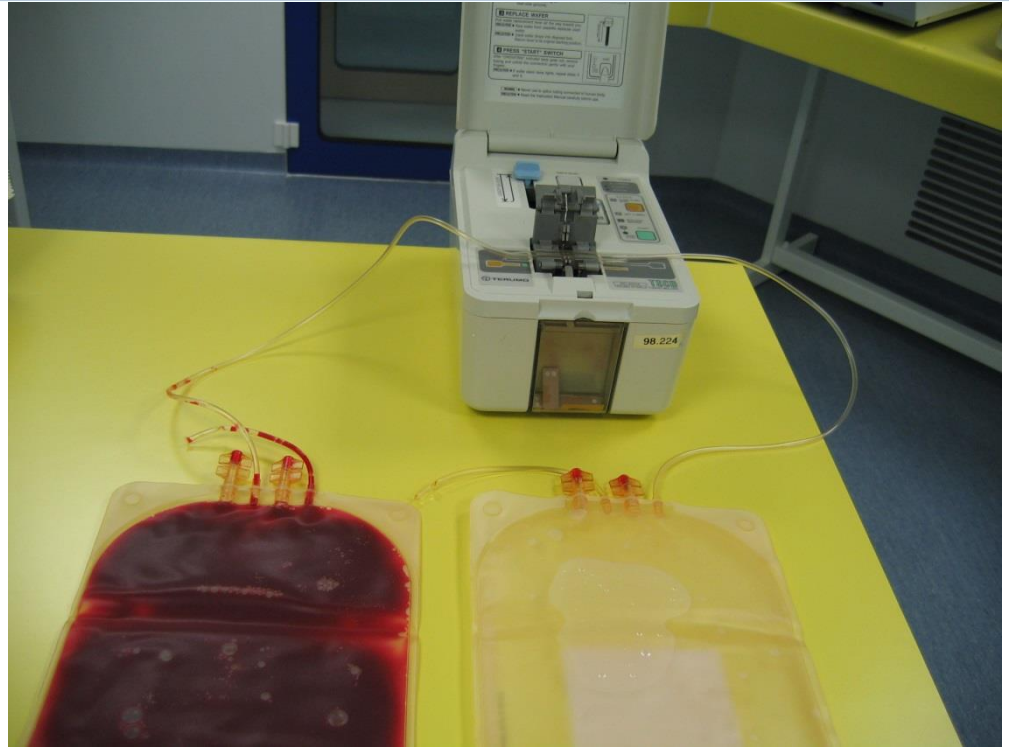
Décongélation poche classique



Décongélation micro-unité



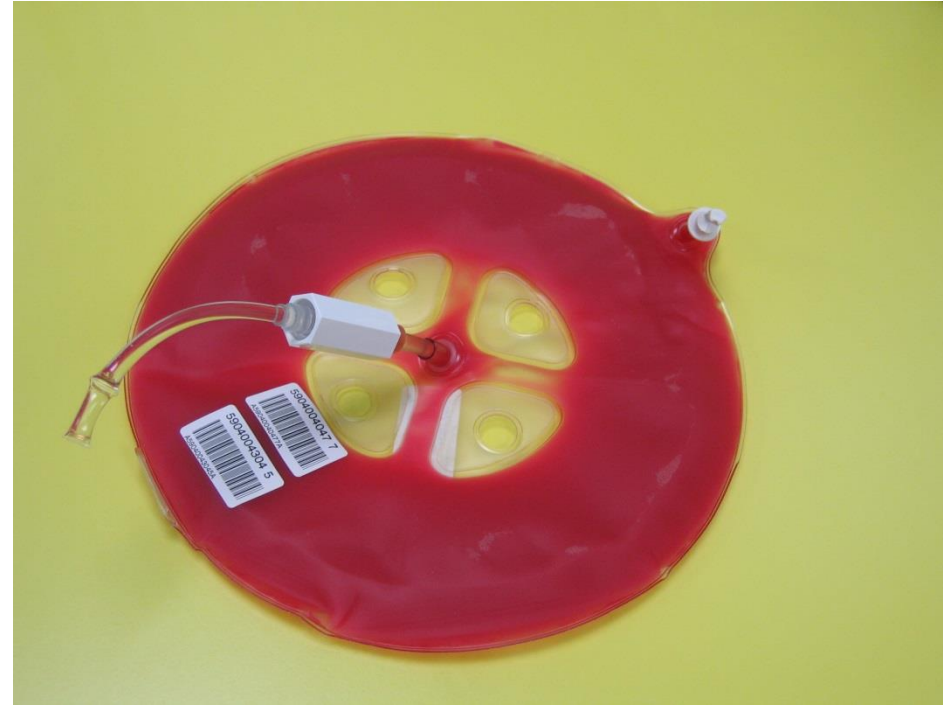
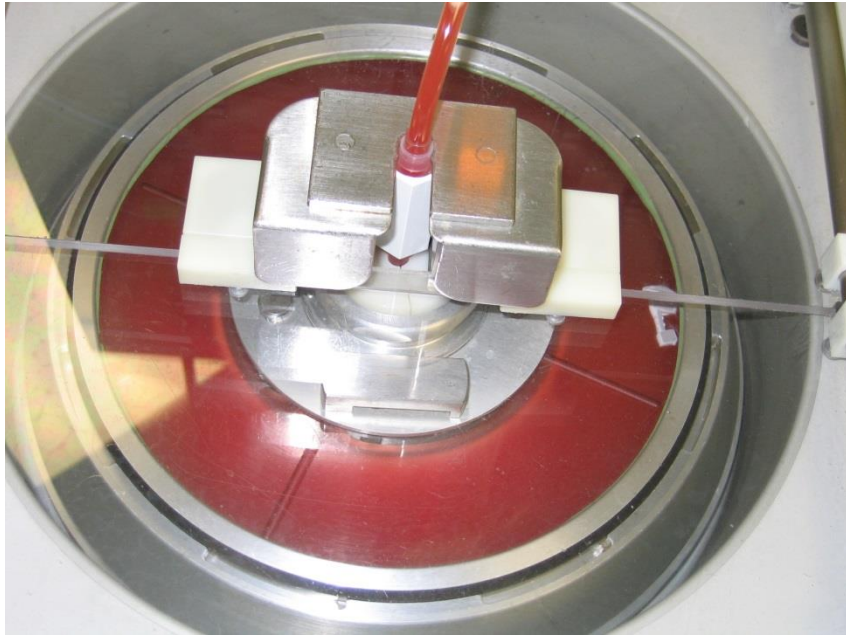
Décongélation préparation lavage



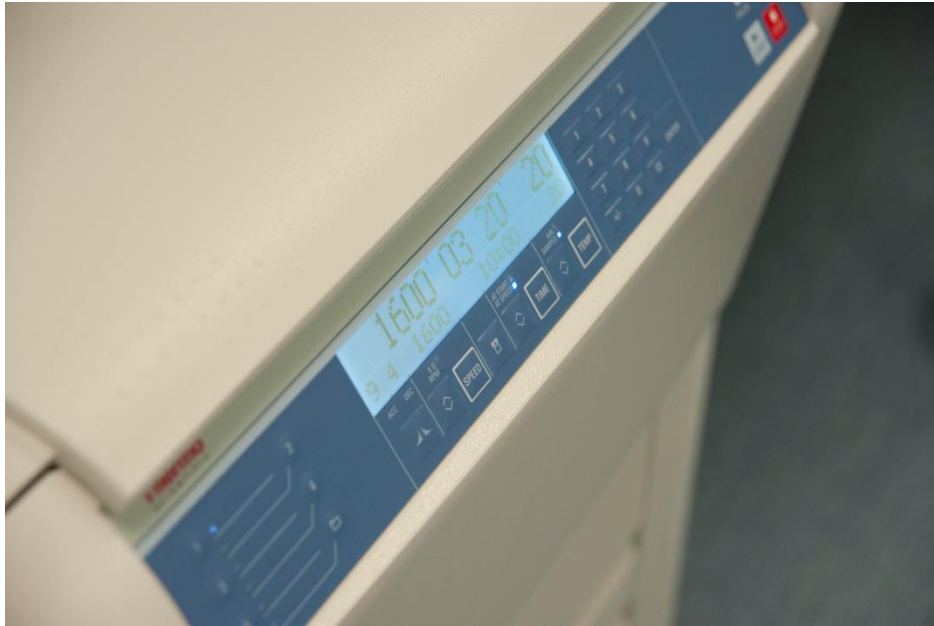
Décongélation Dilution lavage



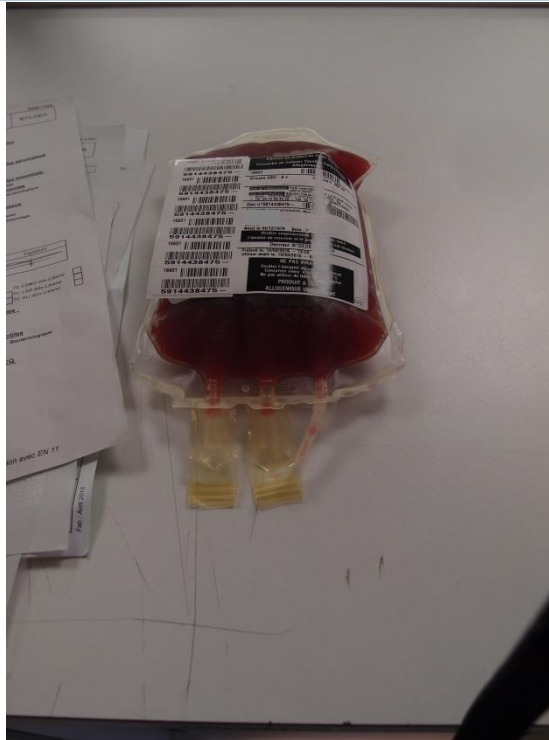
Décongélation lavage



Décongélation autre possibilité



Décongélation produit fini



Autres destinations : Prélèvement de moelle





Poche de moelle osseuse

Autres destinations : Prélèvement de moelle et greffe de tissus composite induction d'une tolérance à la greffe

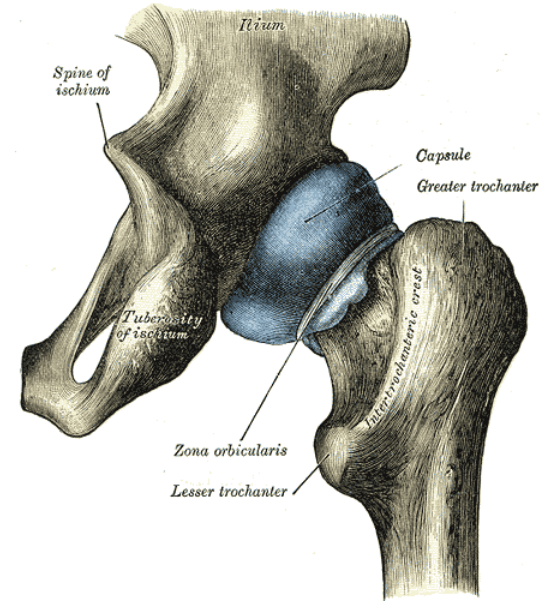


R2B Mettre à disposition des tissus

	Type de don	Stérilisation	Conservation	indication	Prélèvement	Greffe
Tête fémorale	Vivant	Irradiation	-80°C	comblement osseux	644	146
			Lyophilisation			499
Os Long	EME	Antibiothérapie	-80°C	Chirurgie orthopédique	4	15
Volet osseux crânien	Autologue	Irradiation	-80°C	Neuro chirurgie	36	26
Vaisseaux artériels	EME	Antibiothérapie	-150°C	Chirurgie vasculaire	116	104
Valve cardiaque	EME	Antibiothérapie	-150°C	Chirurgie de l'aorte	14	12
Prélèvement cutané	EME	Antibiothérapie	-80°C	Traitement des grands brulés	52083 cm ²	38874 cm ²



Banque de tissus : Tête fémorale



Les Têtes fémorales (TF)

Elles sont collectées au détour des interventions de pause de prothèse de hanche.

Le tissu osseux spongieux contenu dans ces greffons est utilisé en chirurgie orthopédique comme bio-matériaux de comblement et greffe osseuse.

A partir de cette matière première deux formes sont distribuées par la banque

La tête fémorale congelée irradiée préparée à la banque de tissus :

les greffons viro-inactivés préparés en sous traitance avec un laboratoire de bio-ingénierie.

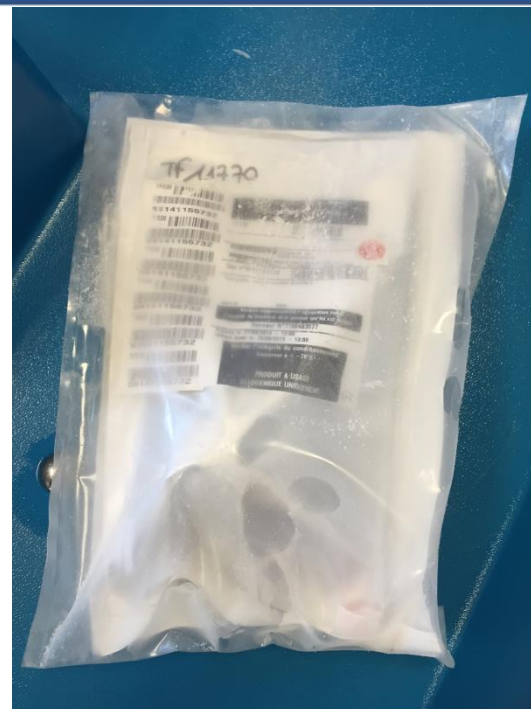
En fait il s'agit d'une multitude de forme optimisées par la chirurgie

Matière première

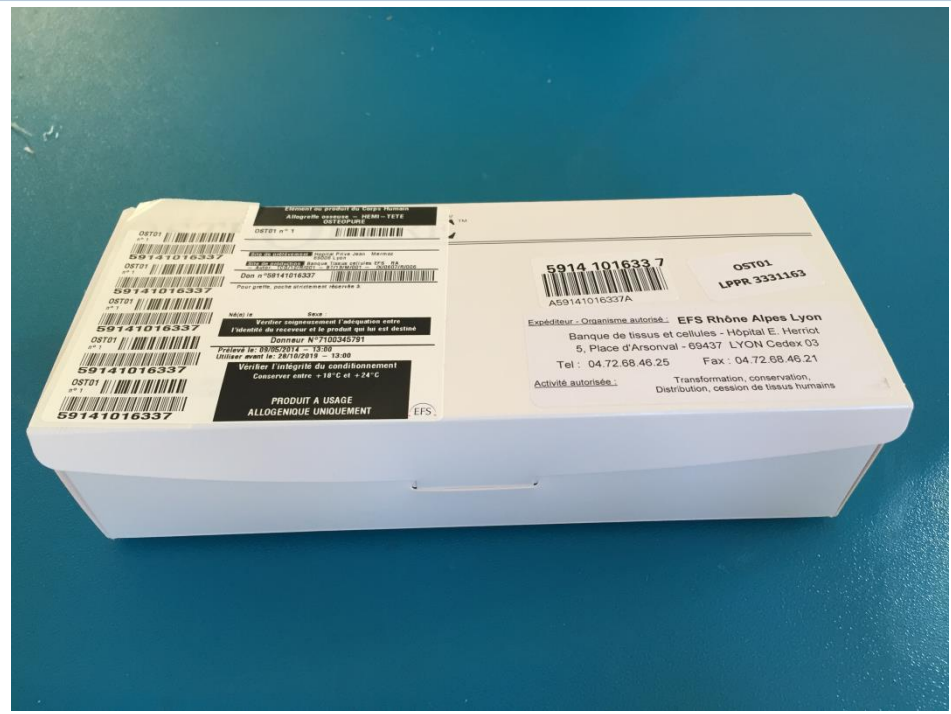


TF Congelée irradiée

TFE20 59141019271	Élément ou produit du Corps Humain Tête Fémorale Congelée Irradiée
TFE20 59141019271	TFE20
TFE20 59141019271	Site de prélèvement : Clinique Belledonne 38400 St Martin D Heres
TFE20 59141019271	Site de production : Banque Tissus cellules EFS - RA - Autor. TCG/12/R/001 - B1/13/M/001 - DX/0607/R/006
TFE20 59141019271	Don n°59141019271
TFE20 59141019271	Pour greffe, poche strictement réservée à :
TFE20 59141019271	Né(e) le : Sexe :
TFE20 59141019271	Vérifier soigneusement l'adéquation entre l'identité du receveur et le produit qui lui est destiné
TFE20 59141019271	Donneur N°7100386314
TFE20 59141019271	Prélevé le: 10/06/2014 - 13:00 Utiliser avant le: 09/06/2019 - 13:00
TFE20 59141019271	Vérifier l'intégrité du conditionnement Conserver à < -70°C
	PRODUIT A USAGE ALLOGENIQUE UNIQUEMENT



TF Viro inactivée



TF Viro inactivée



TF Viro inactivée disponible

code produit	Forme	code produit	Forme
OST30	OST- BLOC 25X12X10 mm	OST03	OST- TETE INCO EVIDEE
OST31	OST- BLOC 30X25X15 mm - 3377604	OST11	OST- POT FRAGMENT FIN 1cm3
OST21	OST- COIN L10 ANGLE 6° - 3377604	OST33	OST- POT FRAGMENT FIN 2cm3
OST22	OST- COIN L15 ANGLE 10° - 3377604	OST34	OST- POT FRAGMENT FIN 4cm3
OST32	OST- COL 1/2 ANN CORTICAL	OST05	OST- PLAQ CORTICO-SPONGIEUSE x1
OST10	OST- POT FRAGMENT FIN 5cm3	OST25	OST- COIN M8 ANGLE 6°
OST12	OST- POT FRAGMENT 5cm3	OST26	OST- COIN M9 ANGLE 8°
OST13	OST- POT FRAGMENT < 15cm3	OST27	OST- COIN S10 ANGLE 12°
OST14	OST- POT FRAGMENT > 15cm3	OST24	OST- COIN M11 ANGLE 12°
OST15	OST- POT FRAGMENT 25cm3	OST23	OST- COIN M10 ANGLE 10°
OST02	OST- DEMI-TETE	OST20	OST- POT FRAGMENT FIN 0,5cm3
OST01	OST- HEMI-TETE	OST38	OST- PLAQ CORTICO-SPONGIEUSE x2
OST09	OST- TETE INCOMPLETE	OST37	OST - Disque de fermeture x4 D:14 mm Ep:5mm
OST16	OST- TRANCHE < 15cm3 - 3377604	OST36	OST - Coin RSA
OST17	OST- TRANCHE > 15cm3	OST04	OST - Baguette spongieuse 5x5x30
OST35	OST- GROS FRAGMENT 25cm3	OST28	OST- COIN S8 ANGLE 8°
OST18	OST- GROS FRAGMENT >45cm3		

Banque de tissus : Os Long

Les Os longs sont collectés par les chirurgiens orthopédiques du CHU au cours des prélèvements Multi-organes.

Les pièces prélevées seront utilisées comme support de prothèse, (Hanche, genou ...) durant des interventions lourdes comme les résections des tumeurs osseuses et les pertes de substance

Une part non négligeable d'os est importé de la banque de tissus du CHU de Bruxelles pour pallier à la difficulté de prélèvement sur le CHU

GREFFE D'OS MASSIFS

Collaboration Service d'Orthopédie HEH –Pavillon T¹

Banque de Tissus²

1 - Pr J. P. Carret – Dr J. M. Durand – Dr G. Vaz - Pavillon T- Hôpital Edouard Herriot

2 – Dr O. Hequet – Banque de Tissus et Cellules – EFS Rhône-Alpes- Site de Lyon

Prélèvement

Tibia – Fémur +/- humérus

Prélèvement Multi-Organes EME

Indications : Perte du capital osseux

- Tumeur osseuse

- Révision prothétique (hanche genou)

1990



ostéosarcome

2003



Destruction osseuse par métallose

2004



Reconstruction par prothèse manchonnée d'une allogreffe de tibia avec appareil extenseur



Conclusion

- **Collaboration** Service d'orthopédie et Banque de Tissus
- **Sécurité** Contrôles Bactériologiques et viraux
- **Intérêt** Conservation de la fonction en situation orthopédique extrême (oncologique, prothétique...)

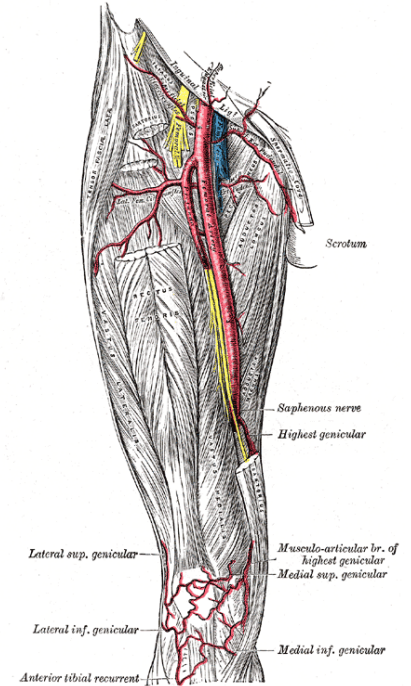
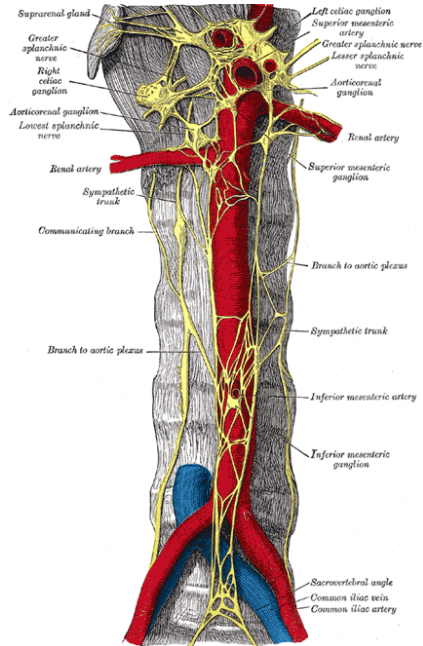
Banque de tissus : Volet crânien

Une partie de la boîte crânienne peut être retirée par des chirurgien neurologique afin de diminuer la pression intra-crânienne consécutive à un traumatisme grave.

Les parties ainsi retirées sont confiées à la banque pour être stérilisées et stockées dans l'attente d'une ré-implantation.

Celle-ci à généralement lieu une fois que le patient est sortie du coma et que son état général lui permet de supporter cette nouvelle intervention

Banque de tissus : Artère



Les artères

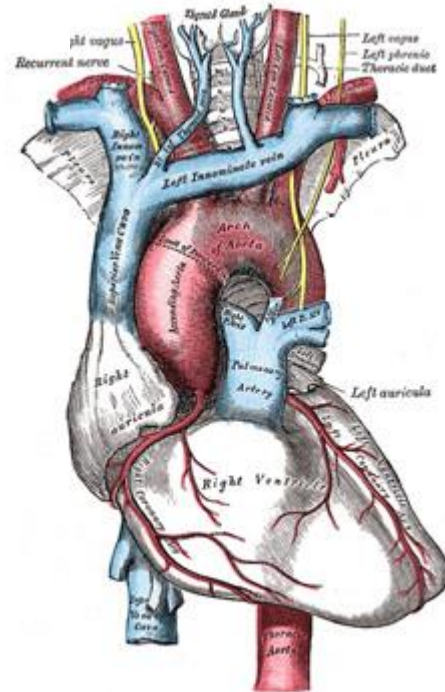
Elles sont prélevées lors de PMO par des chirurgiens vasculaires; Il s'agit essentiellement d'artères des membres inférieurs, plus rarement de l'aorte et la bifurcation aorto-bi iliaque

Elles sont utilisées (85 % des cas) dans les indications d'ischémie sévère des membres inférieurs Absence de circulation → absence d'oxygénation → nécrose → amputation

L'autre indication est la chirurgie de l'aorte abdominale en présence d'infections aorto-digestives sévères (pronostic vital du patient systématiquement engagé)

Depuis 2010 notre banque collabore avec 4 CHU de la région : Lyon, Grenoble, St Etienne et Clermont-Ferrand

Banque de tissus : Valve cardiaque



Les valves cardiaques

Les valves cardiaques sont préparées à partir de cœurs prélevés au cours d'un PMO qui ne pourront pas faire l'objet d'une transplantation cardiaque

Depuis quelques années ce sont les valves pulmonaires (90% des cas) qui sont utilisés et principalement dans la chirurgie de l'insuffisance aortique

Cette intervention dite de Ross est une opération de chirurgie cardiaque où la valve aortique défaillante d'un patient est remplacée par sa propre valve pulmonaire. La valve pulmonaire est quant à elle remplacée par une homogreffe.

Les avantages étant la possibilité de croissance sur des patients jeunes et l'absence traitement anticoagulants à prendre, ce qui diminue les risques chez les femmes souhaitant avoir une grossesse ou les adultes souhaitant continuer à avoir une activité sportive ou ayant une profession à risque hémorragique.

Banque de tissus : prélèvement cutané



Greffe de peau

La peau (épiderme, couche superficielle du derme) est prélevée lors des PMO par les chirurgiens spécialistes des greffes cutanées

Elle sert exclusivement au traitement des grands brûlés en jouant le rôle de pansement évitant les infections, diminuant les pertes hydro-électrolytiques.

Les fragments cutanés n'étant pas compatibles avec le receveur, un phénomène inévitable de rejet va s'installer. Ce n'est donc qu'une solution temporaire. Les brûlés étant fortement immunodéprimés, leur organisme ne rejette la greffe qu'après environ deux semaines, contre quelques jours chez une personne saine.

Paradoxalement, ce rejet, cette activation lente du système immunitaire du patient entraîne des phénomènes encore mal connus mais qui incontestablement favorise la cicatrisation et prépare admirablement la prise des autogreffes.

Marie Andrée, Olivier, Elodie, Joëlle, Anne Geneviève, Claire Lise, Charlotte Philippe

L'équipe de la banque de tissus



Séverine, Alexandra, Chantal, Charline, Jean Paul, Carole et Carole, Valérie et Valérie

A la mémoire
Dr Alain EHRSAM
1946-2008

