

Validation d'un protocole de cryoconservation des greffons des cellules souches hématopoïétiques dans l'azote liquide.

Expérience de l'EHU d'Oran

A.Mihoubi¹, S.Benichou¹, N.Bounoua¹, A.Bendimred¹, K.Amani¹, I.Caid Ali¹, A.Temimi¹, N.H.Hassam¹, M.Serredj¹, I.Boukhatem¹, M.Maurof¹, B.Ncimi¹, M.Belmiloud¹, A.Bouakkaz¹, H.Ghaffari¹, F.Benziadi¹, A.Bensaïd¹, N.Abdelwahab¹, B.Entasoltane^{1,2}, M.Brahimi^{1,2}, N.Yafour^{1,2}

1. Service d'hématologie et de thérapie cellulaire. EHU 1er Novembre Oran, Algérie
2. Université d'Oran 1, Ahmed Ben Bella, faculté de médecine, Oran, Algérie



Introduction

La greffe des cellules souches hématopoïétiques (CSH) constitue aujourd'hui une approche thérapeutique majeure dans la prise en charge des lymphomes d'Hodgkin. Un aspect essentiel de cette modalité thérapeutique est la cryoconservation des CSH, qui permet de préserver la viabilité et l'efficacité cellulaire en vue d'une greffe ultérieure. Cependant, il est crucial d'appliquer des protocoles efficaces permettant d'assurer une conservation optimale et minimiser les pertes cellulaires. L'objectif de ce travail est d'évaluer l'efficacité du protocole de cryoconservation appliquée dans notre laboratoire, basé sur l'utilisation de diméthylsulfoxyde (DMSO) à 10%, à travers l'analyse de la viabilité cellulaire post-décongélation par cytometrie en flux.

Patients & méthodes

Il s'agit d'une étude rétrospective, monocentrique, menée au laboratoire de thérapie cellulaire du service d'hématologie de l'EHU 1ere Novembre d'Oran. La solution cryoprotectrice a été préparée à partir de DMSO à 10% et d'albumine humaine à 4%. Le DMSO était dilué à 10% avec de l'albumine humaine (20%), ce dernier était préalablement dilué au 1/5 dans une solution physiologique (NaCl) ce qui correspond à une concentration final de 4% d'albumine. La préparation est refroidie à 4 °C avant d'être mélangée volumes à volume au greffon des CSH. Les cellules mélangées à la solution cryoprotectrice sont d'abord mis au congélateur à -80°C pour 24 heures minimum, puis transférées dans l'azote liquide (-196°C). Afin de respecter la descente en température. L'évaluation de la viabilité post-décongélation des CSH CD34+ et des cellules mononucléées (CMN) a été réalisée par cytometrie en flux, selon un protocole sans lavage utilisant le marquage CD45/CD34 /7AAD. L'analyse a suivi la stratégie de gating ISHAGE, sur un cytomètre BD FACSLyric.

Résultats

23/7/2023 au 20/5/2025, une analyse a été effectué sur seize poches de CSH cryoconservées dans l'azote liquide, provenant de produits d'aphérèses des patients atteints de lymphome d'Hodgkin candidats à une autogreffe. La viabilité moyenne de récupération post-décongélation était de 85,25 % pour le nombre total de CD34+, avec des valeurs allant de 63% à 99%. Concernant les CMN la viabilité cellulaire moyenne de récupération post-décongélation était de 68% (de 40% à 98%).

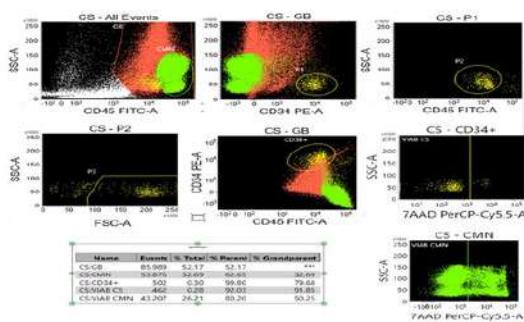


Figure 1 : Stratégie de gating pour la mesure de viabilité cellulaire par cytometrie en flux

Discussion

Les résultats obtenus confirment l'efficacité du protocole de cryoconservation appliquée dans notre laboratoire pour préserver la viabilité des cellules du greffon après décongélation. Les taux moyens de récupération observés sont comparables à ceux de la littérature, qui rapportent une viabilité post-décongélation comprise entre 83 et 94% (1) avec des protocoles à base de DMSO à 10%.

Le DMSO est utilisé comme agent cryoprotecteur pour empêcher la formation de cristaux de glace qui pourraient endommager les cellules lors de la congélation, assurant ainsi leur viabilité pendant le stockage à très basse température(2). Le DMSO à une concentration de 10 % reste le plus utilisé pour la cryoconservation des CSH (2, 3, 4).

L'évaluation de la qualité des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et la mesure de leur viabilité doivent être réalisée après congélation et décongélation. Une viabilité minimale supérieur à 50 % après décongélation est un critères obligatoire pour la délivrance d'un greffon autologue dans la plupart des centres de transplantation en Europe (5).

La viabilité a été évaluée par cytometrie en flux, méthode de référence pour contrôle qualité des greffons, en utilisant le 7AAD (7-aminoactinomycineD) qui permet une discrimination fiable entre cellules viables et non viable(7). L'analyse a suivi la stratégie recommandée par ISHAGE pour la numération standardisée des CSH, assurant ainsi la comparabilité des résultats avec ceux d'autres centres (6,7).

Des études ultérieures ont montré que la combinaison d'une congélation progressive en utilisant une congélation à -80 et d'un stockage à long terme dans l'azote liquide permet de préserver la fonctionnalité des cellules (2,8).

Ces résultats renforcent la pertinence de ce protocole dans notre pratique hospitalière et rejoignent les recommandations publiées par plusieurs équipes pour optimiser la qualité du greffons(2,5,9).

Conclusion

Le protocole de cryoconservation appliquée dans notre laboratoire a permis d'assurer une récupération post-décongélation élevée des cellules CD34+. Ces résultats confirment la fiabilité de l'utilisation du DMSO à 10%, garantissant ainsi une qualité cellulaire compatible avec les exigences cliniques de l'autogreffe, par conséquent cette technique constitue une stratégie efficace pour la conservation des CSH dans la pratique hospitalière.

Références

1. Lutz S, et al. Recovery of viable CD34+ cells from cryopreserved hematopoietic progenitor cell products. Bone Marrow Transplant. 2005.
2. Flamm B, Bolognesi M. Modèles de préparation, cryoprotection, décongélation des cellules souches hématopoïétiques et préparation pour infusion au patient recommandées de la Société francophone de greffe de moelle et de thérapie cellulaire (SFGM-IC). *Br J Cancer*. 2015; 113(10):A1020-ord et al. Autologous peripheral blood progenitor cells cryopreserved with 0 and 10 percent dimethyl sulfoxide alone give comparable hematopoiesis/reconstitution after transplantation. *Transfusion*. 2006.
3. David E, et al. Cryopreservation des cellules souches hématopoïétiques. *Am J Hematol*. 2007.
4. Atmanal EBMT - transplantation de cellules souches hématopoïétiques et thérapies cellulaires. 7e édition.
5. Sutherland RO, et al. The ISHAGE guidelines for CD34+ cell determination by flow cytometry. *J Hematother*. 1995.
6. Jones J, et al. Flow cytometric evaluation of viability of hematopoietic progenitors using 7AAD. *Bone Marrow Transplantation*. 1995.
7. Lutz S, et al. An update on methods for cryopreservation and thawing of hematopoietic cells. *Transfus Apher Sci*. 2016; 54(2):EBMT Guidelines standardization of cryopreservation procedures for hematopoietic cells. *Bone marrow transplant*, 2012.