

# CONTRÔLE EXTERNE DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES

## Bilan général

Béatrice PANTERNE

Direction des Laboratoires et des Contrôles  
Unité Produits Sanguins et Thérapie Cellulaire

10 ans du contrôle externe des cellules souches  
hématopoïétiques. St-Denis - 08/10/2010



Agence française de sécurité sanitaire  
des produits de santé

# LES PRODUITS DE THERAPIE CELLULAIRE

---

- **Prépondérance des produits hématopoïétiques et de leur utilisation thérapeutique (le plus fréquemment pour la reconstitution hématopoïétique dans le cadre des traitements des hémopathies malignes):**
  - **Cellules souches du sang périphérique (CSP) après mobilisation et après décongélation**
  - **Moelle osseuse**
  - **Sang placentaire**
  - **Lymphocytes du donneur**

**Le contenu en cellules d'intérêt varie selon différents paramètres (origine, pathologie, recueil etc...); une dose minimale à atteindre a été définie selon les produits**

# CONTROLES REALISES SUR LES PRODUITS HEMATOPOÏETIQUES

---

- **Température à réception, conditionnement, aspect de l'échantillon**
- **Numération des cellules nucléées**
- **Viabilité**
- **Numération des progéniteurs CD34+ (test phénotypique)**
- **Test fonctionnel par culture des progéniteurs CFU-GM**
- **Contrôle bactériologique et fongique**

A compléter par différentes analyses en fonction du contexte (autres CD, numération des GR, recherche des mycoplasmes....)



# METHODES UTILISÉES POUR LES PRODUITS HÉMATOPOÏÉTIQUES

---

**Numération des CT:** au compteur d'hématologie et/ou à la cellule de Malassez

**Viabilité:** Marquage par le 7-AAD (intercalant ADN)

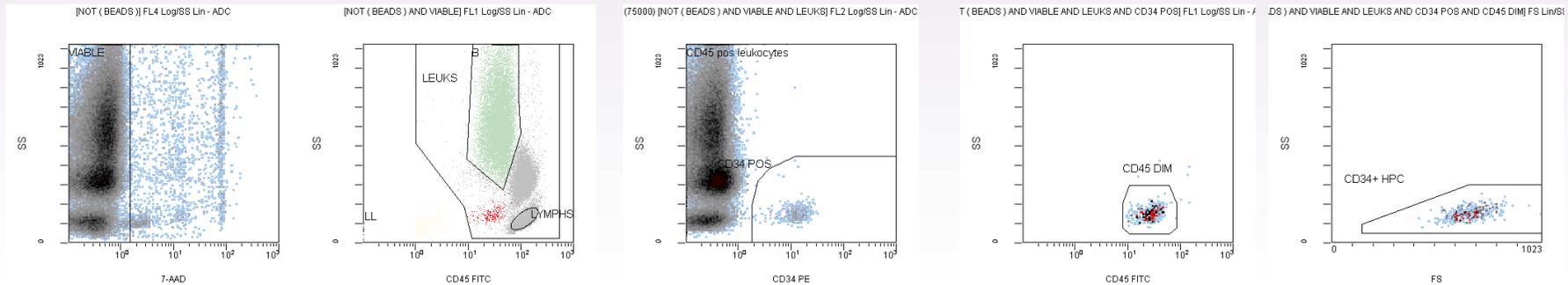
**Numération des CD34+:** marquage CD34-CD45 en présence de billes calibrées → VA directe, et en présence de 7-AAD → CD34+ viables

**Test CFU-GM:** sur milieu semi-solide, sur la référence indiquée par le producteur. Incubation à 37°C en atmosphère humide à 5% CO<sub>2</sub> pendant 14 jours.

**Contrôle bactériologique et fongique:** par hémoculture automatisée de 10 j sur milieux AER et ANA.



# EXEMPLE D'ANALYSE CD34 D'UNE CYTAPHERESE FRAÎCHE



**CSP autologue avec 708 CD34+ viables/ $\mu$ l (0,48%), viabilité totale 96,9% en 7-AAD. La dose de CD34 est obtenu selon le calcul suivant:**

$$\text{CD34} \cdot 10^6 / \text{kg} = \frac{708 / \mu\text{l} \times \text{volume de la poche } (\mu\text{l})}{\text{Poids du patient}}$$

**Poids du patient**

## Numération des cellules CD34 dans les produits hématopoïétiques de 2000 à 2010

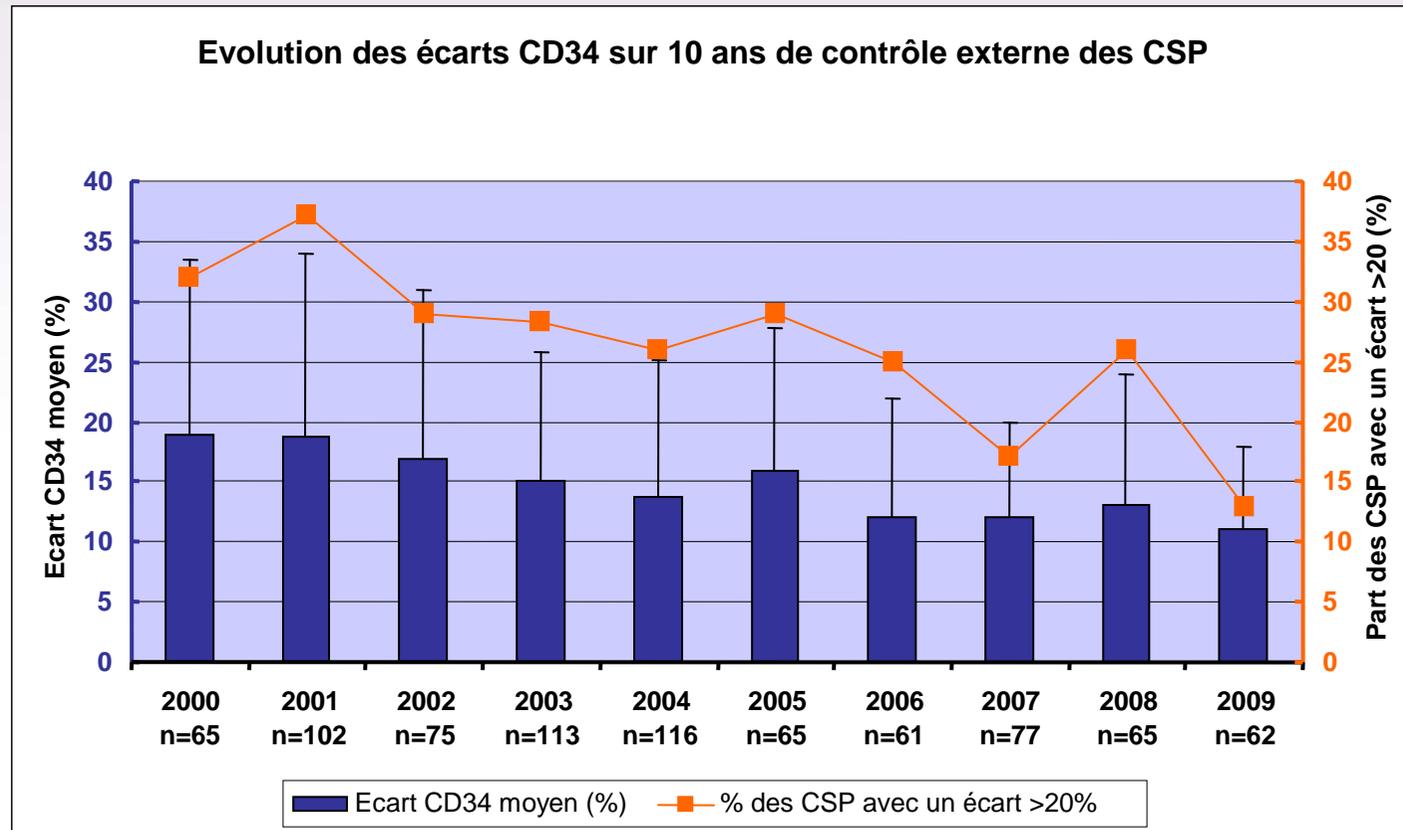
	Ecart moyen Producteurs - Afssaps pour la détermination du nombre de CD34+	R <sup>2</sup>
<b>CSP (n=789)</b>	<b>14,7% ± 11,8</b>	<b>0,88</b>
<b>Moelle osseuse (n=105)</b>	<b>19% ± 16,4</b>	<b>0,85</b>
<b>CSP décongelées (n=150)</b>	<b>27,2% ± 20,7 (viabiles)</b>	<b>0,73</b>
	<b>20,5% ± 15,4 (totales)</b>	<b>0,83</b>

Rendement CD34 à l'Afssaps (après transfert) : 55% ± 24 (n=59)

Rendement CD34 Producteurs (à la décongélation) : 72,6% ± 29,3 (n=60)



# Suivi des écarts CD34 Producteurs-Afssaps de 2000 à 2009



**Différence significative entre l'écart moyen observé en 2000 et celui observé en 2009 avec  $p=0,0002$**

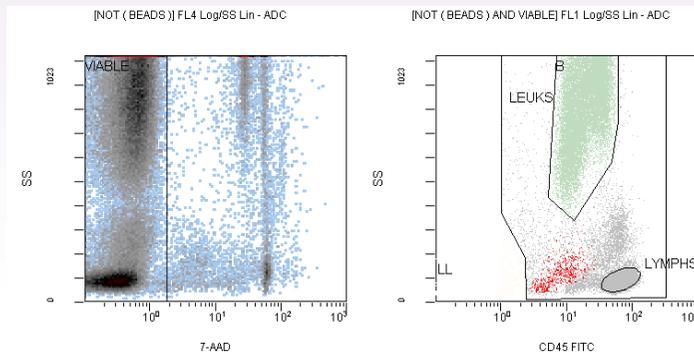


## Comparaison des écarts selon la méthode utilisée par le producteur

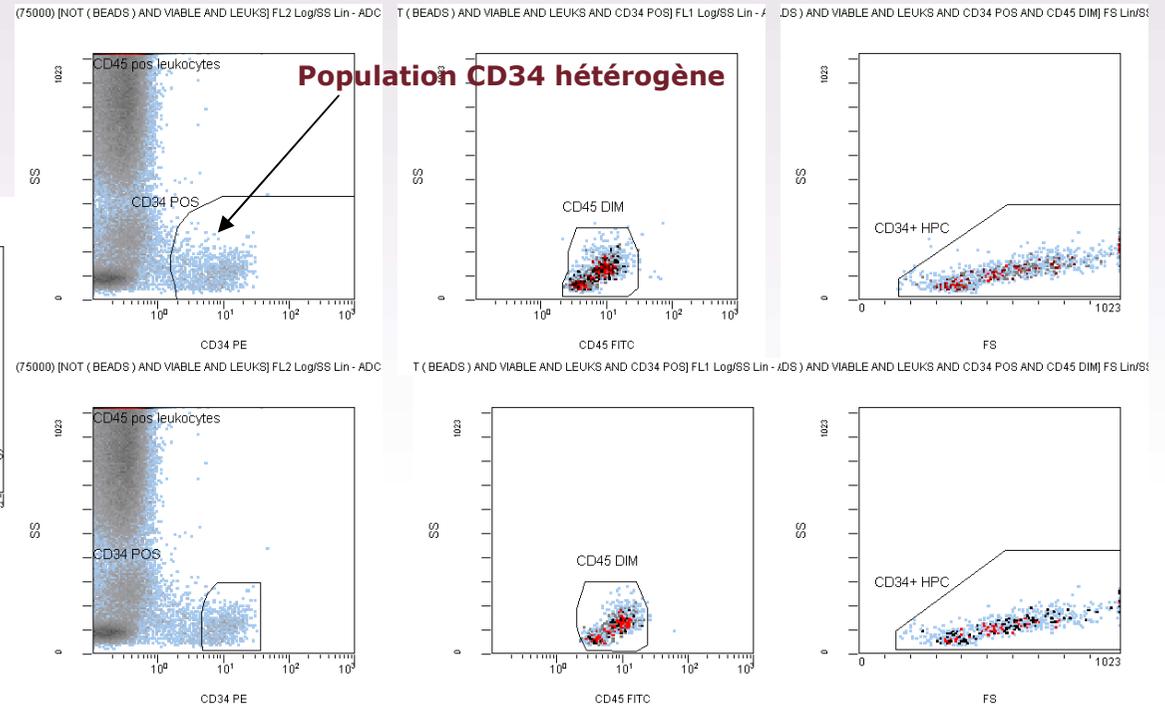
Produits	Ecart CD34 moyen Producteurs - Afssaps (%)		p
	Double Plateforme	Simple Plateforme	
<b>CSP fraîches</b>	<b>17,0 ± 14,9 (n=396)</b>	<b>12,9 ± 9,7 (n=386)</b>	<b>&lt;0,0001</b>
<b>Moelle osseuse</b>	<b>20 ± 18 (n=57)</b>	<b>15,9 ± 12 (n=30)</b>	<b>0,2</b>
<b>CSP décongelées (Viables/Prod)</b>	<b>27,5 ± 21,7 (n=87)</b>	<b>22,3 ± 16,5 (n=55)</b>	<b>0,1</b>
<b>(Totales/Prod)</b>	<b>21,2 ± 15 (n=69)</b>	<b>14,7 ± 10,9 (n=36)</b>	<b>0,015</b>
<b>Rendement producteur (%)</b>	<b>90,8 ± 28,6 (n=24)</b>	<b>60,5 ± 23,1 (n=36)</b>	<b>&lt; 0,0001</b>

# Exemple d'analyse CD34+ d'une moelle osseuse

## 1) Gating totalité CD34



## 2) Gating resserré sur les CD34+ brillantes



Avec 1) 88 CD34+ viables/ $\mu$ l et 2) 60 CD34+ viables/ $\mu$ l

## Test fonctionnel CFU-GM

---

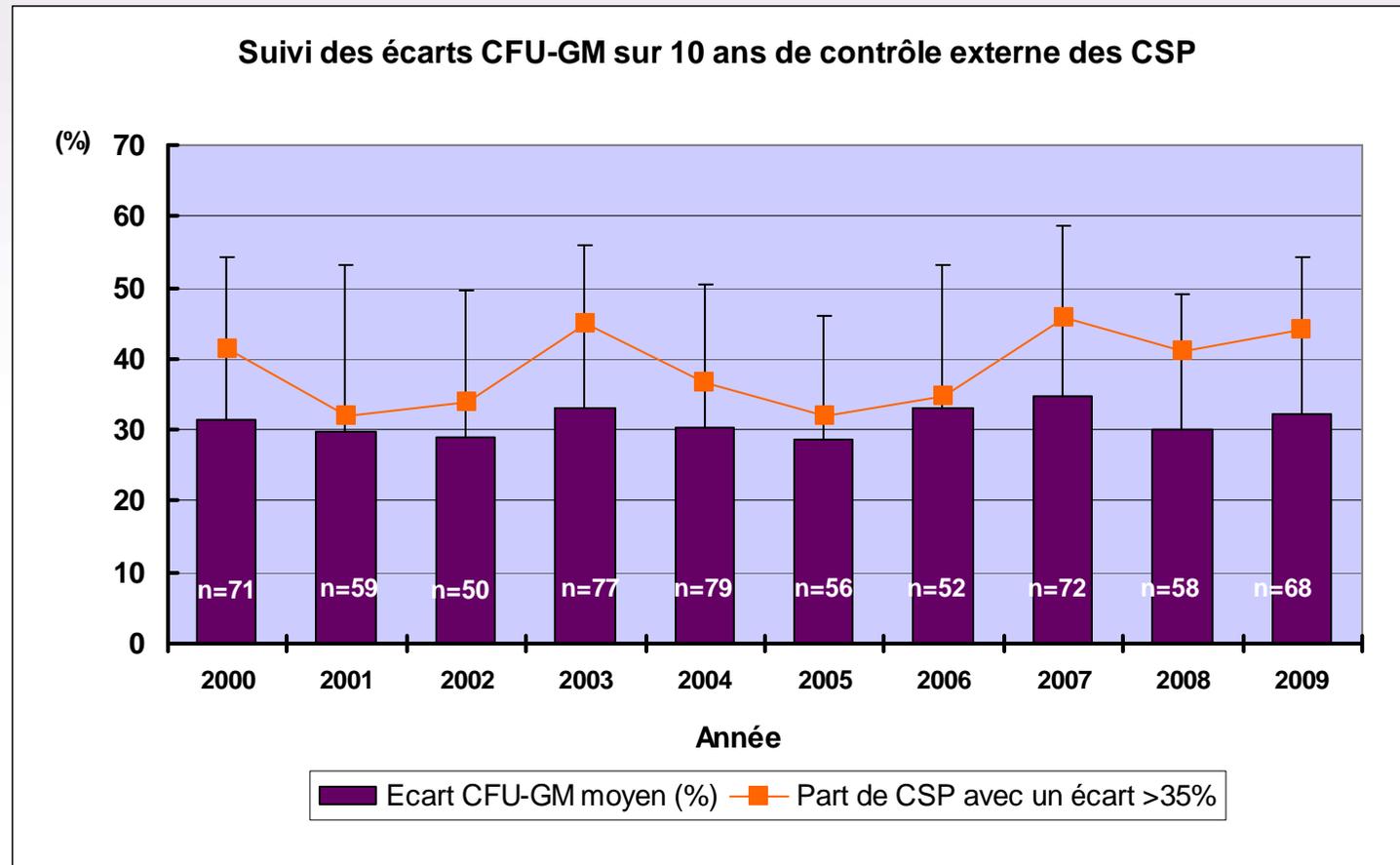
**Observation d'une corrélation significative entre Producteurs et Afssaps (avec  $R^2$  de 0,5 à 0,8) pour les cultures cellulaires malgré de nombreux paramètres pouvant influencer le résultat :**

- **nombre de cellulesensemencées**
- **estimation des colonies (CFU-GM ou CFU-GM+M)**
- **conditions de validation du test**
- **lavage, séparation, ou non des cellules**

## Evaluation des CFU-GM dans les produits hématopoïétiques de 2000 à 2010

	Ecart moyen Producteurs-Afssaps pour la détermination du nombre de CFU-GM	Clonogénicité CFU-GM	
		Producteurs	Afssaps
<b>CSP (n=660)</b>	<b>31,3% ± 21,5 R<sup>2</sup>=0,61</b>	<b>18,9% ± 14,9</b>	<b>13,8% ± 6,3</b>
<b>Moelle osseuse (n=72)</b>	<b>32,1% ± 23,1 R<sup>2</sup>=0,54</b>	<b>10,0% ± 10,4</b>	<b>10,2% ± 5,2</b>

# Suivi des écarts CFU-GM Producteurs- Afssaps de 2000 à 2009



# Clonogénicité CFU-GM obtenues à l'Afssaps pour les différents milieux de culture

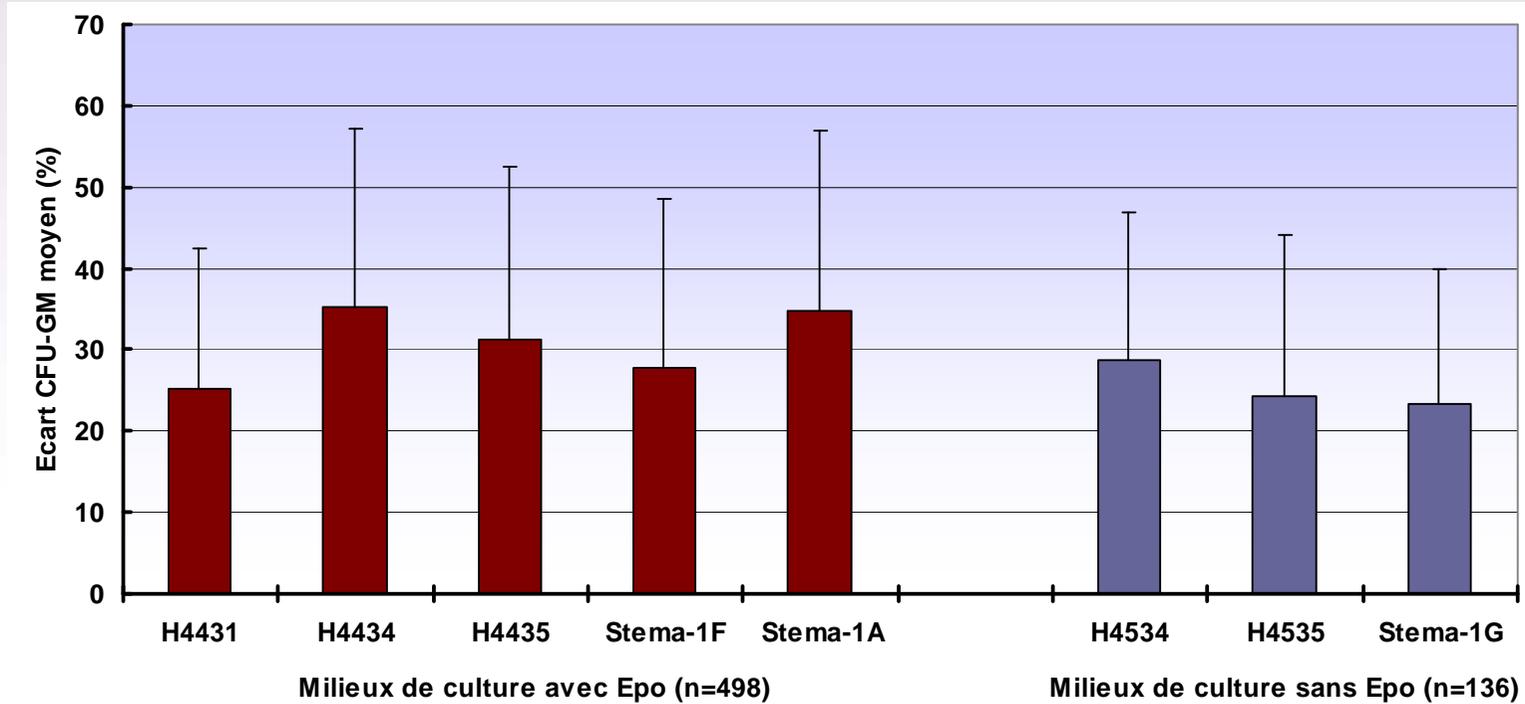
Milieux	H4431	H4434	H4435	H4534	H4535	Stem $\alpha$ -1A	Stem $\alpha$ -1F	Stem $\alpha$ -1G
Moyenne (%)	8,9	11,8	15,6	15,5	16,5	10,7	12,4	12,7
Ecart-type	5,4	4,8	5,7	5,75	6,1	6,6	7,2	6,9
n	83	149	129	30	34	54	70	45

Résultats pour les cultures de CSP fraîches

Clonogénicité CFU-GM = Nombre de CFU-GM/ Nombre de CD34 x 100



# Ecart Afssaps-Producteurs en fonction du milieu de culture



Ecart moyen Epo : 31,8% ± 21,4

Ecart moyen sans Epo: 25,6% ± 18,5

**Différence significative entre les milieux avec Epo et les milieux sans Epo (t=3,34, p=0,0009)**

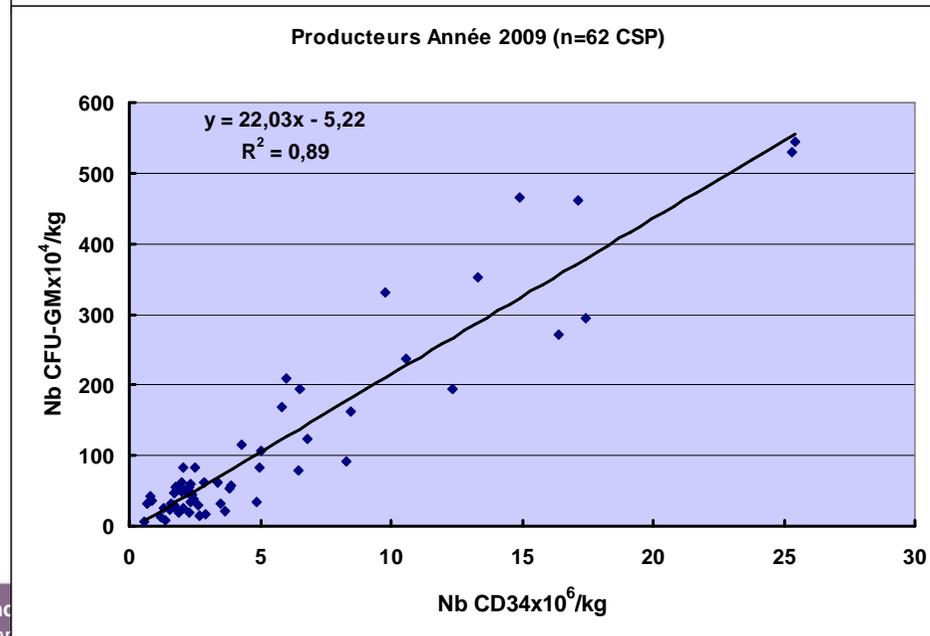
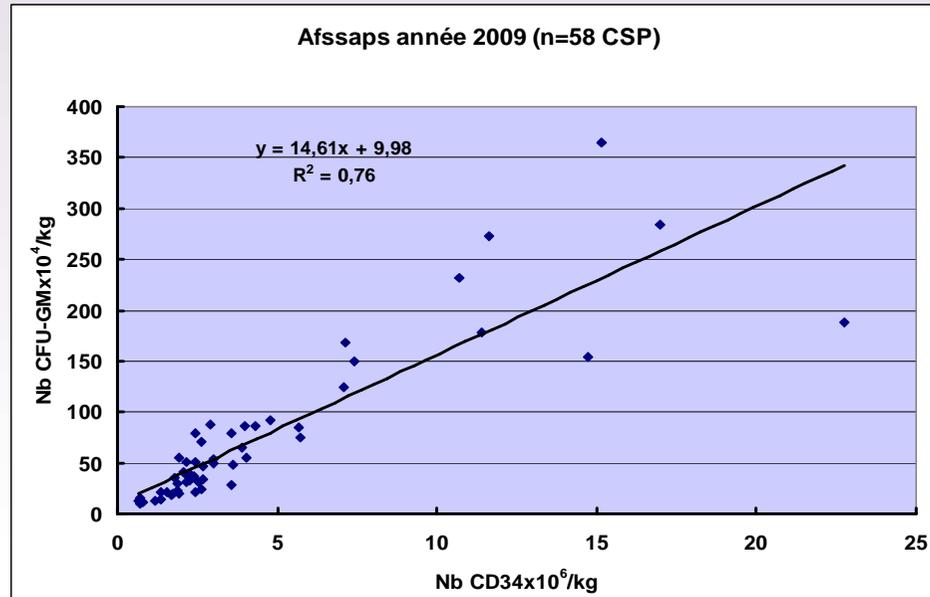


## Ecart Producteurs- Afssaps en fonction de la préparation de l'échantillon

<b>Ecart CFU-GM entre Producteurs et Afssaps</b>	<b>Mise en culture avec lavage au préalable de l'échantillon (prod)</b>	<b>Mise en culture sans lavage préalable de l'échantillon</b>
<b>Moyenne (%)</b>	<b>33,8</b>	<b>34,7</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>25,2</b>	<b>23,2</b>
<b>Variance</b>	<b>636,4</b>	<b>537,4</b>
<b>n</b>	<b>92</b>	<b>151</b>

Pas de différence significative entre les 2 groupes ( $\epsilon=0,28$ ,  $<1,96$ )

# Corrélation CD34-CFU-GM en 2009



## A l'Afssaps:

Corrélation significative avec  $r=0,87$   $p<0,05$   
clonogénicité moyenne =  $16,9\% \pm 6,9$   
(Suivi inter-essais)

## Pour les Producteurs:

Corrélation significative avec  $r=0,94$ ,  $p<0,05$   
clonogénicité moyenne =  $19,9\% \pm 10,4$

# CONCLUSION

---

- Définition de modalités de contrôle adaptées à ces produits (rareté, spécifications, stabilité, ...)
- Suivi des écarts Producteurs-Afssaps, repères de qualité pour les produits cellulaires et pour les procédés
- Contribution à la standardisation des méthodes
- Exploitation des données du contrôle contribuant à l'amélioration de la qualité des produits
- Forte adhésion des sites
- Publication de recommandations nationales et de référentiels européens pour les CSH



# CONTACTS

**Laurence Mouillot, Directrice scientifique des laboratoires de St-Denis**

**Unité Produits Sanguins et Thérapie Cellulaire**

**Laurent Fleury, Responsable de l'Unité: [Laurent.fleury@afssaps.sante.fr](mailto:Laurent.fleury@afssaps.sante.fr)**

**Béatrice Panterne, Responsable CQ, Tél: 01 55 87 42 10  
[Beatrice.panterne@afssaps.sante.fr](mailto:Beatrice.panterne@afssaps.sante.fr)**

**Christine Sabatini, Assistante, Tél: 01 55 87 42 12  
[Christine.sabatini@afssaps.sante.fr](mailto:Christine.sabatini@afssaps.sante.fr)**

**Vanessa Duval, technicienne,  
[Vanessa.duval@afssaps.sante.fr](mailto:Vanessa.duval@afssaps.sante.fr)**