



ROYAUME DU MAROC

Université Mohammed V - Rabat
Faculté de Médecine et de Pharmacie
RABAT



Année 2021

N°: MM0162021

MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE « **BIOTECHNOLOGIE MEDICALE** »

OPTION : « **BIOMEDICALE** »

Intitulé

ETUDE DES FACTEURS INFLUENÇANT LA PERTE DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES DES GREFFONS CRYOCONSERVES EN VUE D'AUTOGREFFE

Soutenu par :

CHAKRI MERYEM

Devant le jury composé de :

**Pr. OUADGHIRI MOUNA, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat,
Présidente**

**Pr. ATOUF OUAFA, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat,
Encadrante**

**Pr. OUADGHIRI SANAE, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat,
Examinatrice**

Dédicace

Je dédie ce travail, à mes très chers parents, qui ont toujours garni mes chemins avec force et lumière, merci pour votre amour, votre soutien, et vos sacrifices durant toute ma vie, merci pour tous mes magnifiques parents

A mes frères, ma sœur pour leur soutien, et leur respect qu'ils trouvent ici l'expression de ma haute gratitude

A toutes mes amies qui m'ont toujours encouragé, et à qui je souhaite beaucoup de succès et de bonheur

A ma grand-mère, tes prières si précieuses

A tous ceux qui m'ont assisté à réaliser ce travail.

Remerciements

Je désire grandement remercier

Madame le Professeur

Malika ESSAKALI

*Chef de service de transfusion, d'immunologie et Banque de tissus et de cellules à
l'hôpital d'enfants Rabat, de m'avoir accueillie dans son laboratoire.*

À l'équipe pédagogique du laboratoire MEDBIOTECH

Merci pour tous les efforts fournis pour nous donner la meilleure formation possible.

A Monsieur le Professeur de génétique

Driss OURAINI

Nous prions tous pour vous et que votre âme repose en paix.

À notre maitre, Monsieur le professeur

Azzedine IBRAHIMI

Vos qualités humaines et professionnelles sont pour nous un exemple à suivre. Soyez assuré de notre vive reconnaissance et de notre profond respect.

À notre encadrante, Madame le Professeur

Ouafa ATOUF

Je vous remercie d'avoir encadré mon travail et de m'avoir accompagnée sans relâche jusqu'à la rédaction de ce mémoire, ce projet est fruit de votre soutien. Veuillez accepter l'expression de notre profonde reconnaissance.

À notre présidente de ce mémoire, Madame le Professeur

Mouna OUADGHIRI

Je vous remercie pour votre aide, votre disponibilité, et votre coopération le long de la réalisation de ce travail.

À Madame le Professeur

Sanae OUADGHIRI

Pour l'honneur que vous nous avez fait d'accepter de juger ce travail, notre gratitude est grande pour l'intérêt que vous avez montré à l'encontre de notre travail.

À Madame **Kaoutar ELMORABIT**

Je vous remercie pour votre aide et vos conseils pertinents sont un grand ajout à ce travail. Soyez assurée de mon profond respect et de ma sincère reconnaissance.

À Madame **Imane YAKHLEF**

Je vous remercie de m'avoir aidée en ce qui concerne les tests statistiques.

À Madame **Sara BOUGAR**

Je vous remercie pour votre aide, et d'avoir mis à ma disposition les informations nécessaires concernant les traitements mobilisateurs des patients

Aux membres de l'unité Banque de tissus et de cellules et du laboratoire de cytométrie

ASMAA, ABDELALI, MOHAMED ALI, MOHAMED AMINE

Merci pour votre aide précieux aux moments où j'en avais besoin.

*Et à tout le personnel de **STSH**, médecins, techniciens et infirmiers, pour vos encouragements, votre soutien continu.*

Merci à toutes les personnes qui m'ont soutenues par leur sympathie, leur gentillesse et leur amitié.

Résumé

Titre : ETUDE DES FACTEURS INFLUENÇANT LA PERTE DES CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏÉTIQUES DES GREFFONS CRYOCONSERVES EN VUE D'AUTOGREFFE

Auteur : CHAKRI MERYEM

Mots clés : Autogreffe, Cryoconservation, Décongélation, Rendement en CSH.

L'autogreffe des cellules souches hématopoïétiques (GCSH) est le processus permettant la perfusion intraveineuse de greffon des cellules souches hématopoïétiques (CSH) prélevés du patient lui-même pour traiter certaines maladies hématologiques et non hématologiques. Son efficacité est principalement basée sur le nombre de cellules CSH CD34+ présentes au sein du greffon qui est pratiqué avant et après conservation. Une cryoconservation suivie d'une décongélation peuvent impacter la qualité de ce greffon. Une récupération de CSH CD34+ après décongélation supérieur à 70% est considérée comme étant un bon rendement.

La finalité de notre travail a consisté à étudier l'influence de facteurs relatifs aux étapes de cryoconservation et décongélation sur une perte de CSH CD34+ des greffons cryoconservés de plus 30%. L'identification de ces facteurs imposerait des actions correctives à fin d'améliorer la qualité des greffons à livrer.

Une étude rétrospective a été réalisée sur 50 greffons cryoconservés et décongelés avec lavage le jour prévu de la greffe. Le pourcentage de perte de CSH a été calculé pour chaque greffon.

L'analyse des données montrent que la valeur médiane de perte de CSH CD34+ est de 29%. La médiane de délai entre la fin de cytophérèse et début de préparation à la congélation est 20h 22min. Concernant le temps de cryoconservation, la médiane est de 59jours. Nos résultats montrent qu'une perte supérieure à 30% a été observée chez 44% de nos patients. La comparaison entre le groupe ayant une perte supérieure à 30% et celui ayant un bon rendement n'a pas montré de différence significative des facteurs étudiés. Des études complémentaires restent nécessaires pour mieux évaluer les facteurs influençant le rendement en CSH après la décongélation.

Abstract

Title : STUDY OF THE FACTORS INFLUENCING THE LOSS OF HEMATOPOIETIC STEM CELLS FROM CRYOPRESERVED GRAFTS FOR AUTOGRAFT

Auteur : CHAKRI MERYEM

Keywords : Autologous HSCT, CD34+, Cryopreservation, Thawing, Loss of CD34+ cells, Yield of CD34+ cells.

Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation (HSCT) is the process of intravenous infusion of hematopoietic stem cells (HSC) taken from the patient himself to treat certain hematological and non-hematological diseases. Its effectiveness is mainly based on the number of CSH CD34 + cells present within the graft which is performed before and after storage. Cryopreservation of the graft followed by its thawing can impact the quality of the cell products to be infused into patients. A recovery of CD34 + CSH after thawing greater than 70% is considered to be a good yield.

The purpose of our work was to study the influence of factors relating to the cryopreservation and thawing steps on a loss of CD34 + CSH from cryopreserved grafts of more than 30%. Identifying these factors would require corrective actions to improve the quality of the grafts to be delivered.

A retrospective study was performed on 50 cryopreserved and thawed grafts with washing on the scheduled day of grafting. The percentage of CSH loss was calculated for each graft. Analysis of the data shows that the median loss of CSH CD34 + is 29%.

The median time between the end of apheresis and the start of preparation for freezing is 20h 22min. Regarding the cryopreservation time, the median is 59 days. Our results show that a loss greater than 30% was observed in 44% of our patients. The comparison between the group with a loss greater than 30% and the one with a good yield did not show any significant difference in the factors studied. Further studies are still needed to better assess the factors influencing the yield of CD34 + cells after thawing.

ملخص

العنوان : دراسة العوامل التي تؤثر على فقدان الخلايا الجذعية المكونة للدم من الطعوم المحفوظة بالتبريد من أجل التطعيم الذاتي

الكاتب : مريم شكري

الكلمات الأساسية : زرع الخلايا الجذعية، الحفظ بالتبريد، الذوبان، محصول الخلايا الجذعية.

زرع الخلايا الجذعية المكونة للدم هو عملية تطعيم الخلايا الجذعية المكونة للدم المأخوذة من المريض نفسه لعلاج بعض أمراض الدم و غيرها. تعتمد فعاليتها بشكل أساسي على عدد خلايا الجذعية الموجودة قبل وبعد التخزين. يمكن أن يؤثر الحفظ بالتبريد المتبوع بالذوبان على جودة هاته الخلايا الجذعية. يعتبر استرداد أكثر من 70 ٪ من الخلايا الجذعية بعد الاذابة عائدًا جيدًا.

كان الغرض من عملنا هو دراسة تأثير العوامل المتعلقة بخطوات الحفظ بالتبريد والذوبان على فقدان الخلايا الجذعية من الطعوم المحفوظة بالتبريد بنسبة تزيد عن 30٪. يتطلب تحديد هذه العوامل إجراءات تصحيحية لتحسين جودة الطعوم التي سيتم تسليمها.

تم إجراء دراسة رجعية على 50 طعمًا محفوظًا بالتبريد ومذابًا في اليوم المحدد للتطعيم. تم حساب النسبة المئوية لفقدان الخلايا الجذعية لكل طعم.

يُظهر تحليل البيانات أن متوسط خسارة الخلايا الجذعية هو 29٪. متوسط الوقت بين نهاية عملية تجميع الخلايا الجذعية وبداية التحضير للتجميد هو 20 ساعة و 22 دقيقة. فيما يتعلق بوقت الحفظ بالتبريد ، فإن الوسيط هو 59 يومًا. تظهر نتائجنا أن فقدان أكثر من 30٪ لوحظ في 44٪ من مرضانا. لم تظهر المقارنة بين المجموعة ذات الخسارة الأكبر من 30٪ والمجموعة ذات العائد الجيد أي فرق معنوي في العوامل المدروسة. لا تزال هناك حاجة إلى مزيد من الدراسات لتقييم العوامل التي تؤثر على محصول الخلايا الجذعية بشكل أفضل بعد الذوبان.

Table des matières

Dédicace

Remerciements

Résumé

Abstract

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction	1
Objectif	3
CHAPITRE 1 : Synthèse Bibliographique	4
I. Hématopoïèse	5
II. Cellules souches hématopoïétiques (CSH).....	8
II.1. Origine des CSH	8
II.2. Caractéristiques des CSH et niche hématopoïétique.....	8
II.3. Marqueur et numération des CSH.....	12
III. Autogreffe de CSH	14
III.1. Préparation clinique à l'autogreffe.....	14
III.2. Mobilisation et 'homing' des CSH	14
III.2.1. Mécanisme	14
III.2.2. Protocoles de Mobilisation	16
III.3. Cytaphérèse et recueil des CSH.....	17

III.4. Cryoconservation des CSH.....	18
III.4.1. Cryoprotecteurs.....	18
III.4.2. Congélation à vitesse progressive et congélation définitive.....	21
III.5. Décongélation.....	23
CHAPITRE 2 : Matériel et Méthodes.....	24
I. Cadre de l'étude	25
II. Protocoles de traitement des greffons de CSH à la banque de cellules du STSH.....	27
II.1. Préparation avant la congélation.....	27
II.2. Préparation des cryocytes de CSH	27
II.3. Congélation en azote	29
II.4. Décongélation avec lavage	29
III. Analyse statistique	30
CHAPITRE 3 : Résultats et Discussion	31
I. Résultats.....	32
I.1. Description de l'échantillon étudié.....	32
I.2. Analyse comparant les groupes.....	40
II. Discussion.....	41
Conclusion et Perspectives.....	44
Références Bibliographiques.....	45

Liste des abréviations

BC	: Banque de cellules
CAR	: CXC chemokine ligand 12 abondant
CD	: Cluster de différenciation
CMF	: Cytométrie en flux
CNT	: Cellules nucléées totales
CP	: Cryoprotecteur
CS	: Cellule souche
CSH	: Cellules souches hématopoïétique
DMSO	: Diméthylsulfoxyde
DP	: Double plateforme
FDA	: Food and Drug Administration
G-CSF	: Facteur de stimulation des colonies de granulocytes
GCSH	: Greffe des cellules souches hématopoïétiques
GM-CSF	: Facteur de stimulation des colonies granulocytes-macrophages
GMO	: Greffe de la moelle osseuse
M-CSF	: Facteur de stimulation des colonies de macrophages
MO	: Moelle osseuse
PC	: Produit cellulaire congelé
PD	: Produit cellulaire décongelé
RVC	: Refroidissement à vitesse contrôlée
SP	: Simple plateforme
STSH	: Service de transfusion sanguine et d'hémovigilance
VC	: Viabilité cellulaire

Liste des figures

Figure 1 : Les cellules sanguines (Actor, 2019).....	5
Figure 2 : Cascade de l'hématopoïèse (Hoggatt and Pelus, 2013).....	6
Figure 3 : Auto renouvellement des CSH (Chambers et al., 2008).....	9
Figure 4 : Différenciation des CSH (Chambers et al., 2008).....	9
Figure 5 : Niche de cellules souches hématopoïétiques (Suárez-Álvarez et al., 2012).....	11
Figure 6 : CD34+ marqueur phénotypique des cellules souches hématopoïétiques (Devine et al., 2010).....	12
Figure 7 : Microenvironnement de la moelle osseuse (Devine et al., 2010).....	15
Figure 8 : Structure chimique d'une molécule de DMSO (Gurtovenko and Anwar, 2007). ...	19
Figure 9 : Formation de pores dans le système bicouche avec 0%, 5%, 10%, 40% en moles de DMSO (Gurtovenko and Anwar, 2007).....	20
Figure 10 : Courbe de descente de la température contrôlée (Boulangier et al., 2016).....	22
Figure 11 : Répartition de l'échantillon étudié selon la perte de CD34+ (%).	32
Figure 12 : Répartition de l'échantillon étudié en fonction de l'âge.	33
Figure 13 : Répartition de l'échantillon étudié selon les pathologies.....	34
Figure 14 : Répartition de l'échantillon étudié selon les traitements mobilisateurs.....	35
Figure 15 : Répartition de l'échantillon étudié selon le délai entre la fin de cytophérèse et début de préparation à la congélation (min).	36
Figure 16 : Répartition de l'échantillon étudié selon le temps de cryoconservation (jours). ...	37
Figure 17 : Répartition de l'échantillon étudié en fonction des CNT sur le produit cellulaire congelé ($\times 10^3/\mu\text{l}$).	38
Figure 18 : Répartition de l'échantillon étudié en fonction de la viabilité cellulaire sur le produit cellulaire congelé (%).	39

Liste des tableaux

Tableau 1 : Nombre de cryocytes.....	28
Tableau 2 : Evaluation de l'impact des paramètres qualitatifs sur la perte de CD34+ chez les groupes 1 et 2 par le test Khi-2.	40
Tableau 3 : Evaluation de l'impact des paramètres quantitatifs sur la perte de CD34+ chez les groupes 1 et 2 par le test U Mann-Whitney.	40

Introduction

La greffe de moelle osseuse (GMO) ou greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH) est le processus permettant la perfusion intraveineuse des cellules souches hématopoïétiques (CSH) pour restaurer l'hématopoïèse normale et traiter la malignité (Giralt and Bishop, 2009). Cette thérapeutique est la forme la plus établie de thérapie cellulaire et constitue la pierre angulaire du traitement d'un large éventail de pathologies.

La GCSG peut être autologue ou allogénique. La greffe allogénique consiste en la perfusion d'un patient par les CSH saines d'un donneur pour remplacer les CSH qui ont été détruites par de fortes doses de chimiothérapie. Dans la greffe autologue, les propres cellules souches du sang périphérique du patient sont collectées et réinjectées à lui-même, après un traitement intensif de chimiothérapie, potentiellement ablatif de la MO (Sutherland et al., 1994).

La réalisation d'une autogreffe est conditionnée par l'obtention d'un greffon autologue riche en CSH CD34+ et fonctionnel capable de reconstituer l'hématopoïèse à long terme du patient (Bijou et al., 2011). Les autogreffes ne présentent pas de risque probable d'échec de la greffe si la viabilité du CSH est maintenue pendant le traitement et le stockage, et si des quantités adéquates de cellules CD34+ sont perfusées (Rowley et al., 2013). La cryoconservation des CSH est utilisée depuis de nombreuses années pour maintenir leur viabilité et leur potentiel de prolifération (Félix et al., 2018). C'est une technologie habilitante clé en médecine régénérative qui fournit un stockage cellulaire prolongé stable et sécurisé pour les produits cellulaires (Meneghel et al., 2020). Elle est particulièrement cruciale pour une thérapie cellulaire réussie et permet la génération de banques de cellules avec une durée de conservation, assurant ainsi une disponibilité constante et elle donne le temps pour les tests de contrôle qualité (Bahsoun et al., 2019). L'efficacité d'une greffe de CSH autologue est principalement déterminée par le nombre des cellules CD34+ présentes sur le greffon à administrer (D'Rozario et al., 2014). Malgré ces avantages, la cryoconservation des CSH pose plusieurs défis, notamment une baisse de la viabilité et la richesse cellulaire après décongélation (Hornberger et al., 2019) ce qui pourrait engendrer une perte en CSH. Il est

important qu'une évaluation de la richesse cellulaire soit effectuée sur des cellules décongelées plutôt que de s'appuyer sur des données de pré-congélation, car des études ont démontré que la congélation et la décongélation ont un impact sur la qualité des cellules. Ainsi un bon rendement est objectivé par une récupération de l'ordre de 70% après décongélation qui correspond à une perte inférieure à 30% (Florence Boulanger et al 2016).

Dans l'ensemble, l'amélioration des normes et des protocoles de cryoconservation des CSH se traduirait par une sécurité et un contrôle de qualité et une efficacité accrue de la thérapie CSH ainsi que d'autres thérapies cellulaires émergentes.

Objectif

La Banque de Cellules (BC) du CHU Ibn Sina de Rabat, créée en 2015, est une unité du Service de Transfusion Sanguine et d'Hémovigilance (STSH) de l'hôpital d'enfant de Rabat. Elle comprend une unité dédiée à la préparation, la conservation et la distribution de greffons cellulaires dans le cadre de l'autogreffe des CSH. Elle a pour mission d'offrir des prestations de thérapie cellulaire en cohérence avec les besoins médicaux. L'activité de thérapie cellulaire comprend des étapes nécessaires pour la préparation d'un produit et elle est dépendante de nombreux facteurs de variabilité pouvant compromettre l'efficacité, la sécurité et la qualité du greffon. Ainsi l'amélioration des pratiques pour assurer une bonne qualité des greffons est une décision prise par le service dans le cadre de son engagement à améliorer ses qualités de soin.

C'est dans cet objectif que nous avons mené ce travail afin d'étudier la richesse en CSH CD34+ de greffons décongelés. Ceci nous permettra d'évaluer le pourcentage du rendement ainsi que les facteurs pouvant influencer la perte CSH CD34+ sur les greffons cryoconservés après leurs décongélations. Par conséquent, le présent travail, a pour but de contribuer à l'amélioration continue.

CHAPITRE 1 :

Synthèse Bibliographique

I. Hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus par lequel les cellules souches (CS) prolifèrent et se différencient en tous les composants cellulaires du sang (**figure 1**), ainsi qu'en quelques autres types de cellules qui ne circulent généralement pas, notamment les cellules dendritiques et les mastocytes (Wertheim and Bagg, 2014). Elle se produit pendant le développement embryonnaire et tout au long de l'âge adulte pour produire et reconstituer le système sanguin (Jagannathan-Bogdan and Zon, 2013).

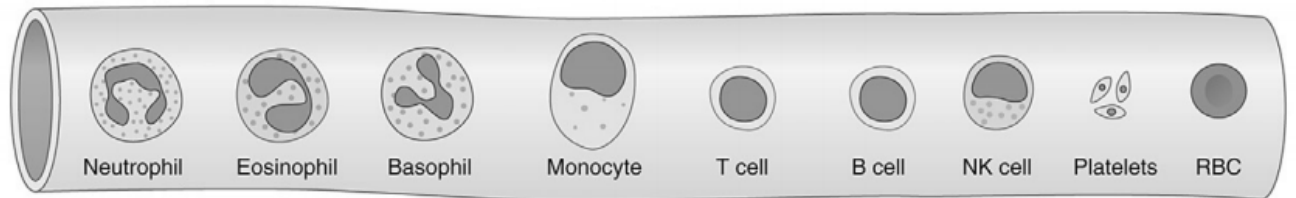


Figure 1 : les cellules sanguines (Actor, 2019).

Le système hématopoïétique peut être présenté comme une pyramide au sommet de laquelle se trouve la population des CS et dont la base est constituée par les cellules sanguines différenciées (**figure 2**). Entre ces deux extrêmes se positionne toute une cascade de progéniteurs hématopoïétiques qui, progressivement, se différencient dans les divers lignages hématopoïétiques tout en perdant leurs capacités de prolifération (Blanchet and Mouchiroud, 2013). La moelle osseuse (MO) est le site principal de l'hématopoïèse.

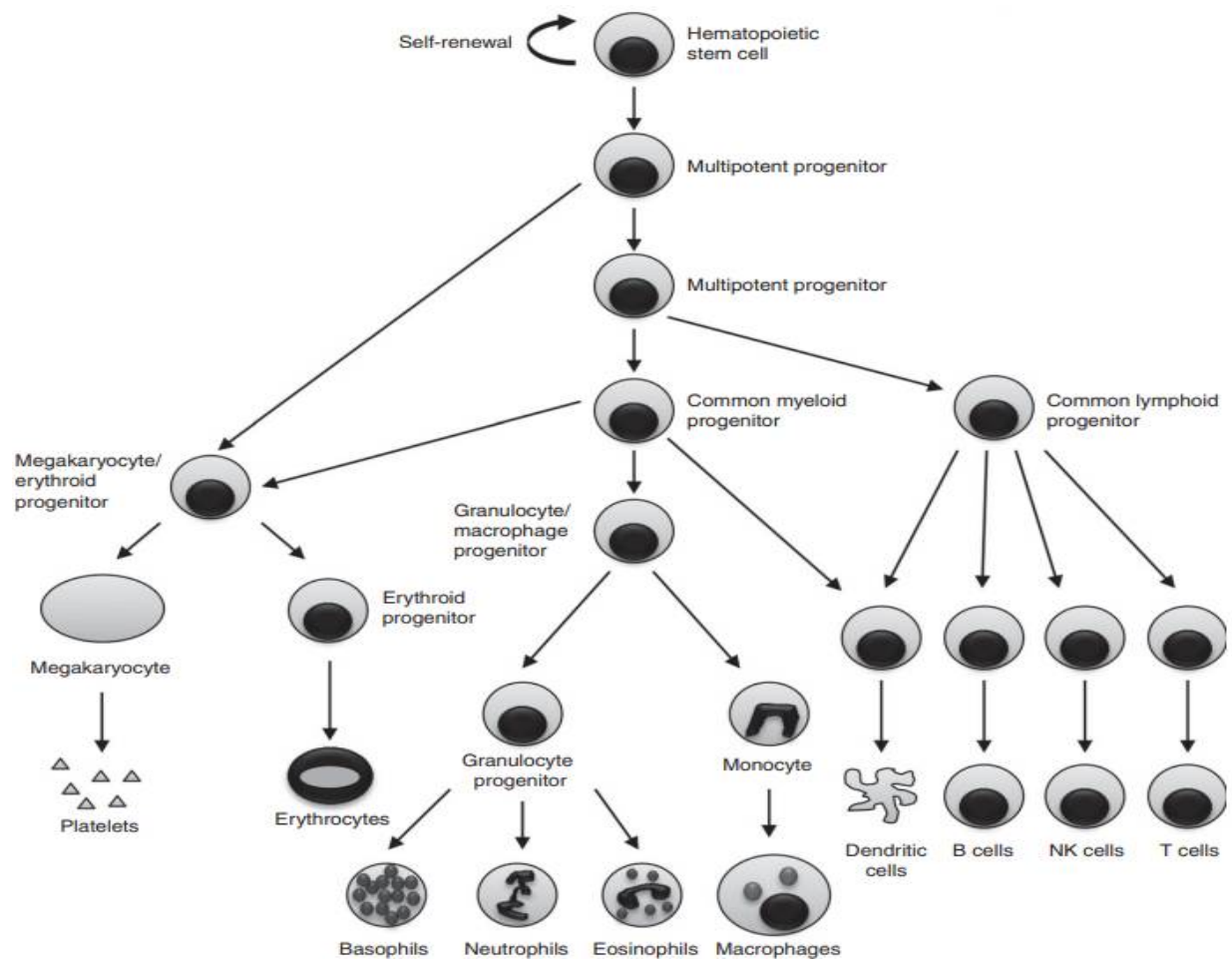


Figure 2 : cascade de l'hématopoïèse (Hoggatt and Pelus, 2013).

La différenciation des cellules souches, donnent naissance à des progéniteurs multipotents des lignées cellulaires myéloïdes ou lymphoïdes (Kondo, 2010). Le progéniteur lymphoïde commun se différencie en précurseurs des lymphocytes B et T et en lignées tueuses naturelles (Iwasaki and Akashi, 2007). Le progéniteur myéloïde commun donne naissance à deux types de progéniteurs ; le progéniteur des monocytes granulocytaires et un progéniteur des érythrocytes mégacaryocyte. Le progéniteur de monocytes granulocytes produit les lignées de granulocytes, qui produisent des neutrophiles, des basophiles et des éosinophiles, les lignées de macrophages de monocytes et les lignées de cellules dendritiques. Le progéniteur érythrocytaire mégacaryocyte produit les cellules de la lignée érythroïde et les mégacaryocytes (Szilvassy, 2003).

Au fur et à mesure que les cellules souches mûrissent, elles expriment des combinaisons spécifiques de protéines de surface cellulaire qui servent de marqueurs biochimiques. Ces marqueurs biochimiques identifient le stade évolutif de la cellule sanguine, dictent les prochaines étapes de la maturation cellulaire et servent de signaux régulateurs (Devine et al., 2010), ils sont appelées les clusters de différenciation (CD) présentes à la surface des cellules, et chaque molécule de surface unique se voit attribuer un numéro différent. Cette expression de surface d'une molécule CD particulière est utile pour la caractérisation des phénotypes cellulaires, et l'identification d'une lignée de différenciation particulière (Actor, 2019).

La régulation se fait au niveau du microenvironnement structuré (stroma), via des interactions cellule-cellule et via la génération d'hormones et de cytokines spécifiques : érythropoïétine, interleukine 3, facteur de stimulation des colonies granulocytes-monocytes (GM-CSF), le facteur de stimulation des colonies de macrophages (M-CSF), le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF), l'interleukine 5, l'interleukine 4 et bien d'autres facteurs (Smith, 1990).

II. Cellules souches hématopoïétiques (CSH)

II.1. Origine des CSH

Les CSH sont les rares cellules multipotentes qui résident dans la MO et sont responsable de la production à vie de tous les types de cellules sanguines matures (Pritchard et al., 2021).

Les CSH émergent durant la vie embryonnaire à partir du mésoderme puis transitent par plusieurs sites hématopoïétiques. Elles se trouvent initialement dans la région aorte-gonade-mésonephros et ensuite le foie fœtal (Barriga et al., 2012) avant de coloniser la MO avant la naissance (Boisset and Robin, 2011).

II.2. Caractéristiques des CSH et niche hématopoïétique

Les CSH ont la capacité de s'autorenouveler, ce qui permet de maintenir constant leur nombre durant toute la vie d'un individu (**figure 3**). Elles donnent naissance à toutes les cellules hématopoïétiques matures circulantes qui définit le caractère de totipotence, via la production de progéniteurs qui se différencient à leur tour en cellules des lignées myéloïdes et lymphoïdes (Chambers et al., 2008). Les progéniteurs, contrairement aux CSH, ne s'autorenouvellent pas. Les CSH sont donc à l'origine de la fabrication continue et régulée des cellules sanguines indispensables à la vie (**figure 4**) (Boisset and Robin, 2011).

De nombreuses études ont démontré que les CSH subissent des changements importants de fonction et de phénotype avec l'âge (Nguyen et al., 2016).

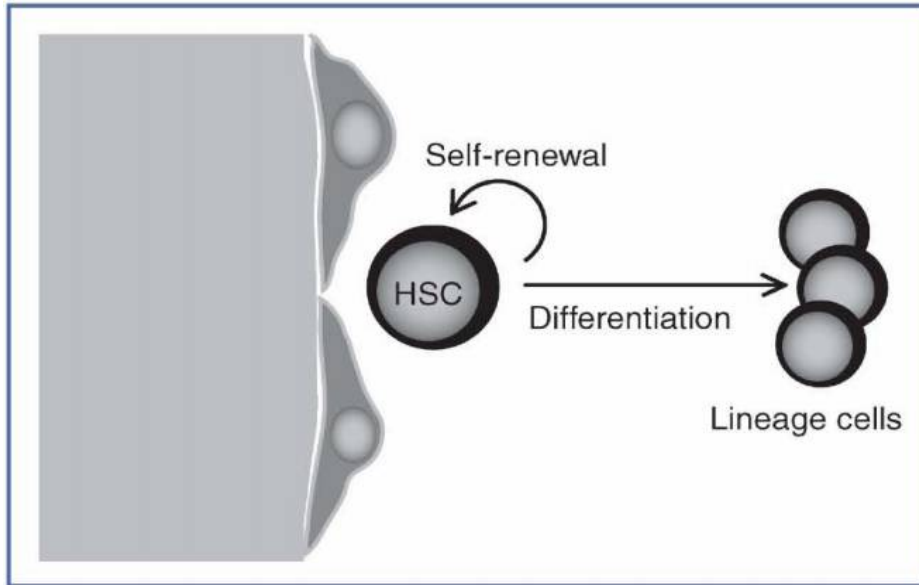


Figure 3 : Auto renouvellement des CSH (Chambers et al., 2008).

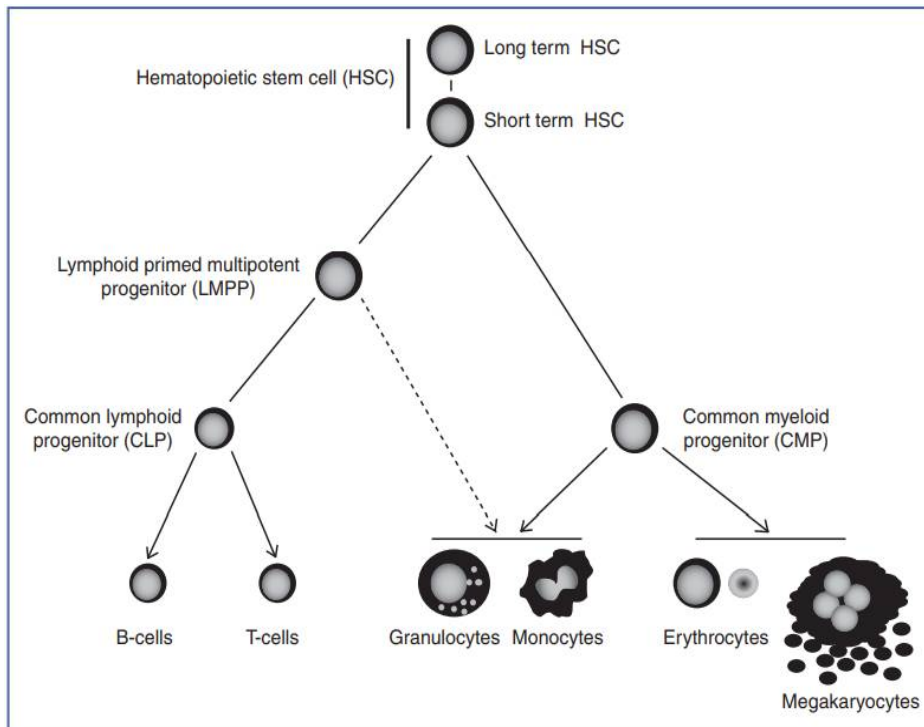


Figure 4 : Différenciation des CSH (Chambers et al., 2008).

Les CSH se développent en association étroite avec un réseau multifonctionnel de cellules environnantes et de matrice extracellulaire à l'intérieur de la MO ce qui fournit un microenvironnement favorable à leur survie, l'auto-renouvellement, prolifération et différenciation (Stik et al., 2017). C'est ce qu'on appelle une niche hématopoïétique.

La niche est un écosystème très complexe, implique plusieurs types de cellules, notamment les ostéoblastes, les ostéoclastes, les cellules souches mésenchymateuses, les adipocytes et les cellules neuronales permettant de supporter la fonction des CSH en particulier la survie, tout en maintenant à long terme le pool des CSH (Jagannathan-Bogdan and Zon, 2013) (Boulais and Frenette, 2015).

Les CSH quiescentes sont localisées dans la zone endo-osseuse fermée aux cellules de la muqueuse ostéoblastique. Ces cellules ainsi que les cellules endothéliales, ostéoblastiques, ostéoclastes et CAR (CXC chemokine ligand 12 abundant reticular) constituent la niche ostéoblastique. Alors que les CSH actives sont situées dans la région médullaire centrale, stimulées par les cellules endothéliales, mégacaryocytes et CAR, dépourvues de cellules ostéoblastiques et formant la niche vasculaire (**figure 5**) (Suárez-Álvarez et al., 2012).

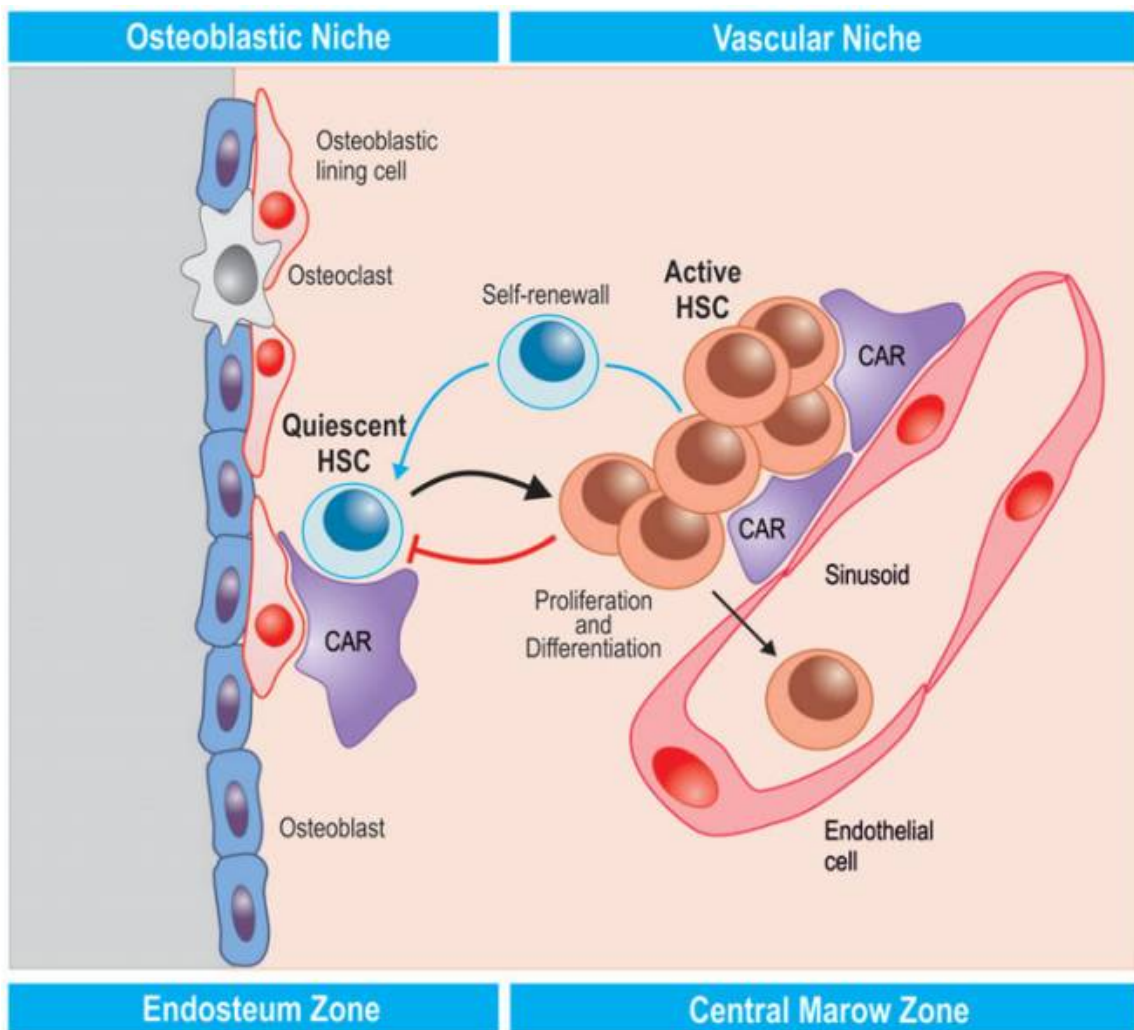


Figure 5 : Niche de cellules souches hématopoïétiques (Suárez-Álvarez et al., 2012).

II.3. Marqueur et numération des CSH

Les cellules souches hématopoïétiques sont définies par le marqueur CD34+ (Kawahara and Shiozawa, 2015). C'est une glycoprotéine transmembranaire exprimée sur des cellules souches hématopoïétiques humaines et des progéniteurs engagés dans la MO. elle est apparue comme un marqueur phénotypique de choix permettant d'identifier de manière certaine les CSH dotées de propriétés de reconstitution de l'hématopoïèse à long terme (**figure 6**) (Bijou et al., 2011).

Le marqueur CD34+ est associé à la sélection et l'enrichissement des CSH pour les greffes de la MO (Sidney et al., 2014). Ce marqueur est identifié par cytométrie en flux (CMF).

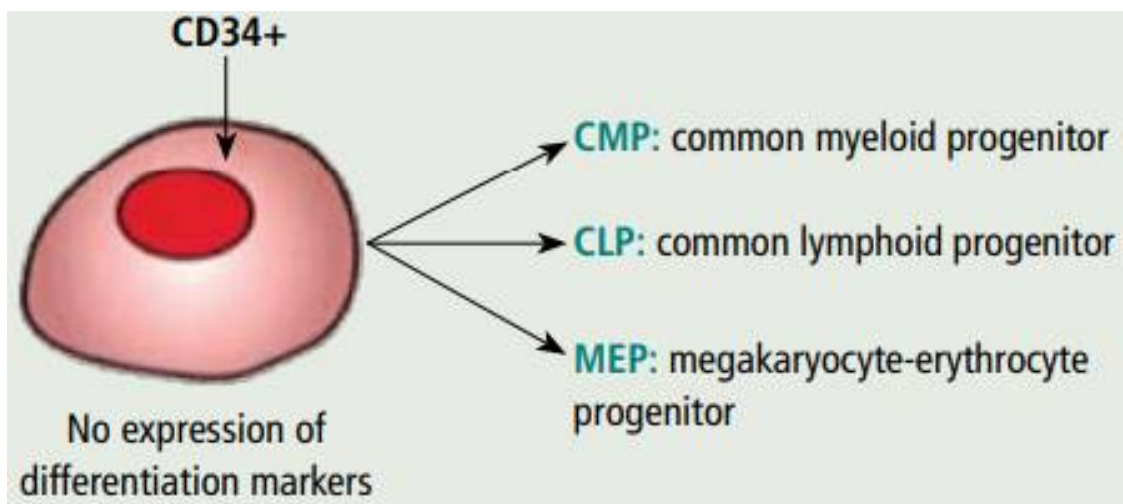


Figure 6 : CD34+ marqueur phénotypique des cellules souches hématopoïétiques (Devine et al., 2010).

La directive de l'International Society of Hematotherapy and Graft Engineering (ISHAGE) pour le dénombrement des cellules CD34⁺ est le protocole standardisé le plus largement utilisé. Ce protocole est basé sur la méthode « lyse sans lavage » (Murugesan et al., 2019).

Il n'y a pas d'étape de centrifugation qui pourrait entraîner la perte sélective des populations cellulaires lors de la préparation des échantillons (Naithani et al., 2017). La quantification du nombre absolu de cellules CD34⁺ circulantes dans le sang total nécessite l'utilisation des anticorps monoclonaux : anti-CD34 et anti-CD45 couplés à des fluorochromes pour identifier les CSH. Par ailleurs un 3ème fluorochrome, le 7-aminoactinomycine D (7-AAD) est utilisé pour juger la viabilité des CSH. La valeur absolue du nombre des CSH CD34⁺ peut être calculée par double plateforme (DP) ou simple plateforme (SP). La numération des CSH-CD34⁺ en DP utilise des compteurs hématologiques pour quantifier les leucocytes et la cytométrie pour mesurer le pourcentage de cellules exprimant le CD34. La numération des CSH-CD34⁺ en SP utilise uniquement la CMF et elle consiste à utiliser de billes comptage fluorescentes avec une concentration connue. Ces billes sont ajoutées volume à volume par rapport à l'échantillon testé. La valeur absolue (cellule / μ l) est calculée selon la formule suivante :

- Nombre de CD34/ μ l = ((%CD34 Tube1 + %CD34 Tube2) / 2 * nombre de leucocytes/ μ l * facteur de dilution.

Le nombre absolu de cellules CD34⁺ par kilogramme de poids corporel est le paramètre actuellement utilisé pour quantifier le potentiel de prise des greffes, obtenu en multipliant le nombre absolu de cellules CD34⁺ par le volume du greffon et en divisant ce produit par le poids corporel du receveur (Huber et al., 1998) :

- Nombre de CD34/kg = Nombre CD34/ μ l * volume de la poche (μ l) / poids du patient (kg) = CD34.10⁶/kg.

III. Autogreffe de CSH

III.1. Préparation clinique à l'autogreffe

La préparation du patient à la greffe nécessite un conditionnement. Le conditionnement est le traitement administré dans les jours qui précèdent l'autogreffe et qui prépare l'organisme du patient à accueillir le greffon (Valteau-Couanet and Dalle, 2017), permettant d'atteindre deux objectifs : ablater la tumeur et réaliser une immunosuppression adéquate permettant une greffe saine des CSH (Rowley et al., 2013). Deux stratégies de conditionnement sont connues : la mobilisation de CSH par les facteurs de croissance et par chimiothérapie combinée aux facteurs de croissance.

III.2. Mobilisation et 'homing' des CSH

III.2.1. Mécanisme

Sous hématopoïèse à l'état d'équilibre, le nombre de cellules progénitrices est faible en circulation (Reddy, 2005), cependant le pool de CS circulantes peut être augmenté de façon significative par une stimulation précédant la procédure de prélèvement des CSH, en pratique obtenue par l'administration d'un facteur de croissance hématopoïétique, le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (GCSF), le plus souvent administré au décours d'une chimiothérapie aplasante ou seul à double dose ('steady state') (Lissandre et al., 2007).

Ce recrutement de CSH de la MO vers le sang périphérique est appelé la mobilisation de CSH (Nervi et al., 2006), et grâce à leurs caractéristiques, les CSH sont capables de s'orienter vers la cavité de la MO et de régénérer une gamme complète de lignées cellulaires hématopoïétiques. C'est le 'homing' des CSH (Nervi et al., 2006).

La relation entre les CSH et leurs niches est très dynamique et peut donc favoriser une augmentation rapide de la production de cellules hématopoïétiques en fonction des besoins physiologiques (Suárez-Álvarez et al., 2012).

La régulation négative (Downregulation) des molécules d'adhésion et des récepteurs de chimiokine sur les CSH entraîne la mobilisation de ces cellules vers le sang. Les CSH qui expriment la chimiokine CXCR4 sont chimioattrés vers la niche endostée SDF-1 (**Figure 7**).

Ainsi il a été démontré que plusieurs cytokines et de facteurs de croissance induisent la mobilisation des CSH de la MO vers la circulation sanguine périphérique (Chambers et al., 2008).

Mobilisation et homing sont des images miroir, des processus opposés impliquant les mêmes molécules mais dans des directions opposées (Chambers et al., 2008).

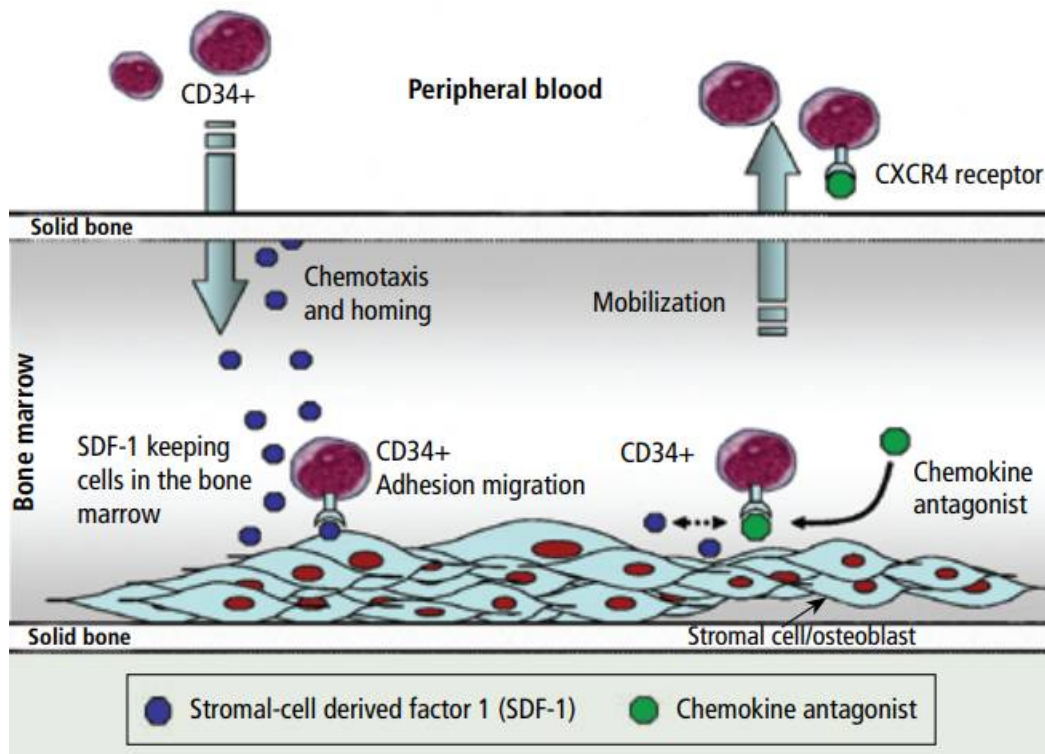


Figure 7 : Microenvironnement de la moelle osseuse (Devine et al., 2010).

La mobilisation se termine lorsqu'une augmentation des CSH circulantes donne vraisemblablement une rétroaction à la niche de la MO pour signaler un arrêt à la promotion induite par la chimiothérapie de l'auto-réplication des CSH (Damon and Damon, 2009). Cette réponse physiologique exubérante aux lésions de la MO provoque la mobilisation des CSH dans le sang périphérique, qui sont prêtes et disponibles pour la collecte (Damon and Damon, 2009).

III.2.2. Protocoles de Mobilisation

Les protocoles de mobilisation sont basés sur l'utilisation de la chimiothérapie ou les facteurs de croissance ou une association des deux.

L'administration d'une chimiothérapie myélosuppressive, permet une prolifération à la fois des CSH et des cellules progénitrices dans la MO, entraînant la migration de certaines de ces cellules dans la circulation (Ng-Cashin and Shea, 2003).

L'utilisation de la chimiothérapie pour mobiliser les CSH ne s'applique qu'aux donneurs autologues, c'est-à-dire ceux présentant une tumeur maligne sous-jacente nécessitant un traitement à haute dose et une restauration hématopoïétique autologue (Damon and Damon, 2009).

Plusieurs cytokines hématopoïétiques exogènes capables de mobiliser des cellules progénitrices hématopoïétiques en circulation sont disponibles. Le G-CSF et GM-CSF sont les deux cytokines approuvées par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis, et les plus couramment utilisés pour la mobilisation. Les autres cytokines étudiées incluent thrombopoïétine, FLT 3 Ligand, Stem Cell Factor et Interleukin-8.

Le G-CSF et le GM-CSF facilitent des collections adéquates de CSH pour une utilisation dans la GCSH autologue chez la majorité des patients atteints de différents types de maladies malignes. Par ailleurs, le G-CSF seul en tant qu'agent de mobilisation produit de meilleures collections de CSH CD34+ que le GM-CSF seul (Kessinger and Sharp, 2003).

Il a été démontré que l'utilisation d'une chimiothérapie myélosuppressive en association avec un facteur de croissance pour la mobilisation entraîne une augmentation en CSH CD34+ dans la circulation par rapport aux facteurs de croissance seules. D'autres avantages de la combinaison de chimiothérapie et de facteurs de croissance peuvent être un nombre réduit de procédures de cytophérèse et une prise de greffe plus rapide liée à un nombre plus élevé de cellules CD34+ collectées (Devine et al., 2010). L'un des inconvénients de cette stratégie de mobilisation est que le patient est exposé aux effets secondaires et toxicités associés à l'agent chimiothérapeutique.

Plusieurs autres facteurs peuvent également avoir un effet sur le degré de mobilisation. Ceux-ci incluent le type de facteur de croissance utilisé, le type de schéma de chimiothérapie utilisé, le prétraitement et le nombre de rechutes (Reddy, 2005). Les échecs de mobilisation peuvent être dus à plusieurs raisons, principalement dus à la pathologie elle-même mais surtout à l'importance cumulée des traitements reçus par le malade avant le cycle de mobilisation (Lissandre et al., 2007). La remobilisation s'effectue donc chez les patients qui n'amassent pas un nombre suffisant de cellules pour la transplantation lors de la première tentative de mobilisation (Kessinger and Sharp, 2003).

III.3. Cytaphérèse et recueil des CSH

La cytaphérèse est une procédure qui permet la collecte de CSH après avoir été mobilisées de la MO vers le sang périphérique (Baldomero et al., 2011). La cytaphérèse, réalisée sur des séparateurs de cellules dont le rendement dépend du volume de sang traité, est initiée dès qu'un nombre suffisant des cellules souches circulantes est atteint. Ce seuil est actuellement défini par un nombre de cellules CD34+ circulantes d'au moins 20 CD34+/ μ l (Lemos et al., 2018). La dose acceptable de cellules souches hématopoïétiques (CSH) pour la transplantation est généralement basée sur le nombre de cellules CD34 + déterminé avant la cryoconservation (Reich-Slotky et al., 2008), et ce nombre de CD34+ injectées influence la cinétique de la reconstitution hématopoïétique (Lissandre et al., 2007).

Le nombre de cellules CD34+ déterminé dans le sang périphérique est un excellent indicateur pour déterminer le début de la collecte des CSH périphériques par la cytaphérèse (Lemos et al., 2018). La collecte des CSH est programmée en fonction de la concentration cellulaire maximale de CD34+, environ 4 à 5 jours de mobilisation (Lemos et al., 2018).

Un nombre de CSH CD34+ $\geq 10/\mu$ l dans le sang périphérique prédit une collecte de $2 \cdot 10^6/\text{kg}$ ou plus par une seule cytaphérèse chez 61% des patients (Hill et al., 2007).

La qualité des produits de CS du sang périphérique pour la greffe autologue est évaluée par la numération de CSH CD34+ au moment de la collecte (D'Rozario et al., 2014). Une dose de cellules CD34+ supérieure à $2 \times 10^6/\text{kg}$ de poids corporel du receveur est considérée comme adéquate pour une greffe hématopoïétique (D'Rozario et al., 2014).

III.4. Cryoconservation des CSH

La cryoconservation est l'application de basses températures pour préserver l'intégrité structurelle et fonctionnelle des cellules et des tissus (Hunt, 2017).

Les CSH, une fois collectés, ne sont viables que de 6 à 12 heures, avec un maximum de 24 heures, ce qui limite leur portée géographique (Hornberger et al., 2019). Leur congélation a pour but de prolonger considérablement leur durée de conservation et permet des contrôles et des tests de qualité plus rigoureux, ce qui améliore la sécurité de la thérapie des CSH (Hornberger et al., 2019), et permet donc un traitement plus efficace des patients.

Les facteurs qui ont un impact sur le succès de la cryoconservation des CSH comprennent la vitesse de congélation, les conditions de stockage avant congélation, la concentration des cellules et la température de stockage (Hornberger et al., 2019).

La cryoconservation des CSH repose essentiellement sur la méthode de descente contrôlée en température et la conservation en azote liquide ou gazeux. En permettant la conservation des greffons pendant plusieurs dizaines d'années (Lissandre et al., 2007). Elle implique l'utilisation de solution cryoprotectrice.

III.4.1. Cryoprotecteurs

Les solutions de cryoconservation appelés cryoprotecteurs (CP) sont des solutions spécialisées qui contiennent des additifs, qui aident les cellules à survivre aux stress de la congélation et de la décongélation (Hornberger et al., 2019). Ils protègent les cellules des conséquences d'un refroidissement lent, leur permettant d'être refroidies à des vitesses de refroidissement qui évitent les effets mortels de la glace intracellulaire (Gao and Critser, 2000).

Des mécanismes de protection spécifiques supplémentaires conférés par les CP dépendront de leur capacité à se diffuser à travers la membrane cellulaire externe. En augmentant la concentration osmotique intracellulaire, les agents de protection perméables réduiront la probabilité de formation de glace à l'intérieur des cellules, tout en limitant l'étendue de la déshydratation des cellules et des organites (Meneghel et al., 2020) ce qui permet de préserver les cellules saine et fonctionnelle.

Diméthylsulfoxyde (DMSO) est le cryoprotecteur le plus couramment utilisé pour les CSH (Shu et al., 2014). C'est une petite molécule amphiphile avec un groupe sulfoxyde hydrophile et deux groupes méthyle hydrophobes (figure 8) (Gurtovenko and Anwar, 2007).

L'action cryoprotectrice du DMSO résulte d'interactions moléculaires spécifiques (Hornberger et al., 2019).

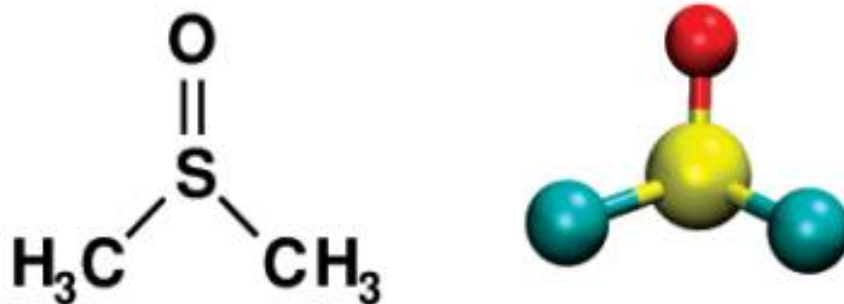


Figure 8 : Structure chimique de la molécule de DMSO et sa représentation d'atomes unis (Gurtovenko and Anwar, 2007).

Le DMSO est une substance hautement soluble dans les lipides et perméable à la membrane cellulaire (Vasovic et al., 2018), permet à la fois d'inhiber la formation de glace intracellulaire et de prévenir les lésions cellulaires déclenchées par une déshydratation sévère, car la glace extracellulaire provoque le retrait de l'eau du milieu intracellulaire (Shu et al., 2014).

Le DMSO augmenterait la perméabilité cellulaire en affectant la dynamique membranaire d'une manière dépendante de la concentration, il est capable de diminuer l'épaisseur de la membrane (2,5 à 7,5 mol %), d'induire la formation de pores d'eau transitoires (10 à 20 mol %) ou de détruire la structure bicouche de membranes (25 à 100 mol %) (**figure 9**) (Gurtovenko and Anwar, 2007). Aux concentrations couramment utilisées (10%), la formation de pores peut être avantageuse car l'eau intracellulaire peut être plus facilement remplacée par des cryoprotecteurs qui favorisent la vitrification. À des

concentrations plus élevées et toxiques (40 %), les bicouches lipidiques commencent à se désintégrer. Il est alors évident que le choix d'une concentration de cryoprotecteur appropriée est critique pour l'intégrité structurelle, et donc la viabilité des cellules après congélation (Whaley et al., 2021).

Bien que le DMSO pourrait affecter la fonction des CSH mais il semble probable que l'exposition à court terme et les températures froides minimisent tout impact néfaste (Shu et al., 2014).

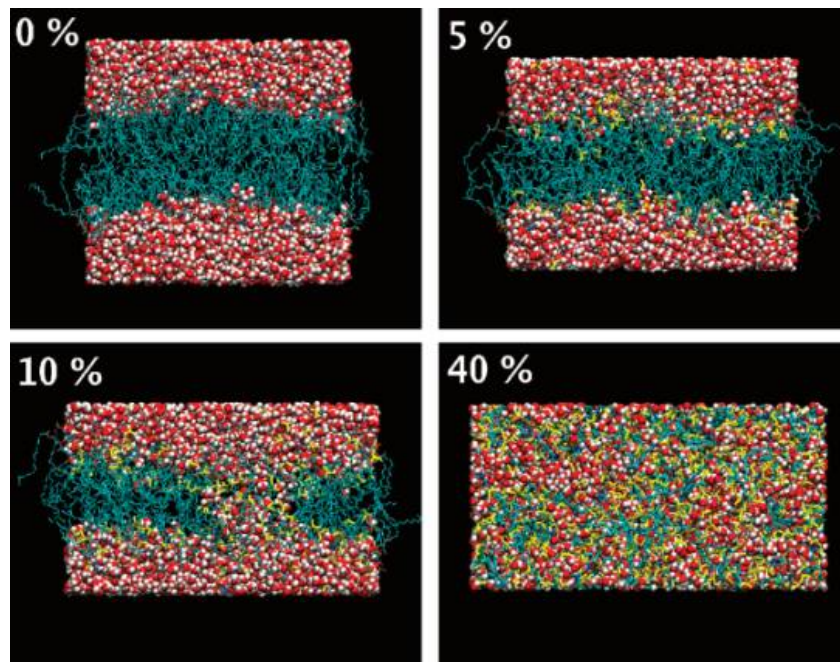


Figure 9 : Formation de pores dans le système bicouche avec 0%, 5%, 10%, 40% en moles de DMSO. (Gurtovenko and Anwar, 2007).

III.4.2. Congélation à vitesse progressive et congélation définitive

La congélation à vitesse contrôlée et le stockage dans de l'azote vapeur ou liquide sont une technique standard de cryoconservation des CSH (Hornberger et al., 2019).

Le refroidissement à vitesse contrôlée (RVC) est réalisé par des dispositifs qui prennent en charge l'apport d'azote liquide pour obtenir un refroidissement actif à vitesse contrôlée, ou par des méthodes passives utilisant souvent des bains d'alcool isolés placés dans un congélateur à -80°C (Karimi-Busheri and Weinfeld, 2016). Les dispositifs de RVC actifs suivent un programme préétabli pour obtenir le profil de refroidissement souhaité (figure 10) (Karimi-Busheri and Weinfeld, 2016).

Les dispositifs de RVC passifs contiennent le greffon entouré, mais isolé dans un bain d'alcool ou un matériau d'isolation thermique, et lorsqu'il est placé dans un congélateur (-80°C), une vitesse curviligne (par exemple, environ $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ pour un type cellulaire donné) est atteinte dans les greffons. Dans le processus de RVC passif, l'ensemencement 'seeding' est souvent réalisé par agitation mécanique pour créer un événement de nucléation à un moment prescrit au cours de la période de refroidissement. Après le point de nucléation, le refroidissement de greffon se poursuit à une vitesse contrôlée jusqu'à ce qu'une température définie par l'utilisateur soit atteinte, généralement de -40 à -80°C (Karimi-Busheri and Weinfeld, 2016).

Une fois cette température cible atteinte, les greffons sont généralement transférés dans un environnement à très basse température pour une congélation définitive. Celle-ci peut être faite soit dans de l'azote liquide, une phase vapeur d'azote liquide ou un stockage mécanique inférieur à -135°C . Certaines banques de CSH choisissent plutôt de conserver les greffons à -80°C (Karimi-Busheri and Weinfeld, 2016)

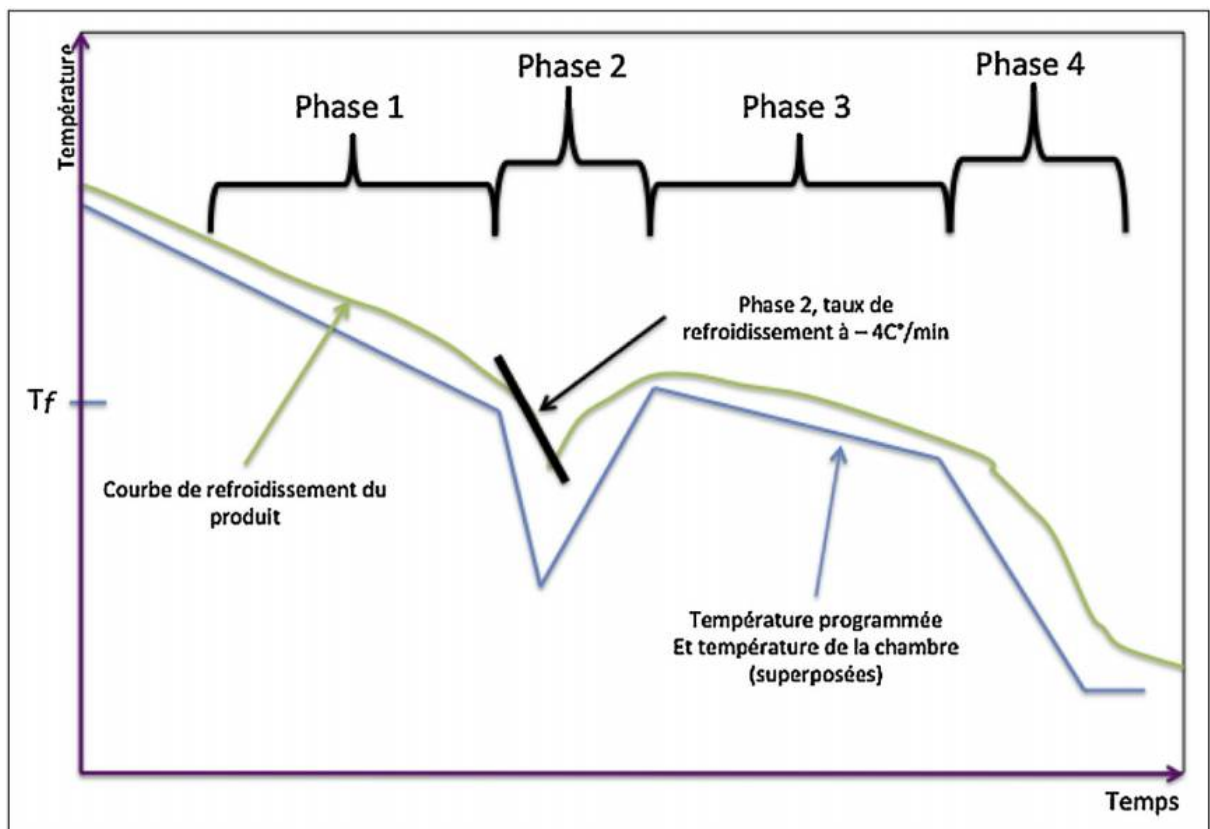


Figure 10 : Courbe de descente de la température contrôlée (Boulangier et al., 2016).

III.5. Décongélation

La plupart des méthodes de décongélation recommandées nécessitent le transfert immédiat de greffon congelé du stockage cryogénique vers un bain-marie à 39°C (Baust et al., 2017).

Il existe deux méthodes courantes de décongélation et de traitement :

- La décongélation avec lavage : La récupération des greffons du stockage nécessite une décongélation rapide souvent réalisée en plaçant le greffon dans un bain-marie agité à 37-40 °C ou un système de décongélation à sec jusqu'à ce que la majeure partie de la glace fonde. Une fois la glace dispersée, le lavage du cryoconservateur est nécessaire en une seule étape ou en procédé de dilution par étapes, en cas de concentrations élevées de cryoprotecteur (Karimi-Busheri and Weinfeld, 2016).

Le lavage du greffon permet la réduction de la toxicité, puisque le degré de toxicité du DMSO est proportionnel à sa quantité contenue dans le greffon final (Berz et al., 2007).

- La décongélation directe sans lavage : Le produit cryoconservé est généralement livré dans un conteneur validé au site de perfusion, placé dans un suremballage supplémentaire et immergé dans un bain-marie à 37 °C pendant 3 à 6 minutes ou jusqu'à ce que les cristaux de glace se dissolvent. Ce procédé réduit la perte de cellules, surtout si le sac vide est rincé avec une solution saline supplémentaire (Vasovic et al., 2018).

La quantification des cellules CD34⁺ viables après décongélation représente mieux la composition réelle du greffon et peut être un prédicteur plus précis de la prise de greffe hématopoïétique que le nombre de cellules CD34⁺ avant congélation (Lee et al., 2008).

Les méthodes de décongélation des CSH cryoconservés pour la transplantation devraient minimiser la perte de cellules, maintenir la viabilité des cellules et empêcher l'introduction de contamination microbienne (Vasovic et al., 2018).

CHAPITRE 2 :

Matériel et Méthodes

I. Cadre de l'étude

Ce travail a concerné une étude rétrospective des dossiers colligés entre 2015 à 2021 à l'unité BC au STSH à l'hôpital d'enfants du centre hospitalier Ibn Sina de Rabat. Il s'est intéressé aux patients ayant eu des greffons cryoconservés, puis décongelés avec lavage dans le cadre de l'autogreffe des CSH. Ces patients ont été adressés par les services d'hématologie de l'Hôpital Militaire (HMV), des cliniques privées, des centres hospitaliers de Rabat et Casablanca (CHU), et l'Hôpital d'enfant de Rabat (HER). La collecte de données a été faite à partir de dossiers médicaux de la BC.

Nous avons retenu pour échantillon d'étude les greffons de la 1^{ère} cytophérèse après la 1^{ère} mobilisation, dans le but de faire une analyse de l'impact des différents paramètres pouvant avoir influencé la perte en CD34+. Nous avons exclu les greffons issus d'une 2^{ème} cytophérèse après une 1^{ère} mobilisation et ceux d'une 2^{ème} mobilisation.

Les données ont été saisies sur une fiche d'exploitation Excel qui comprend les paramètres suivants :

- Age et Sexe.
- Pathologie.
- Traitement de mobilisation.
- CNT (cellules nucléées totales) sur le produit cellulaire congelé (PC) ($\times 10^3/\mu\text{l}$).
- Viabilité cellulaire (VC) et nombre de CD34+ sur la poche de cytophérèse (cellules/ μl et $10^6/\text{kg}$).
- Délai entre la fin de cytophérèse et le début de préparation à la congélation (min).
- CNT sur le produit cellulaire décongelé (PD) ($\times 10^3/\mu\text{l}$).
- VC sur le PD (%).
- Nombre de CD34+ sur le PD (cellules/ μl et $10^6/\text{kg}$).
- Temps de cryoconservation (jours).

L'analyse des différents paramètres a été faite par rapport à la population totale étudiée qui est constituée de 50 patients. Un rendement en CD34+ est considéré correct s'il est supérieur à 70 % après le processus de cryoconservation et décongélation, ce qui correspond à une perte inférieure à 30% (Boulanger et al., 2016). On a donc réparti notre échantillon en deux groupes :

- Groupe 1 : ayant une perte inférieure à 30%
- Groupe 2 : ayant une perte supérieure à 30%

II. Protocoles de traitement des greffons de CSH à la banque de cellules du STSH

Le traitement des CSH se fait dans des espaces adaptés appelés salles blanches, dont les paramètres tels que la pression, la température, et l'humidité sont maintenus selon des normes de sécurité.

II.1. Préparation avant la congélation

Avant de procéder au traitement des greffons, Une numération des CSH CD34+ sur la poche de cytophérèse est pratiquée au laboratoire de cytométrie en flux (CMF) du STSH. Le nombre des CSH CD34+ est calculé en utilisant la double plateforme, basé sur les CNT de la numération formule sanguine (NFS), en tenant compte du facteur de dilution. Les données relatives au volume de la poche de cytophérèse, nombre de cellules nucléées totales (CNT) et CD34+ sur la poche de cytophérèse sont notés dans le dossier du patient.

II.2. Préparation des cryocytes de CSH

La décision du nombre de cryocytes à préparer tient compte du nombre de CSH CD34+/Kg et des CNT/ml (**tableau 1**). Ces paramètres permettent également de décider de l'indication à faire une dilution ou bien une centrifugation. Par ailleurs, la date et l'heure de la fin de cytophérèse et celle du début de la cryoconservation sont notées sur le dossier, pour calculer le délai avant le début de la congélation.

En cas de centrifugation du greffon, une évaluation de perte cellulaire sur le surnageant est nécessaire. Si le taux de CNT est élevé, c'est-à-dire supérieur à 5% de la concentration initiale de CNT, une autre centrifugation du plasma est effectuée pour récupérer le maximum de CNT. En cas de dilution, le produit cellulaire est dilué en utilisant le voluven.

Tableau 1 : Nombre de cryocytes.

Nombre CD34+/kg	[CNT]/ml	Nombre de cryocytes
> 3.10⁶	< 3.10 ⁸	2
	> 3.10 ⁸	3,4 en fonction de la [CNT]
< 3.10⁶	< ou > 3.10 ⁸	1
> 6.10⁶	< 3.10 ⁸	4
	> 3.10 ⁸	5,6 en fonction de la [CNT]
2.10⁶ << 6.10⁶	< 3.10 ⁸	2
	> 3.10 ⁸	3,4 en fonction de la [CNT]
< 2.10⁶	< ou > 3.10 ⁸	1
> 9.10⁶	< 3.10 ⁸	6
	> 3.10 ⁸	7,8 en fonction de la [CNT]
< 9.10⁶	< 3.10 ⁸	2
	> 3.10 ⁸	

La préparation de la solution de cryoconservation consiste à diluer le DMSO à 20% dans du voluven. Celle-ci est ajoutée ensuite volume à volume au produit cellulaire ainsi la dilution finale du DMSO est à 10%. Le volume d'un cryocyte ne doit pas dépasser 150ml. Des prélèvements sont effectués sur chaque cryocyte pour l'examen bactériologique et éventuellement une enquête médico-légale. Ils sont conservés dans un congélateur à -80°C.

II.3. Congélation en azote

La congélation passe d'abord par une étape de refroidissement lent. Pour cela, les cryocytes sont déposés dans un appareil de congélation progressive jusqu'à atteindre une température cible de -120°C. Une courbe de descente de température est générée, pour vérifier que la descente en température est faite correctement. Ensuite ils sont placés dans la cuve d'azote pour une conservation en azote vapeur à une température de -180°. La date et l'heure de la mise en place dans l'azote est noté dans le dossier.

II.4. Décongélation avec lavage

Le jour prévu pour la greffe, la décongélation est effectuée après transfert immédiat du greffon congelé dans un bain-marie à 39°C. Cette étape doit s'effectuer le plus rapidement possible.

Après l'ajout de la solution de lavage Voluven (2 fois le volume cryocyte), une centrifugation est effectuée permettant d'éliminer le maximum de surnageant contenant la solution de cryoconservation. Une reconstitution du greffon lavé avec le sérum physiologique (NaCl) est effectuée pour restituer le volume initial de la poche de cytophèrese. Un prélèvement est effectué sur le produit final pour la numération des CSH CD34+ qui est pratiquée par le laboratoire de CMF du STSH. Le résultat est noté sur le dossier du patient et la perte en CSH est calculée. Par ailleurs Un autre prélèvement est envoyé au laboratoire de bactériologie de l'hôpital Ibn Sina.

III. Analyse statistique

La perte de nombre de CSH CD34+ a été calculée par la formule suivante :

Perte de CD34+ (%) = 100 (%) – [(Nombre de CD34+ sur le greffon décongelé (x10⁶/kg) / Nombre de CD34+ sur la poche de cytophérèse (x10⁶/kg) x 100] (%).

Tous les calculs ont été réalisés à l'aide du logiciel d'analyse statistique SPSS. La différence entre les groupes 1 et 2 pour les variables qualitatives (Sexe, Pathologie, Traitement mobilisateur) a été évaluée par Khi-deux. Pour les variables quantitatives (Age, Délai entre la fin de cytophérèse et début de préparation à la congélation, Temps de cryoconservation, CNT sur le PC, CNT sur le PD, VC sur le PC, et VC sur le PD), la différence a été évaluée entre les groupes 1 et 2 par U-Mann-Whitney. Ces différences sont considérées significatives, si la valeur p est inférieure à 0,05.

CHAPITRE 3 : Résultats et Discussion

I. Résultats

I.1. Description de l'échantillon étudié

Chez les 50 patients étudiés, la valeur médiane de perte est de 29%, avec une valeur minimale de 2% et maximale de 71% (**figure 11**).

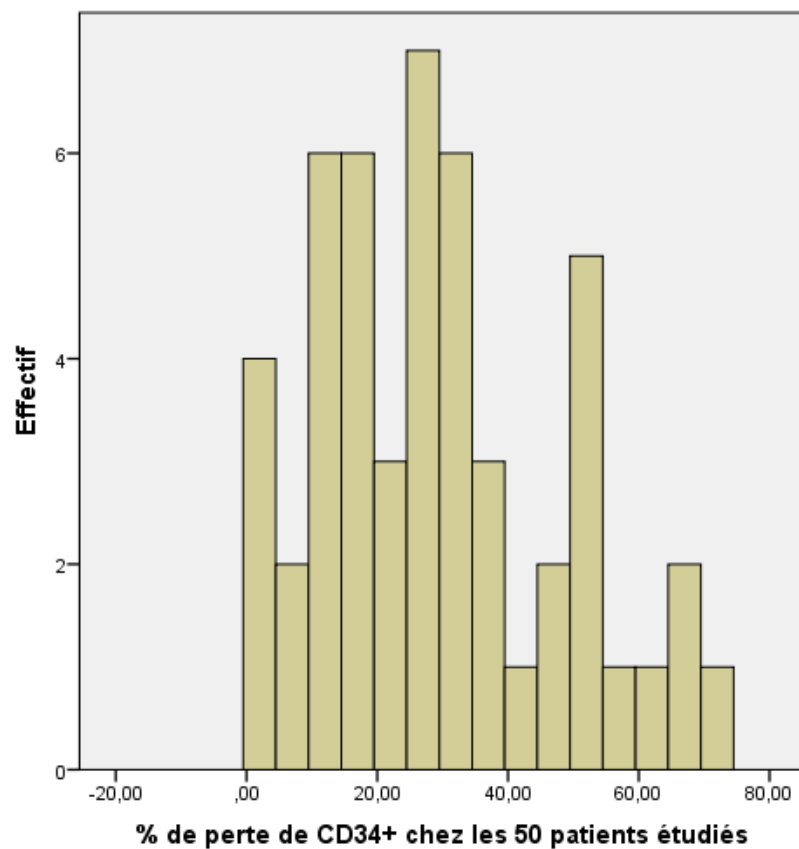


Figure 11 : Répartition de l'échantillon étudié selon la perte de CD34+ (%).

Médiane = 29%, N= 50.

Au cours de la période d'étude, le nombre des hommes ayant bénéficiés d'une autogreffe est supérieur à celui des femmes, 28 hommes par rapport à 22 femmes avec un ratio H/F de 1,27.

Notre échantillon appartient à des tranches d'âges différents. Les tranches d'âge qui ont bénéficié de l'autogreffe sont représentés sur la (**figure 12**), la médiane d'âge est de 33,5 ans avec un minimum d'âge de 5ans et un maximum de 73ans.

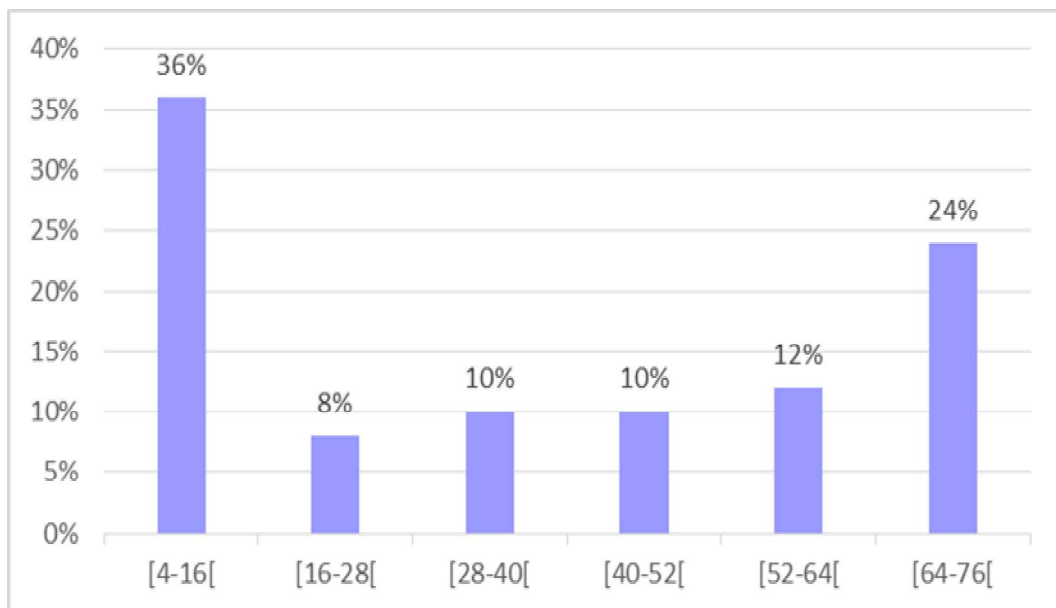


Figure 12 : Répartition de l'échantillon étudié en fonction de l'âge (ans).

L'analyse de la répartition des pathologies dans notre échantillon montre : 18 cas de neuroblastome (N), 14 cas de myélome multiple (MM), 9 cas de lymphome non hodgkinien (LNH), 7 cas de lymphome hodgkinien (LH), et un seul cas de la leucémie (L) et de la maladie de Kohler (MK) (**figure 13**).

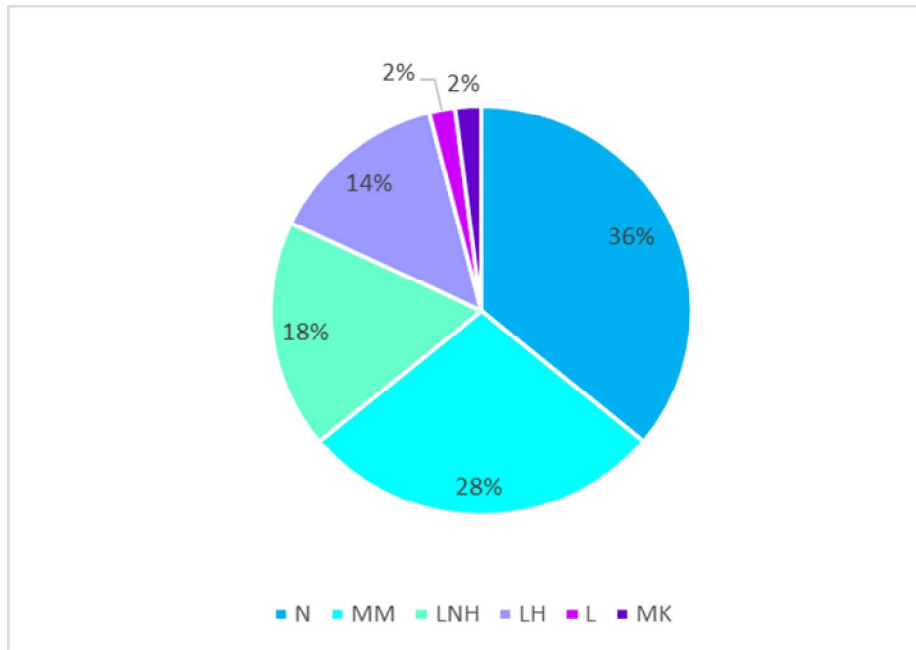


Figure 13 : Répartition de l'échantillon étudié selon les pathologies.

N : Neuroblastome, MM : Myélome Multiple, LNH : Lymphome non Hodgkinien, LH : Lymphome Hodgkinien, L : Leucémie, MK : Maladie de Kohler.

Nos résultats montrent que les 50 patients analysés ont été mobilisé par les facteurs de croissance différents ; 18 GCSF non identifié, 17 patients ont été mobilisé par la molécule de neupogen (Np), et 15 patients ont été mobilisé par Granocyte 34 (Gran 34) (**figure 14**).

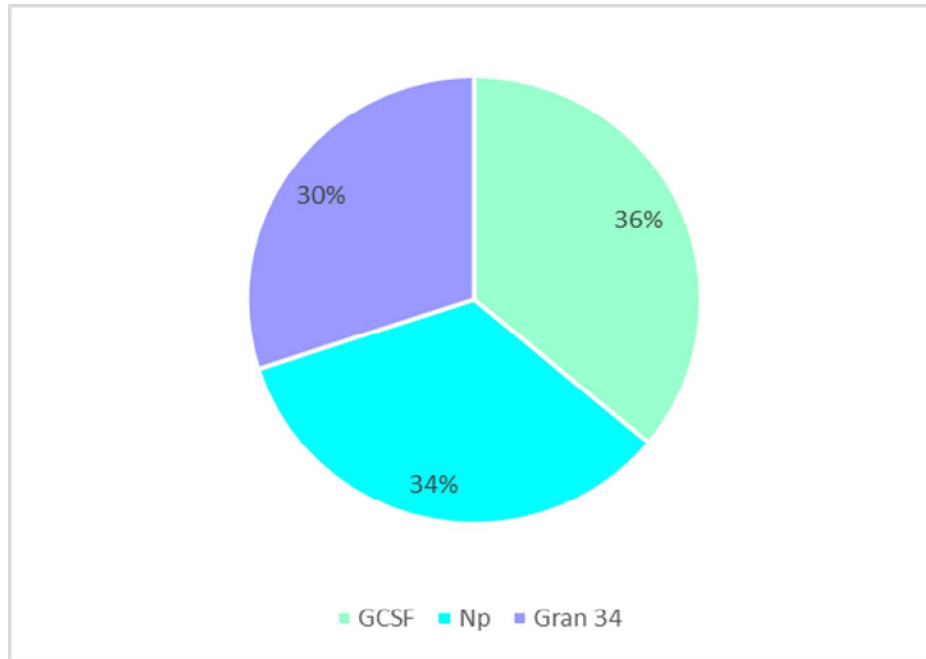


Figure 14 : Répartition de l'échantillon étudié selon les traitements mobilisateurs.

Np : Neupogen, Gran 34 : Granocyte 34.

La médiane de délai entre la fin de cytophérèse et début de préparation à la congélation est 1222min (20h 22min) ; avec une valeur min = 60min (1h) et une valeur max = 1525min (25h 25min) (**figure 15**).

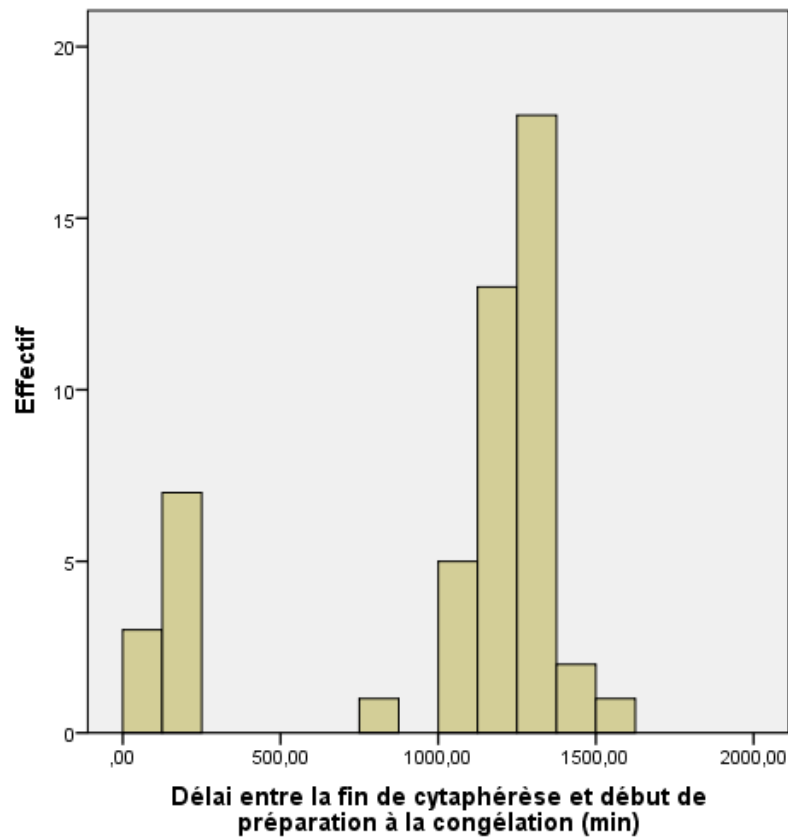


Figure 15 : Répartition de l'échantillon étudié selon le délai entre la fin de cytophérèse et début de préparation à la congélation (min).

Médiane = 1222min (20h 22min), N = 50.

Concernant la médiane du temps de cryoconservation de ces 50 greffons congelés est 59jours (1mois et 29jours) ; avec une valeur minimale = 2jours, et une valeur maximale = 1001jours (2ans 9mois et 11jours) (**figure 16**).

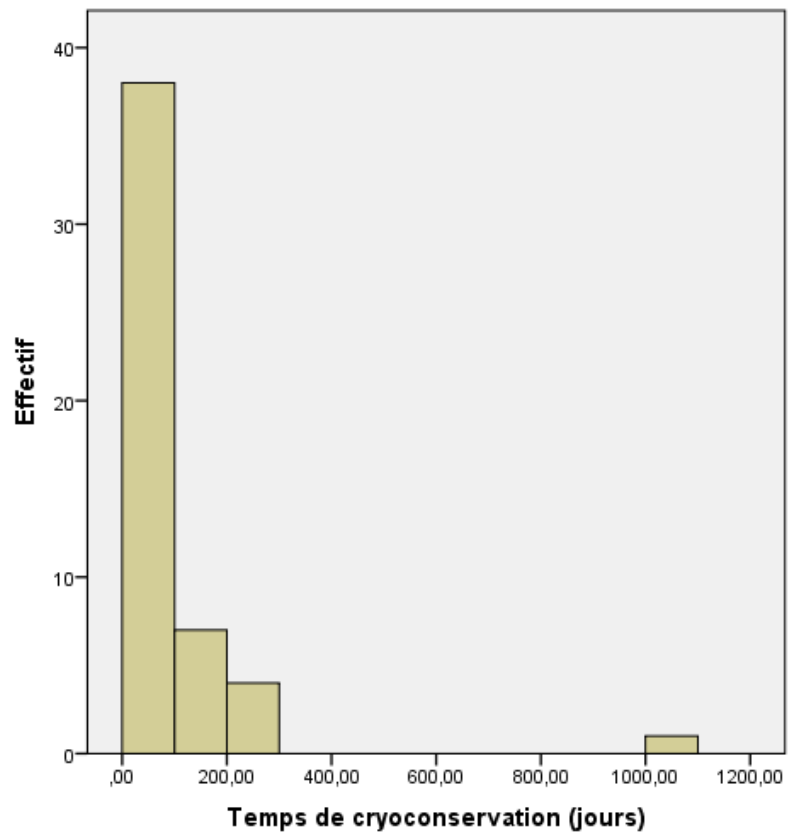


Figure 16 : Répartition de l'échantillon étudié selon le temps de cryoconservation (jours).

Médiane = 59jours (1mois et 29jours), N = 50.

La valeur médiane des CNT sur les greffons avant leur congélation est de 157,34 $\times 10^3/\mu\text{l}$ (**figure 17**). Par ailleurs la médiane de la viabilité cellulaire avant la congélation est de 98,75% (**figure 18**).

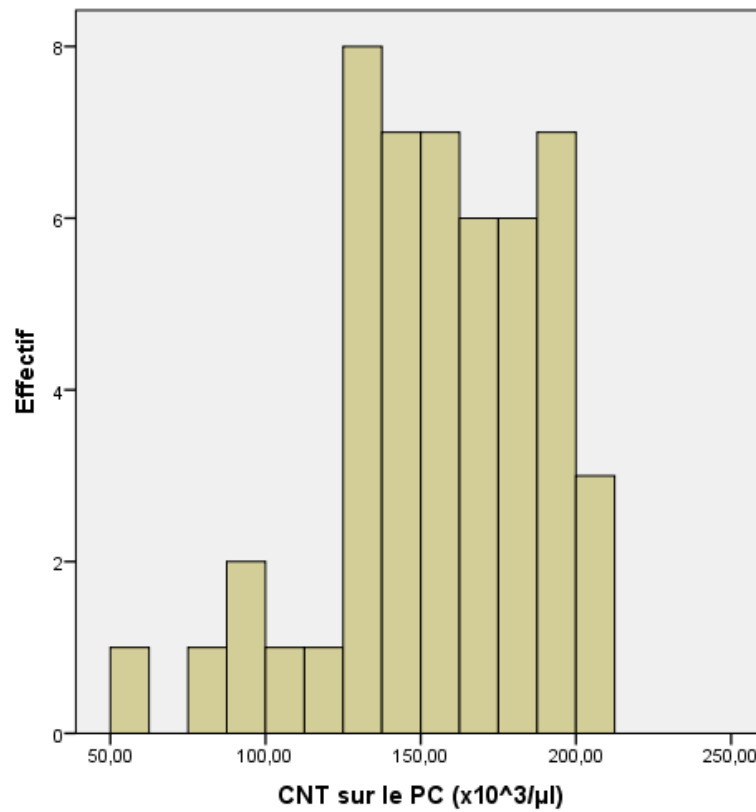


Figure 17 : Répartition de l'échantillon étudié en fonction des CNT sur le produit cellulaire avant congélation ($\times 10^3/\mu\text{l}$).

Médiane = 157,34, N = 50.

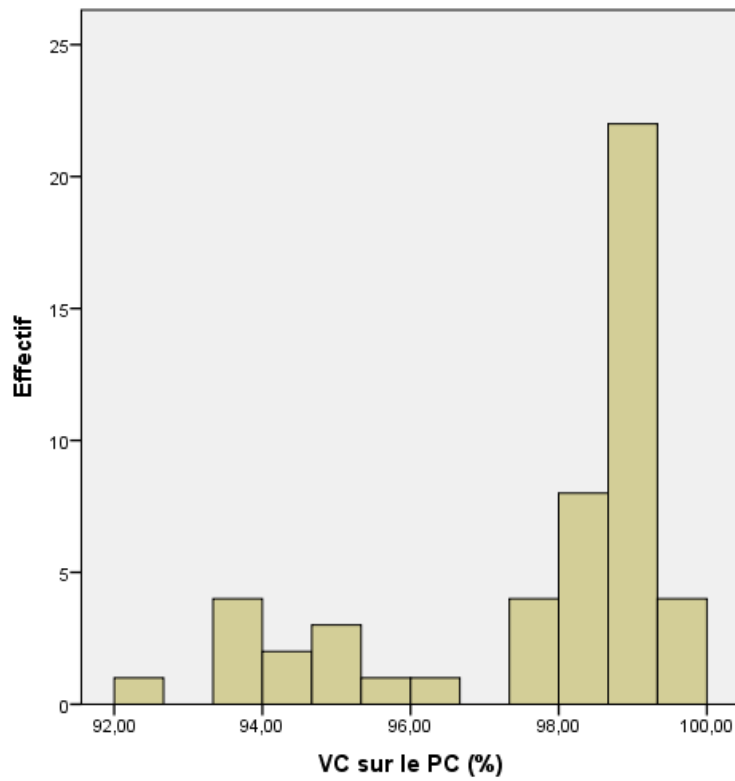


Figure 18 : Répartition de l'échantillon étudié en fonction de la viabilité cellulaire sur le produit cellulaire avant congélation (%).

Médiane = 98,75, N = 50.

I.2. Analyse comparant les groupes

Nos résultats montrent que pour 50 patients la perte a été supérieure à 30% chez 22 patients (44%), et inférieur à 30% chez 28 patients (56%). Nous nous sommes intéressés à comparer les paramètres entre ces 2 groupes : ceux liés au patient (sexe, âge, pathologie), et ceux liés à la congélation et décongélation du produit cellulaire (délai entre la fin de cytophérèse et la préparation à la congélation, temps de cryoconservation, CNT sur le PC et PD, et VC sur le PC et PD).

L'évaluation de la perte en fonction des paramètres qualitatifs liés au patient (sexe, pathologie, traitement mobilisateur) en comparant le groupe 1 et le groupe 2 n'a pas montré une différence significative (**tableau 2**). De même, aucune différence significative dans les paramètres quantitatifs évalués chez les groupes 1 et 2 n'a été notée (**tableau 3**).

Tableau 2 : Evaluation de l'impact des paramètres qualitatifs sur la perte de CD34+ chez les groupes 1 et 2 par le test Khi-2.

Groupe 1 et 2	Khi-2 de Pearson	P-value
Sexe	0,930	0,335
Pathologie	1,814	0,404
Traitement mobilisateur	1,946	0,378

Tableau 3 : Evaluation de l'impact des paramètres quantitatifs sur la perte de CD34+ chez les groupes 1 et 2 par le test U Mann-Whitney.

Groupe 1 et 2	U de Mann-Whitney	P-value
Âge	290,5	0,732
Délai entre la fin de cytophérèse et la préparation à la congélation	246,5	0,229
Temps de cryoconservation en azote	306,5	0,977
CNT sur le PC	268,5	0,440
CNT sur le PD	278,5	0,564
VC sur le PC	302,0	0,907
VC sur le PD	291,0	0,740

CNT : Cellules Nuclées Total, PC : Produit cellulaire congelé, PD : Produit cellulaire décongelé, VC : Viabilité cellulaire.

II. Discussion

Nos résultats ont objectivé une valeur médiane de perte de 29%, ce qui concorde avec le seuil normal de la perte retrouvée dans la littérature (Boulanger et al., 2016).

Comme exposé dans la partie bibliographique de ce travail, et depuis longtemps il est reconnu que le processus de cryoconservation et de décongélation joue un rôle important dans le déclin de la qualité des cellules cryoconservées. En effet, D’Rozario et al ont montré qu’une perte significative de cellules CD34+ viables serait dû au traitement , à la cryoconservation et à la décongélation (D’Rozario et al., 2014). Les facteurs soupçonnés être à l’origine d’une perte de CSH sont le type et la concentration du cryoprotecteur, la vitesse de congélation, les conditions de conservation avant congélation, la concentration des cellules nucléaires totales et la température de stockage ainsi que les procédés de décongélation (Hornberger et al., 2019) (Djuwantono et al., 2011). Dans notre étude nous n’avons pas trouvé de différence significative des facteurs étudiés qui pourraient expliquer une perte supérieure à 30%.

Depuis le début de la pratique clinique de l’autogreffe, le nombre total de cellules viables a été considéré comme un paramètre principal permettant de vérifier la récupération cellulaire après la cryoconservation et la décongélation. Les étapes de la cryoconservation ont été associées à une perte de viabilité cellulaire nucléée totale (Ivanovic, 2010).

Les résultats de Reich-Slotky et al, ont montré que la plupart des cellules qui n’ont pas survécu à la cryoconservation appartenaient à la série des granulocytes, et que la plupart des cellules CD34+ survivent à la cryoconservation, quelle que soit la viabilité des cellules nucléées après décongélation (Reich-Slotky et al., 2008). Cela montre qu’une bonne récupération en cellules CD34+ dans les greffons après la décongélation est possible et que l’évaluation d’autres paramètres est nécessaire afin d’avoir une bonne qualité des greffons.

La concentration de CNT est un paramètre important qui nécessite un examen attentif avant la congélation. Il est à noter qu’une concentration cellulaire trop élevée peut entraîner une perte cellulaire et un amas cellulaire après décongélation. Bien que, l’influence de ce paramètre n’a pas été confirmée (Félix et al., 2018).

Dans une étude de Guttridge et al. (Guttridge et al., 2014), il a été constaté que le temps de stockage avant la cryoconservation affectait de manière significative la viabilité des cellules CD34+ du sang de cordon ombilical, après la cryoconservation, suggérant qu'une pré-cryoconservation prolongée devrait être évitée. Ce résultat est cohérent avec ceux de Schwandt et al, qui a montré que la viabilité la plus élevée pour les cellules de sang de cordon était obtenue lorsque les cellules étaient cryoconservées directement après la collecte (Schwandt et al., 2017). Par ailleurs les recommandations de la société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire propose un délai idéal de 6 à 12h avec un max de 24 h. Cela démontre que le retard de cryoconservation après la collecte des cellules peut nuire à la récupération cellulaire. Dans notre étude, la comparaison du temps de stockage avant la cryoconservation entre les groupes 1 et 2 montre que ce paramètre n'a pas influencé la perte cellulaire puisque les résultats ne sont pas significatifs.

Par ailleurs, la température à laquelle les cellules sont stockées avant congélation peut également affecter le résultat de la cryoconservation, il est en effet recommandé que les cellules progénitrices hématopoïétiques soient maintenues à une température réfrigérée (+4 à 8 °C) avant congélation pour éviter des pertes cellulaires significatives (Fry et al., 2013). Tous les produits cellulaires de nos patients ont été stockés à +4°C avant congélation.

Une étude réalisée par Donmez et al, a rapporté qu'une perte de cellules CD34+ a été observée pour les greffons cryoconservés par congélation à vitesse non contrôlée et stockés à -80 °C (Donmez et al., 2014), Ce qui n'est pas le cas à l'unité BC où la congélation se fait à vitesse progressive et le stockage se fait dans des cuves d'azotes à -180°C. Cela laisse supposer que la perte en CD34+ des greffons ne serait pas en rapport avec la vitesse de la congélation progressive.

Concernant le temps de cryoconservation dans l'azote, une étude a été faite par Seo et al, dans laquelle ils ont comparé des échantillons de sang de cordon conservés pendant 1 an avec d'autres conservés pendant 2 ans. Le nombre de CNT, la viabilité cellulaire et le nombre de CD34+ n'ont montré aucune différence significative entre les cellules congelées pendant 1 an, et celles congelées pendant 2 ans (Seo et al., 2017). Ceci est concordant avec nos résultats.

Une autre étude a montré que les techniques d'élimination du DMSO à l'étape de la décongélation, basées principalement sur la centrifugation, pouvaient générer des lésions osmotiques et une agrégation aboutissant à une perte de cellules (Shu et al., 2014). Pour les 2 groupes étudiés, l'élimination du DMSO a été faite par la centrifugation.

Conclusion et Perspectives

Chez les 50 patients étudiés, la valeur médiane de perte est de 29%. 44% de nos patients ont une perte supérieure à 30%. Nos résultats n'ont pas objectivé de facteurs pouvant influencer la qualité des greffons après cryoconservation et décongélation. Néanmoins toutes les étapes de traitement et de stockage des cellules souches doivent être revues et améliorées pour minimiser la perte potentielle de cellules CD34+ pour un meilleur résultat de l'autogreffe.

L'échantillon faible était une limitation à cette étude. Par conséquent, il serait intéressant d'élargir l'échantillonnage de l'étude pour avoir des résultats plus fiables, et également inclure d'autres paramètres notamment l'analyse de la courbe de descente de température, le stockage dans les cuves d'azote pour les greffons du même patient de la même cytophèrese.

Références Bibliographiques

- Actor, J.K., 2019. Chapter 1 - A Functional Overview of the Immune System and Immune Components, in: Actor, J.K. (Ed.), *Introductory Immunology (Second Edition)*. Academic Press, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816572-0.00001-2>
- Bahsoun, S., Coopman, K., Akam, E.C., 2019. The impact of cryopreservation on bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a systematic review. *J. Transl. Med.* 17, 397. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-02136-7>
- Baldomero, H., Gratwohl, M., Gratwohl, A., Tichelli, A., Niederwieser, D., Madrigal, A., Frauendorfer, K., European Group for Blood and Marrow Transplantation EBMT, 2011. The EBMT activity survey 2009: trends over the past 5 years. *Bone Marrow Transplant.* 46, 485–501. <https://doi.org/10.1038/bmt.2011.11>
- Barriga, F., Ramírez, P., Wietstruck, A., Rojas, N., 2012. Hematopoietic stem cell transplantation: clinical use and perspectives. *Biol. Res.* 45, 307–316. <https://doi.org/10.4067/S0716-97602012000300012>
- Baust, J.M., Campbell, L.H., Harbell, J.W., 2017. Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 53, 855–871. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0201-y>
- Berz, D., McCormack, E.M., Winer, E.S., Colvin, G.A., Quesenberry, P.J., 2007. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells. *Am. J. Hematol.* 82, 463–472. <https://doi.org/10.1002/ajh.20707>
- Bijou, F., Ivanovic, Z., Boiron, J.-M., Nicolini, F., 2011. Mobilisation des cellules souches hématopoïétiques : état de l'art en 2011 et perspectives. *Transfus. Clin. Biol.* 18, 503–515. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2011.02.028>

- Blanchet, J.P., Mouchiroud, G., 2013. Les cellules souches hématopoïétiques : une population plus hétérogène qu'il n'y paraît. *médecine/sciences* 9, 959. <https://doi.org/10.4267/10608/3017>
- Boisset, J.-C., Robin, C., 2011. Origine endothéliale des cellules souches hématopoïétiques - La preuve en image. *médecine/sciences* 27, 875–881. <https://doi.org/10.1051/medsci/20112710016>
- Boulais, P.E., Frenette, P.S., 2015. Making sense of hematopoietic stem cell niches. *Blood* 125, 2621–2629. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-09-570192>
- Boulanger, F., Decot, V., Bulliard, G., Calmels, B., Giraud, C., Lacassagne, M.-N., Magnani, A., Pouthier, F., Thibert, J.-B., Tirefort, Y., Yakoub-Agha, I., Baudoux, E., 2016. Modalités de préparation, cryopréservation, décongélation des cellules souches hématopoïétiques et précautions pour infusion au patient : recommandations de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-TC). *Bull. Cancer (Paris), Recommandations de la Société Francophone de Greffe de Moelle et de Thérapie Cellulaire - Ateliers de Lille 2015* 103, S267–S272. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2016.09.002>
- Chambers, S.M., Lin, K.K., Goodell, M.A., 2008. 17 - Hematopoietic Stem Cell Properties, Markers, and Therapeutics, in: Atala, A., Lanza, R., Thomson, J.A., Nerem, R.M. (Eds.), *Principles of Regenerative Medicine*. Academic Press, San Diego, pp. 284–299. <https://doi.org/10.1016/B978-012369410-2.50019-X>
- Damon, Lloyd E., Damon, Lauren E., 2009. Mobilization of hematopoietic stem cells into the peripheral blood. *Expert Rev. Hematol.* 2, 717–733. <https://doi.org/10.1586/ehm.09.54>
- Devine, H., Tierney, D.K., Schmit-Pokorny, K., McDermott, K., 2010. Mobilization of hematopoietic stem cells for use in autologous transplantation. *Clin. J. Oncol. Nurs.* 14, 212–222. <https://doi.org/10.1188/10.CJON.212-222>

- Djuwantono, T., Wirakusumah, F.F., Achmad, T.H., Sandra, F., Halim, D., Faried, A., 2011. A comparison of cryopreservation methods: Slow-cooling vs. rapid-cooling based on cell viability, oxidative stress, apoptosis, and CD34+ enumeration of human umbilical cord blood mononucleated cells. *BMC Res. Notes* 4, 371. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-371>
- Donmez, A., Yilmaz, F., Soyer, N., Cagirgan, S., Arik, B., Tombuloglu, M., 2014. The loss of CD34+ cells in peripheral hematopoietic stem cell products cryopreserved by non-controlled rate freezing and stored at -80 °C after overnight storage. *Transfus. Apher. Sci. Off. J. World Apher. Assoc. Off. J. Eur. Soc. Haemapheresis* 51, 188–192. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2014.08.013>
- D’Rozario, J., Parisotto, R., Stapleton, J., Gidley, A., Owen, D., 2014. Pre infusion, post thaw CD34+ peripheral blood stem cell enumeration as a predictor of haematopoietic engraftment in autologous haematopoietic cell transplantation. *Transfus. Apher. Sci. Off. J. World Apher. Assoc. Off. J. Eur. Soc. Haemapheresis* 50, 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2014.02.021>
- Félix, O.M.W. de O., Tunes, G., Ginani, V.C., Simões, P.C., Barros, D.P., Delbuono, E., Alves, M.T. de S., Petrilli, A.S., Lee, M.L. de M., Gouveia, R.V., Zecchin, V.G., Seber, A., 2018. The influence of cell concentration at cryopreservation on neutrophil engraftment after autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Hematol. Transfus. Cell Ther.* 40, 233–239. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.01.007>
- Fry, L.J., Giner, S.Q., Gomez, S.G., Green, M., Anderson, S., Horder, J., McArdle, S., Rees, R., Madrigal, J.A., 2013. Avoiding room temperature storage and delayed cryopreservation provide better postthaw potency in hematopoietic progenitor cell grafts. *Transfusion (Paris)* 53, 1834–1842. <https://doi.org/10.1111/trf.12006>
- Gao, D., Critser, J.K., 2000. Mechanisms of Cryoinjury in Living Cells. *ILAR J.* 41, 187–196. <https://doi.org/10.1093/ilar.41.4.187>

- Giralt, S., Bishop, M.R., 2009. Principles and Overview of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Cancer Treat. Res.* 144, 1–21. https://doi.org/10.1007/978-0-387-78580-6_1
- Gurtovenko, A.A., Anwar, J., 2007. Modulating the Structure and Properties of Cell Membranes: The Molecular Mechanism of Action of Dimethyl Sulfoxide. *J. Phys. Chem. B* 111, 10453–10460. <https://doi.org/10.1021/jp073113e>
- Guttridge, M.G., Soh, T.G., Belfield, H., Sidders, C., Watt, S.M., 2014. Storage time affects umbilical cord blood viability. *Transfusion (Paris)* 54, 1278–1285. <https://doi.org/10.1111/trf.12481>
- Hill, Q.A., Buxton, D., Pearce, R., Gesinde, M.O., Smith, G.M., Cook, G., 2007. An analysis of the optimal timing of peripheral blood stem cell harvesting following priming with cyclophosphamide and G-CSF. *Bone Marrow Transplant.* 40, 925–930. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1705847>
- Hoggatt, J., Pelus, L.M., 2013. Hematopoiesis, in: Maloy, S., Hughes, K. (Eds.), *Brenner's Encyclopedia of Genetics (Second Edition)*. Academic Press, San Diego, pp. 418–421. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.00686-0>
- Hornberger, K., Yu, G., McKenna, D., Hubel, A., 2019. Cryopreservation of Hematopoietic Stem Cells: Emerging Assays, Cryoprotectant Agents, and Technology to Improve Outcomes. *Transfus. Med. Hemotherapy Off. Organ Dtsch. Ges. Transfusionsmedizin Immunhamatologie* 46, 188–196. <https://doi.org/10.1159/000496068>
- Huber, A., Orfao, A., Barnett, D., Brando, B., Janossy, G., Johnsen, H., Marti, G., Preijers, F., Rothe, G., S, S., Sutherland, D.R., Van der Schoot, C.E., Schmitz, G., Papa, S., Gratama, J.-W., 1998. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem and progenitor cells. *Cytometry* 34, 128–142. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0320\(19980615\)34:3<128::AID-CYTO3>3.3.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0320(19980615)34:3<128::AID-CYTO3>3.3.CO;2-K)

- Hunt, C.J., 2017. Cryopreservation: Vitrification and Controlled Rate Cooling. *Methods Mol. Biol.* Clifton NJ 1590, 41–77. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6921-0_5
- Ivanovic, Z., 2010. Hematopoietic stem cells in research and clinical applications: The “CD34 issue.” *World J. Stem Cells* 2, 18–23. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v2.i2.18>
- Iwasaki, H., Akashi, K., 2007. Hematopoietic developmental pathways: on cellular basis. *Oncogene* 26, 6687–6696. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210754>
- Jagannathan-Bogdan, M., Zon, L.I., 2013. Hematopoiesis. *Dev. Camb. Engl.* 140, 2463–2467. <https://doi.org/10.1242/dev.083147>
- Karimi-Busheri, F., Weinfeld, M. (Eds.), 2016. *Biobanking and Cryopreservation of Stem Cells, Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-45457-3>
- Kawahara, R., Shiozawa, Y., 2015. Hematopoiesis☆, in: *Reference Module in Biomedical Sciences*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.05054-6>
- Kessinger, A., Sharp, J.G., 2003. The whys and hows of hematopoietic progenitor and stem cell mobilization. *Bone Marrow Transplant.* 31, 319–329. <https://doi.org/10.1038/sj.bmt.1703837>
- Kondo, M., 2010. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. *Immunol. Rev.* 238, 37–46. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00963.x>
- Lee, S., Kim, S., Kim, H., Baek, E.J., Jin, H., Kim, J., Kim, H.O., 2008. Post-thaw viable CD34(+) cell count is a valuable predictor of haematopoietic stem cell engraftment in autologous peripheral blood stem cell transplantation. *Vox Sang.* 94, 146–152. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2007.01009.x>

- Lemos, N.E., Farias, M.G., Kubaski, F., Scotti, L., Onsten, T.G.H., Brondani, L. de A., Wagner, S.C., Sekine, L., 2018. Quantification of peripheral blood CD34+ cells prior to stem cell harvesting by leukapheresis: a single center experience. *Hematol. Transfus. Cell Ther.* 40, 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.htct.2018.01.002>
- Lissandre, S., Tanguy-Schmidt, A., Moles, M.-P., Ifrah, N., 2007. Place de, l'autogreffe de cellules souches h ematopo ı tiques dans le traitement des h emopathies de l'adulte. *Rev. Francoph. Lab.* 2007, 37–44. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(07\)80396-0](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(07)80396-0)
- Meneghel, J., Kilbride, P., Morris, G.J., 2020. Cryopreservation as a Key Element in the Successful Delivery of Cell-Based Therapies—A Review. *Front. Med.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.592242>
- Murugesan, M., Nair, C.K., Nayanar, S.K., Pentapati, K.C., 2019. Flow cytometric enumeration of CD34+ hematopoietic stem cells: A comparison between single-versus dual-platform methodology using the International Society of Hematotherapy and Graft Engineering protocol. *Asian J. Transfus. Sci.* 13, 43–46. https://doi.org/10.4103/ajts.AJTS_83_18
- Naithani, R., Dayal, N., Dixit, G., 2017. Single Versus Dual Platform Analysis for Hematopoietic Stem Cell Enumeration Using ISHAGE Protocol. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* 33, 370–374. <https://doi.org/10.1007/s12288-016-0749-9>
- Nervi, B., Link, D.C., DiPersio, J.F., 2006. Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *J. Cell. Biochem.* 99, 690–705. <https://doi.org/10.1002/jcb.21043>
- Ng-Cashin, J., Shea, T., 2003. Mobilization of Autologous Peripheral Blood Hematopoietic Cells for Support of High-Dose Cancer Therapy, in: *Thomas' Hematopoietic Cell Transplantation*. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 576–587. <https://doi.org/10.1002/9780470987070.ch45>

- Nguyen, N., Hariharan, N., Sussman, M.A., 2016. Chapter 5 - Impact of Telomere Shortening with Age in Stem Cell Therapy: New Strategies to Increase Telomere Length, in: Perin, E.C., Miller, L.W., Taylor, D.A., Willerson, J.T. (Eds.), *Stem Cell and Gene Therapy for Cardiovascular Disease*. Academic Press, Boston, pp. 49–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801888-0.00005-9>
- Pritchard, C.L., Heazlewood, S.Y., Cao, B., 2021. Chapter One - Acute lymphoblastic leukemia and the bone marrow microenvironment, in: Nilsson, S. (Ed.), *Advances in Stem Cells and Their Niches, The Cancer Stem Cell Niche*. Elsevier, pp. 1–34. <https://doi.org/10.1016/bs.asn.2020.11.001>
- Reddy, R.L., 2005. Mobilization and collection of peripheral blood progenitor cells for transplantation. *Transfus. Apher. Sci.* 32, 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.transci.2004.10.007>
- Reich-Slotky, R., Colovai, A.I., Semidei-Pomales, M., Patel, N., Cairo, M., Jhang, J., Schwartz, J., 2008. Determining post-thaw CD34+ cell dose of cryopreserved haematopoietic progenitor cells demonstrates high recovery and confirms their integrity. *Vox Sang.* 94, 351–357. <https://doi.org/10.1111/j.1423-0410.2007.001028.x>
- Rowley, S.D., Friedman, T., Korngold, R., 2013. 83 - Hematopoietic stem cell transplantation for malignant diseases, in: Rich, R.R., Fleisher, T.A., Shearer, W.T., Schroeder, H.W., Frew, A.J., Weyand, C.M. (Eds.), *Clinical Immunology (Fourth Edition)*. Elsevier, London, pp. 1020–1031. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7234-3691-1.00097-0>
- Schwandt, S., Liedtke, S., Kogler, G., 2017. The influence of temperature treatment before cryopreservation on the viability and potency of cryopreserved and thawed CD34+ and CD45+ cord blood cells. *Cytotherapy* 19, 962–977. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2017.05.005>

- Seo, S.H., Shin, S., Roh, E.Y., Song, E.Y., Oh, S., Kim, B.J., Yoon, J.H., 2017. Long-Term Quality Control Program Plan for Cord Blood Banks in Korea: A Pilot Study for Cryopreservation Stability. *Ann. Lab. Med.* 37, 124–128. <https://doi.org/10.3343/alm.2017.37.2.124>
- Shu, Z., Heimfeld, S., Gao, D., 2014. Hematopoietic SCT with cryopreserved grafts: adverse reactions after transplantation and cryoprotectant removal before infusion. *Bone Marrow Transplant.* 49, 469–476. <https://doi.org/10.1038/bmt.2013.152>
- Sidney, L.E., Branch, M.J., Dunphy, S.E., Dua, H.S., Hopkinson, A., 2014. Concise Review: Evidence for CD34 as a Common Marker for Diverse Progenitors. *Stem Cells Dayt. Ohio* 32, 1380–1389. <https://doi.org/10.1002/stem.1661>
- Smith, B.R., 1990. Regulation of hematopoiesis. *Yale J. Biol. Med.* 63, 371–380.
- Stik, G., Charbord, P., Durand, C., 2017. Chapter One - Stroma Cell Niche Regulation During HSC Development, in: Bonnet, D. (Ed.), *Advances in Stem Cells and Their Niches, Hematopoietic Stem Cell Niche.* Elsevier, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1016/bs.asn.2016.12.001>
- Suárez-Álvarez, B., López-Vázquez, A., López-Larrea, C., 2012. Mobilization and homing of hematopoietic stem cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 741, 152–170. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-2098-9_11
- Sutherland, D.R., Keating, A., Nayar, R., Anania, S., Stewart, A.K., 1994. Sensitive detection and enumeration of CD34+ cells in peripheral and cord blood by flow cytometry. *Exp. Hematol.* 22, 1003–1010.
- Szilvassy, S.J., 2003. The biology of hematopoietic stem cells. *Arch. Med. Res.* 34, 446–460. <https://doi.org/10.1016/j.arcmed.2003.06.004>

- Valteau-Couanet, D., Dalle, J.-H., 2017. Chapitre 9 - Greffes de cellules-souches hématopoïétiques, in: Pérel, Y., Plantaz, D. (Eds.), *Cancérologie de L'enfant*. Elsevier Masson, Paris, pp. 119–129. <https://doi.org/10.1016/B978-2-294-74470-9.00009-4>
- Vasovic, L.V., Reich-Slotky, R., Goel, R., 2018. Chapter 13 - Hematopoietic Stem Cell Collections and Cellular Therapies, in: Maitta, R.W. (Ed.), *Clinical Principles of Transfusion Medicine*. Elsevier, pp. 151–167. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-54458-0.00013-1>
- Wertheim, G., Bagg, A., 2014. Normal Hematopoiesis, in: McManus, L.M., Mitchell, R.N. (Eds.), *Pathobiology of Human Disease*. Academic Press, San Diego, pp. 1628–1643. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386456-7.04101-0>
- Whaley, D., Damyar, K., Witek, R.P., Mendoza, A., Alexander, M., Lakey, J.R., 2021. Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations. *Cell Transplant*. 30, 0963689721999617. <https://doi.org/10.1177/0963689721999617>