

*COLLÈGE NATIONAL
DES GYNÉCOLOGUES ET OBSTÉTRICIENS FRANÇAIS
Président : Professeur J. Lansac*

**Extrait des
Mises à jour
en Gynécologie
et obstétrique**

—
**tome XXIX
publié le 30.11.2005**



*VINGT-NEUVIÈMES JOURNÉES NATIONALES
Paris, 2005*

Applications thérapeutiques des cellules souches du sang placentaire

D. REA, M. BENBUNAN*
(Paris)

I. ALLOGREFFES DE CELLULES SOUCHES HÉMATOPOIÉTIQUES (CSH) DU SANG PLACENTAIRE

La première greffe de CSH du sang placentaire réalisée avec succès eut lieu en 1988 chez un enfant atteint de maladie de Fanconi dans l'équipe du Pr Éliane Gluckman (13). Il s'agissait d'une greffe intrafamiliale puisque le sang provenait de la sœur HLA-identique du patient. Depuis cette greffe pionnière, une série d'études permit de valider la greffe de sang placentaire allogénique intrafamiliale et non apparentée comme une alternative à la greffe de moelle et de CSH périphériques (15, 34) et des banques de sang placentaire non apparenté furent créées. Actuellement plus de 7000 greffes de sang placentaire allogénique ont été réalisées dans le monde et la part du sang placentaire parmi l'ensemble des allogreffes de CSH est croissante.

Comparé à la moelle osseuse et aux CSH périphériques, le sang placentaire possède plusieurs avantages. Il peut être facilement prélevé sans risque pour la mère et l'enfant, et congelé dans des conditions assurant le maintien de la fonctionnalité des CSH à long terme. Une

* Unité de Thérapie Cellulaire et Clinique Transfusionnelle – Hôpital Saint-Louis – Paris

période de mise en quarantaine permet la réalisation de contrôles microbiologiques et la sécurisation du greffon en matière de risque bactérien, parasitaire et viral. Il provoque moins de maladie du greffon contre l'hôte (GVH) du fait de l'imaturité immunologique des lymphocytes et des cellules présentatrices d'antigène qu'il contient (4), autorisant des greffes à partir de donneurs ayant plusieurs incompatibilités HLA basées sur le typage HLA-A, B et DRB1. Cependant, de nombreux problèmes se posent, tels le risque de rejet et la lenteur de la reconstitution hématopoïétique, limitant les indications de greffe aux patients n'ayant pas de donneur HLA compatible.

1.1 Allogreffes de CSH du sang placentaire dans les maladies génétiques

L'allogreffe de CSH du sang placentaire est une option thérapeutique dans les maladies génétiques constitutionnelles hématologiques, immunologiques ou métaboliques. Dans le cadre des greffes intrafamiliales, la grossesse peut être programmée et les embryons indemnes peuvent être sélectionnés avant implantation. En dehors des hémoglobinopathies, les données de la littérature sont rares.

Dans les hémoglobinopathies chez l'enfant, la greffe de sang placentaire démontre une efficacité remarquable. Une étude multicentrique réalisée à partir du registre EUROCORD a permis l'analyse de 44 greffes de sang placentaire intrafamiliales après conditionnement myéloablatif chez des enfants âgés de 1 mois à 20 ans atteints de thalassémie majeure ($n = 33$) ou de drépanocytose homozygote sévère ($n = 11$) (24). Après 2 ans de suivi médian, tous les patients sont en vie et 36 des 44 enfants sont indemnes d'hémoglobinopathie. En fait, la reconstitution hématopoïétique a eu lieu dans 36 cas et la prise de greffe a été un échec dans 8 cas. L'incidence de récupération des polynucléaires neutrophiles a été de 89 % à J60 avec un délai médian de récupération de 23 jours (12-60). L'incidence de récupération des plaquettes à J60 a été de 90 % avec un délai médian de récupération de 39 jours (19-92). L'incidence de la GVH aiguë a été faible (11 %) et de grade limité (grade 2) et seulement 2 patients ont développé une GVH chronique d'intensité modérée.

Les greffes de sang placentaire non apparenté, du fait du risque plus élevé de rejet et de GVH, sont actuellement réservées aux formes d'hémoglobinopathies les plus sévères en l'absence de donneur HLA compatible (1).

I.2 Allogreffes de CSH du sang placentaire dans les hémopathies malignes

I.2.1 Critères de choix d'un sang placentaire dans les hémopathies malignes

La dose de cellules nucléées mesurée avant congélation du sang placentaire et le nombre de disparités HLA A, B et DRB1 sont les deux critères majeurs de choix d'un sang placentaire en vue d'une allogreffe. L'impact de la dose de cellules nucléées sur la probabilité de reconstitution hématopoïétique, le délai de reconstitution hématopoïétique et sur la mortalité a été rapporté dès 1997 par Rubinstein et coll. et Gluckman et coll. (15, 34). Depuis 1998, la prise en compte de l'effet dose a permis des taux de reconstitution hématopoïétique meilleurs et une diminution de la mortalité liée à la greffe.

Une vaste analyse multicentrique issue de données de registre a par ailleurs permis d'affiner les critères de choix des greffons et les indications de greffe (14). Cette cohorte a inclus 550 enfants et adultes atteints d'hémopathies malignes, greffés avec du sang placentaire non apparenté entre 1994 et 2001. Le statut de l'hémopathie lors de la greffe était considéré comme très avancé dans 43 % des cas. Les résultats sont les suivants :

- La récupération neutrophile est fortement corrélée à la dose de cellules nucléées et au nombre de différences HLA. Au-delà d'une dose de $4 \times 10^7/\text{kg}$, l'incidence cumulée de récupération neutrophile à J60 est de 79 % alors qu'en deçà de cette dose, elle n'est que de 69 %. En l'absence de différences HLA A, B et DR, l'incidence cumulée de récupération neutrophile à J60 est de 83 % alors qu'en présence de 3 différences HLA ou plus, elle n'est que de 53 %.

- La récupération plaquettaire est significativement liée à la dose de cellules nucléées et à la coexistence de différences HLA de classe I et de classe II. Au-delà d'une dose de cellules nucléées de $3,11 \times 10^7/\text{kg}$, l'incidence cumulée de récupération plaquettaire à J180 est de 60 %, alors qu'en deçà elle n'est que de 42 %. En l'absence de disparités HLA de classe I et II, l'incidence cumulée de récupération plaquettaire à J180 est de 53 %, alors qu'en présence de disparités HLA de classe I et de classe II, elle n'est que de 43 %. L'âge joue également un rôle puisque la récupération plaquettaire est meilleure chez les enfants que chez les adultes.

- La GVH aiguë sévère est corrélée au nombre de cellules CD34+ collectées et à la coexistence de disparités HLA de classe I et II.

- L'incidence cumulée des rechutes à 1 an est de 29 % en l'absence de différences HLA, et de 14 % en présence de 1 à 3 différences. Le taux

de rechutes est inversement corrélé au nombre de différences HLA, suggérant un effet greffon contre leucémie (GVL) malgré l'immaturité immunologique du sang placentaire. D'ailleurs, il a été montré dans une étude récente que des lymphocytes T cytotoxiques dirigés contre les antigènes mineurs maternels HA-1 étaient présents dans le sang placentaire quand la mère exprimait cet antigène mais pas l'enfant, appuyant la possibilité d'un effet GVL dans les greffes de sang placentaire (26).

- La mortalité dépend de l'âge du patient et de l'état d'avancement de l'hémopathie. La mortalité liée à la greffe est due pour 38 % des cas aux complications infectieuses, pour 26 % à la toxicité du traitement, pour 17 % à la GVH aiguë et pour 5 % au rejet.
- La survie globale à 3 ans est de 34 % et dépend principalement de l'âge et de l'état d'avancement de la maladie.

1.2.2 Allogreffes de CSH du sang placentaire dans les hémopathies malignes de l'enfant

Les résultats de la greffe de sang placentaire dans les leucémies de l'enfant sont moins bons que ceux obtenus dans les hémopathies non malignes avec un taux de non prise plus élevé, une survie globale plus basse et une mortalité liée à la greffe plus importante (15, 32, 44). Le registre EUROCORD a permis l'analyse des facteurs influençant le devenir de 102 enfants leucémiques après allogreffe de sang placentaire, greffés entre 1990 et 1997 (23). Il apparaît que la greffe de sang placentaire intrafamiliale ou non apparentée après conditionnement myéloablatif peut être bénéfique en l'absence de donneur HLA compatible. Toutefois, la guérison ne s'envisage qu'à condition que l'hémopathie initiale soit en 1^{re} ou en 2^e rémission complète (RC). Parmi ces 102 enfants âgés de 4 mois à 15 ans, 70 étaient atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) et 32 de leucémie aiguë myéloblastique (LAM). Soixante-six d'entre eux étaient en 1^{re} ou 2^e RC et 36 enfants étaient soit en 3^e RC, soit en réponse partielle, soit réfractaires à la chimiothérapie. Quarante-deux enfants ont reçu un cordon intrafamilial dont 30 HLA identiques, 4 avec 1 ou 2 différences HLA et 8 avec 3 ou 4 différences HLA. Soixante enfants ont reçu un cordon non apparenté dont 6 HLA identiques, 49 avec 1 ou 2 différences HLA et 5 avec 3 ou 4 différences HLA. La greffe s'est soldée par une non prise dans 20 cas. La reconstitution hématopoïétique a été plus lente après greffe non apparentée qu'après greffe intrafamiliale. En effet, la récupération des polynucléaires neutrophiles à J60 était de 84 % dans les greffes apparentées et de 79 % dans les greffes non apparentées avec un délai médian de récupération respectivement de 27 jours (14-49) et de 33 jours (12-56). L'incidence de la GVH aiguë de

grade II à IV était comparable dans les greffes intrafamiliales et non apparentées, respectivement de l'ordre 41 % et 37 %. La survie sans événement à 2 ans était également comparable après greffe intrafamiliale et non apparentée, respectivement de 39 % et de 30 %. Le facteur influençant le plus fortement la survie sans événement était le statut de la maladie lors de la greffe puisque chez les enfants en 1^{re} ou 2^e RC la survie sans événement était de 49 % alors que chez les autres, celle-ci était de 8 % seulement. Ceci s'explique principalement par un taux de mortalité et de rechute beaucoup plus important dans ce dernier groupe (65 % versus 34 % de mortalité globale à 1 an et 77 % versus 31 % de rechutes à 2 ans).

1.2.3 Allogreffes de CSH du sang placentaire dans les hémopathies malignes de l'adulte

Dans les hémopathies de l'adulte, les greffes de sang placentaire sont bien évidemment effectuées à partir de greffons non apparentés. Le recours aux CSH de sang placentaire dépend de manière critique de la richesse cellulaire du cordon et du poids du patient. Plusieurs études ont clairement montré que la prise de greffe et le délai de récupération hématopoïétique étaient corrélés au contenu en cellules nucléées du greffon (21, 38). De plus, il semble que la richesse en cellules CD34+ soit associée à une meilleure survie sans événement (21). Les résultats sont moins bons que dans les hémopathies malignes de l'enfant avec en particulier un taux de mortalité liée à la greffe plus élevé. À l'heure actuelle, on manque encore de données quant aux résultats de la greffe de sang placentaire pour chaque type d'hémopathie maligne.

Deux grandes études multicentriques ont été récemment publiées, l'une à partir du registre américain et l'autre à partir du registre EUROCORD (22, 33). Les résultats de ces deux études vont dans le même sens. L'étude EUROCORD a analysé 98 greffes réalisées entre 1998 et 2002 (33). Parmi ces adultes âgés de 15 à 55 ans et pesant entre 38 et 92 kg, 46 % étaient atteints de LAM et 54 % de LAL. Vingt-sept pour cent étaient en 1^{re} RC, 21 % en 2^e RC et 52 % dans des phases encore plus avancées de la maladie. Six pour cent ont reçu un greffon compatible, 90 % ont reçu un greffon avec 1 ou 2 différences HLA et seulement 4 % ont reçu un greffon avec 3 différences HLA. La dose médiane de cellules nucléées reçue était de $2,3 \times 10^7$ /kg (0,9-6). Le taux d'échecs de prise était important, de l'ordre de 20 %. Le délai médian de récupération neutrophile était de 26 jours (14-80) avec une incidence cumulée de récupération neutrophile à J60 de 75 %. L'incidence de la GVH aiguë était de 26 % avec 13 % de GVH aiguë sévère et celle de la GVH chronique à 2 ans était de 30 %. Le

taux de rechute était de 23 % avec un risque beaucoup plus élevé pour les greffes réalisées à un stade très avancé de la leucémie. La survie globale et la survie sans événement étaient respectivement de 36 % et de 33 %. La mortalité liée à la greffe était de 44 % et la mortalité globale de 63 % dont 31 % des cas liés à la rechute et 69 % des cas liés à la greffe, en particulier par complications infectieuses.

Saavedra et coll. ont détaillé les complications infectieuses après greffe de sang placentaire chez l'adulte dans une petite série de 27 patients (35). Ils ont rapporté 100 % d'accidents infectieux dans les 100 jours post-greffe, dont 66 % d'accidents infectieux sévères. Les infections bactériennes, en particulier à bacilles gram négatifs, étaient les plus fréquentes. Les infections à CMV sont survenues chez 58 % des patients CMV séropositifs mais ne se sont traduites en majorité que par une antigénémie CMV positive isolée, sachant que tous les patients CMV séropositifs recevaient une prophylaxie par ganciclovir. La fréquence des infections fongiques systémiques et localisées a été de 11 % et celle des infections parasitaires de 7 %. Les complications infectieuses ont joué un rôle dans 80 % des décès survenus dans les 100 premiers jours de la greffe. Il est regrettable que la reconstitution immunologique et que les infections tardives n'aient pas été analysées.

1.2.4 Greffe de CSH du sang placentaire versus greffe de moelle dans les hémopathies malignes

La comparaison entre les greffes de sang placentaire et les greffes effectuées avec d'autres sources de CSH n'est pas aisée car elle ne peut être réalisée qu'au sein d'études rétrospectives avec des groupes de patients hétérogènes.

Rocha et coll. ont analysé le devenir d'enfants leucémiques après greffe non apparentée de moelle non manipulée ($n = 262$) ou de sang placentaire ($n = 99$), entre 1994 et 1998 (32). Par rapport aux enfants greffés avec des CSH médullaires, ceux greffés avec du sang placentaire étaient plus jeunes, les incompatibilités HLA étaient plus fréquentes, les leucémies aiguës étaient de plus haut risque car plus fréquemment au-delà de la 1^{re} RC et les LAM étaient plus représentées. La survie globale à 2 ans était de 49 % après greffe de moelle et de 35 % après greffe de sang placentaire, et la survie sans événement à 43 % après greffe de moelle et à 31 % après greffe de sang placentaire. Les différences les plus marquées ont été notées dans les 100 premiers jours post-greffe avec une reconstitution hématopoïétique significativement plus lente, un risque de non prise plus élevé, une moindre incidence de GVH aiguë et chronique et une mortalité plus importante dans les greffes de sang placentaire (63 % versus 51 %),

l'augmentation du taux de mortalité semblant être dû à la plus grande fréquence des rejets et des accidents infectieux. En revanche, aucune différence entre les taux de rechutes n'a été mise en évidence.

Chez l'adulte, les études du registre américain et d'EUROCORD se sont attachées à comparer les résultats de la greffe non apparentée de sang placentaire avec ceux de la greffe de moelle non apparentée non manipulée. Il est important de noter que la population de patients greffés avec du sang placentaire se distinguait par une part plus importante de leucémies en phase très avancée et un plus grand nombre d'incompatibilités HLA entre le receveur et le greffon (22, 33). Les deux études concluent que, dans les greffes de sang placentaire, la récupération hématopoïétique est plus tardive et le risque de non prise est plus élevé alors que le taux de rechutes est identique à celui observé après greffe de moelle. L'incidence de la GVH aiguë est moins élevée après greffe de sang placentaire dans l'étude EUROCORD alors que c'est celle de la GVH chronique qui est diminuée dans l'étude américaine. Enfin, l'étude américaine rapporte une mortalité liée à la greffe et une mortalité globale plus élevée après greffe de sang placentaire. Il ressort en fait de ces 2 études que la greffe de sang placentaire chez l'adulte ne doit être considérée qu'en l'absence de donneur de moelle non apparenté HLA compatible.

II. GREFFE DE CSH DU SANG PLACENTAIRE: VOIES DE DÉVELOPPEMENT

II.1 Amélioration de la reconstitution hématopoïétique

La lenteur de reconstitution hématopoïétique et le risque d'échec de reconstitution après greffe de sang placentaire ont amené un certain nombre d'équipes à développer des stratégies d'expansion cellulaire pour accroître la dose de cellules nucléées administrée aux patients. Deux essais cliniques de phase I ont été publiés dans lesquels une partie du greffon était injectée immédiatement après décongélation et l'autre partie 10 à 12 jours plus tard après une phase de culture *in vitro* en présence d'un cocktail de facteurs de croissance (18, 40). Il semble important d'administrer la fraction non manipulée car l'expansion *in vitro* altérerait les capacités hématopoïétiques à long terme des cellules. Il faut noter que les patients étaient en majorité atteints d'hémopathies malignes en phase très avancée. L'expansion en culture

des cellules nucléées totales a varié entre 2,4 et 56 fois et celle des cellules CD34+ entre 0,5 et 4 fois. L'administration de la fraction manipulée *in vitro* a été bien tolérée mais les résultats en termes de reconstitution hématopoïétique n'ont malheureusement pas été probants.

Une tentative d'expansion *in vivo* par G-CSF et *stem cell factor* a été effectuée chez deux adultes atteints de leucémie myéloïde chronique (43). La récupération neutrophile, mais pas la récupération plaquettaire, a été plus courte que normalement attendu chez l'un des patients.

Une autre approche pour augmenter la dose de cellules nucléées dans les greffes de sang placentaire consiste en l'administration de 2 greffons. Barker et coll. ont rapporté des résultats très encourageants à propos de 21 enfants et adultes atteints d'hémopathie maligne (2). Les 2 greffons avaient au maximum 2 différences HLA entre eux et avec le receveur. Les patients ont reçu une dose de cellules nucléées médiane de $4,5 \times 10^7$ /kg et la récupération neutrophile a eu lieu chez tous les patients avec un délai médian de 23 jours (15-41). L'hématopoïèse était issue majoritairement d'un seul des 2 cordons à J21 et à 100 % de ce même cordon à J100. Les raisons de la prédominance de prise d'un seul des 2 greffons ne sont pas élucidées.

Frasconi et coll. ont étudié la clonogénicité des CSH d'enfants greffés avec de la moelle ou du sang placentaire dans des cultures à court et à long terme et il s'avère que celle-ci est meilleure chez les enfants greffés avec du sang placentaire (10). Ces résultats contrastent avec la lenteur de reconstitution hématopoïétique qui caractérise la greffe de sang placentaire et suggèrent que le contenu en cellules nucléées n'est pas le seul facteur limitant. D'autres mécanismes sont évoqués, par exemple une difficulté de migration des CSH du sang placentaire vers la moelle osseuse. En effet, les CSH du sang placentaire expriment faiblement les molécules impliquées dans la migration vers la moelle comme CXCR4, et ont des propriétés migratoires diminuées *in vitro* comparées aux CSH périphériques ou de la moelle osseuse (45). Chez la souris, la greffe de CSH du sang placentaire par injection intra-osseuse s'avère plus efficace que celle par voie intraveineuse (5) et les essais chez l'homme sont attendus.

Enfin, un dernier axe de recherche s'oriente vers la co-transplantation de CSH du sang placentaire et de cellules souches mésenchymateuses, puisqu'il a été montré dans des modèles murins que ces dernières favorisaient la prise de greffe (29).

II.2 Greffes de CSH sang placentaire à conditionnement non myéloablatif

Le développement des allogreffes de CSH à conditionnement non myéloablatif permet actuellement de reculer la limite d'âge des patients candidats à l'allogreffe jusqu'à 70 ans et autorise également la greffe de certains patients jadis exclus de l'allogreffe à conditionnement myéloablatif en raison de problèmes médicaux.

Les premières tentatives de greffe de CSH de sang placentaire à conditionnement non myéloablatif furent rapportées en 2001 chez 2 adultes âgés de 39 et de 62 ans atteints de lymphome malin non hodgkinien. Les cordons non apparentés possédaient 2 incompatibilités HLA et la reconstitution hématopoïétique fut d'origine 100 % donneur à partir du 3^e mois (31). La prise de greffe fut ensuite évaluée dans un essai de phase I chez 43 adultes atteints d'hémopathie maligne en phase avancée (3). Les sangs placentaires non apparentés possédaient entre 0 et 2 différences HLA avec le receveur et le contenu médian en cellules nucléées était de $3,7 \times 10^7/\text{kg}$ (1,6-6). Deux régimes de conditionnement étaient proposés: soit le busulfan soit le cyclophosphamide, associés à l'irradiation corporelle totale et à la fludarabine (Bu/TBI/Flu ou Cy/TBI/Flu). La durée médiane de récupération neutrophile a été de 26 jours (12-30) après conditionnement par Bu/TBI/Flu et de 9,5 jours (5-28) après conditionnement par Cy/TBI/Flu. L'incidence cumulée de reconstitution hématopoïétique de type donneur a été de 76 % et de 94 % après conditionnement par Bu/TBI/Flu et Cy/TBI/Flu. L'incidence de la GVH aiguë sévère n'a été que de 9 %. La mortalité liée à la greffe a semblé plus faible qu'après conditionnement myéloablatif: de 48 % après Bu/TBI/Flu et de 28 % après Cy/TBI/Flu. La survie sans rechute à 1 an a été de 24 % après conditionnement par Bu/TBI/Flu et de 41 % après conditionnement par Cy/TBI/Flu.

Chez l'enfant, l'allogreffe de sang placentaire après conditionnement non myéloablatif est également faisable comme le montre l'étude pilote de Del Toro et coll. ayant inclus 14 patients âgés de 6 mois à 21 ans (7). Dans cette étude, les sangs placentaires étaient non apparentés et possédaient 1 ou 2 différences HLA de classe I avec le receveur. Le contenu médian en cellules des greffons était de $4,3 \times 10^7/\text{kg}$ (0,9-10,8). La greffe n'a pas pris chez 3 patients. Chez les autres patients, la durée médiane de récupération neutrophile a été de 18 jours (2-45) et un chimérisme de type 100 % donneur a été obtenu dans 8 cas.

L'allogreffe de CSH du sang placentaire après conditionnement non myéloablatif reste maintenant à optimiser, et ses indications demandent à être précisées.

II.3 Greffes de CSH du sang placentaire autologue

Il n'existe pas à l'heure actuelle d'indication thérapeutique de la greffe de sang placentaire autologue. Un enfant de 20 mois a été autogreffé avec succès pour une aplasie médullaire dans les suites d'une transplantation hépatique et est en vie après 3 ans de recul, mais il s'agit d'une situation exceptionnelle (11). Dans les hémopathies malignes de l'enfant, une telle greffe n'est pas logique dans la mesure où la contamination tumorale du sang placentaire ne peut être exclue. Malgré tout, des banques de sang placentaire privées se développent notamment aux États-Unis en vue du traitement d'hypothétiques pathologies contre lesquelles l'autogreffe de sang placentaire autologue aurait un intérêt potentiel. De telles banques ne sont pas autorisées en France. Pourtant, il n'est pas impossible dans le futur que des indications émergent, notamment dans le champ de la médecine réparatrice.

III. SANG PLACENTAIRE ET MÉDECINE RÉPARATRICE

Le sang placentaire contient de rares cellules mésenchymateuses et est riche en progéniteurs endothéliaux (8, 28). Il semble exister en outre des cellules souches multipotentes capables de différenciation en chondrocytes, ostéoblastes, adipocytes, hépatocytes, neurones et cardiomyocytes (19). S'agit-il de cellules souches très primitives telles les cellules embryonnaires ES, ou de cellules mésenchymateuses capables de transdifférenciation? La question reste pour l'instant sans réponse mais ces découvertes laissent envisager des perspectives en matière de réparation tissulaire et de nombreuses recherches sont en cours.

III.1 Réparation cardiovasculaire

Dans le domaine de la cardiologie, Hirata et coll. ont étudié le potentiel réparateur des cellules CD34+ du sang placentaire dans l'infarctus du myocarde chez le rat (17). L'infarctus était créé par ligature

de l'artère coronaire gauche. Les cellules CD34+ humaines étaient injectées 20 minutes plus tard autour de la zone infarctée. Malgré une mortalité non négligeable, les résultats sont encourageants puisque, comparés aux rats contrôles, les rats ayant reçu les cellules CD34+ ont vu leur fonction ventriculaire gauche augmenter significativement et la dilatation de leur ventricule gauche diminuer. En parallèle, une néovascularisation importante s'est instaurée et les auteurs ont pu constater la persistance de cellules CD34+ humaines autour des vaisseaux dans la zone infarctée. Les mécanismes à l'origine de l'amélioration de la fonction ventriculaire gauche n'ont pas été étudiés. Henning et coll. ont obtenu des résultats similaires en injectant des cellules de sang placentaire mononucléées (16). Ott et coll. ont cultivé des progéniteurs endothéliaux du sang placentaire humain et ont transplanté les cellules endothéliales obtenues dans le myocarde infarcté chez le rat *nude*. La fonction ventriculaire gauche des rats a été significativement améliorée et des néovaisseaux fonctionnels se sont formés autour de la zone ischémique (30).

Schmidt et coll. ont généré des patches de myofibroblastes issus du cordon ombilical, recouverts d'endothélium formé à partir des pré-curseurs endothéliaux du sang placentaire (39). Ces patches pourraient s'avérer utiles dans les cardiopathies congénitales.

En matière de réparation vasculaire, Naruse et coll. ont exploité un modèle de diabète induit par la streptozotocine chez le rat *nude* afin de tester le potentiel réparateur des progéniteurs endothéliaux du sang placentaire humain dans la neuropathie périphérique du diabète (27). Les progéniteurs endothéliaux ont préalablement subi une période d'expansion en culture pendant 7 jours. Ils ont ensuite été injectés dans les muscles d'une des pattes arrière des rats. Une amélioration significative des vitesses de conduction du nerf sciatique a été constatée apparemment via une augmentation notable de la microcirculation.

III.2 Réparation neurologique

L'allogreffe de sang placentaire apporte un bénéfice certain chez les enfants atteints de maladies métaboliques congénitales se traduisant par une atteinte neurologique sévère. Dans la maladie de Krabbe, liée à un déficit en galactocérébrosidase, enzyme indispensable au catabolisme d'un constituant majeur de la myéline, l'allogreffe de sang placentaire pratiquée avant l'apparition des symptômes neurologiques empêche la démyélinisation (9). Dans la maladie de Hürler ou mucopolysaccharidose de type I, l'allogreffe de sang placentaire stabilise

voire améliore la symptomatologie neurologique (41). De nombreuses études montrent qu'après greffe de CSH, certaines cellules du donneur se localisent dans divers types de tissus, et en particulier dans le tissu glial, restaurant ainsi le déficit enzymatique (20). En même temps, des études réalisées *in vitro* suggèrent que certaines cellules du sang placentaire humain sont capables de différenciation en cellules gliales et en neurones, au moins au plan phénotypique et moléculaire (36). Ainsi, après mise en culture en présence d'acide rétinoïque et de *nerve growth factor* (NGF), les cellules du sang placentaire humain expriment des marqueurs gliaux et neuronaux (37). L'injection intra-veineuse de cellules du sang placentaire humain après accident vasculaire ischémique ou traumatisme cérébral chez le rat est suivie d'une amélioration neurologique fonctionnelle, et des cellules humaines exprimant des marqueurs gliaux et neuronaux sont retrouvés dans le parenchyme cérébral (6, 25). Le sang placentaire contient-il des cellules souches capables de régénération ou de réparation des tissus nerveux *in vivo*? Il convient d'être prudent avant de conclure car l'hypothèse d'un phénomène de fusion cellulaire ne peut être totalement écartée. De plus, une étude dans un modèle murin d'accident vasculaire ischémique conclut que l'amélioration neurologique passe par une néoangiogénèse autour des régions cérébrales lésées (42). Les mécanismes d'action des cellules du sang placentaire dans ces modèles animaux sont donc loin d'être élucidés.

IV. SANG PLACENTAIRE ET INGÉNIERIE CELLULAIRE

Tout récemment, une remarquable technique de différenciation à large échelle des cellules hématopoïétiques CD34+ en hématies a été mise au point (12). Les cellules CD34+ peuvent être celles de la moelle, du sang périphérique après mobilisation par G-CSF, et du sang placentaire. La culture est réalisée en 3 étapes. La première dure 8 jours et les CD34+ sont cultivées en milieu sans sérum avec du *stem cell factor*, de l'hydrocortisone, de l'IL-3 et de l'érythropoïétine (Epo). Pendant cette période, les cellules prolifèrent et s'engagent vers la voie érythroblastique. La deuxième dure 3 jours et les cellules sont mises sur stroma avec de l'Epo. La dernière dure jusqu'à 10 jours et les cellules sont mises sur stroma sans cytokines. Au total, l'amplification des CD34+ est de $1,95 \times 10^6$ fois et le rendement de différenciation en globules rouges est de 100 %. Le contenu en hémoglobine des globules

rouges produits dépend de l'origine des CD34+ avec 94 % d'HbA2 si les CD34+ proviennent de la moelle ou du sang après mobilisation et 64 % d'HbF avec les CD34+ de sang de cordon. Les globules rouges sont fonctionnels et lorsqu'ils sont injectés à des souris NOD/SCID, ils survivent jusqu'à 3 jours après la transfusion. Ce modèle de différenciation permettra certainement des progrès dans la compréhension des pathologies du globule rouge. Dans le futur, une production de grade clinique à l'échelon industriel est envisagée et des banques de sangs rares pourraient être plus facilement constituées.

Résumé

*Le sang placentaire est riche en cellules souches hématopoïétiques (CSH) et sa capacité à restaurer l'hématopoïèse chez l'homme a été démontrée. L'allogreffe de sang placentaire à conditionnement myéloablatif représente maintenant une alternative reconnue à l'allogreffe de moelle ou de cellules souches périphériques en l'absence de donneur géno ou phéno-identique dans les hémopathies malignes et non malignes. Ses avantages sont l'immaturité immunologique des lymphocytes et des cellules présentatrices d'antigène qu'il contient, l'absence de risque pour la mère et l'enfant lors du prélèvement, sa conservation au sein de banques et la disponibilité rapide des unités validées congelées. Cependant, malgré le potentiel prolifératif élevé des CSH du sang placentaire, la reconstitution hématopoïétique après allogreffe est lente, en particulier chez l'adulte, rendant indispensables les efforts de recherche. Ceux-ci s'orientent vers l'expansion cellulaire, l'amélioration du homing des CSH du sang placentaire vers la moelle osseuse, la recherche d'alternatives à l'administration par voie intraveineuse et la double greffe. En parallèle, les greffes de sang placentaire à conditionnement non myéloablatif commencent à se développer. Dans le futur, il se pourrait que les cellules souches du sang placentaire soient exploitées dans d'autres indications que l'allogreffe de CSH. Une remarquable technique de production d'hématies *in vitro* à partir des cellules CD34+ a été mise au point. En outre, il a été montré que les cellules souches du sang placentaire possédaient des capacités de différenciation en cellules non hématopoïétiques, telles que les cellules endothéliales, les adipocytes, les chondrocytes, les ostéoblastes, les neurones, les astrocytes, les cardiomyocytes et les hépatocytes. Même si cette découverte laisse entrevoir des perspectives en médecine réparatrice, le chemin est encore long.*

Bibliographie

1. Adamkiewicz TV, Mehta PS, Boyer MW, Kedar A, Olson TA, Olson E, Chiang KY, Maurer D, Mogul MJ, Wingard JR, Yeager AM. Transplantation of unrelated placental blood cells in children with high-risk sickle cell disease. *Bone Marrow Transplant* 2004;34:405-411.
2. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, McGlave PB, Miller JS, Verfaillie CM, Wagner JE. Transplantation of 2 partially HLA-matched umbilical cord blood units to enhance engraftment in adults with hematologic malignancy. *Blood* 2005;105:1343-1347.
3. Barker JN, Weisdorf DJ, DeFor TE, Blazar BR, Miller JS, Wagner JE. Rapid and complete donor chimerism in adult recipients of unrelated donor umbilical cord blood transplantation after reduced-intensity conditioning. *Blood* 2003;102:1915-1919.
4. Bradley MB, Cairo MS. Cord blood immunology and stem cell transplantation. *Hum Immunol* 2005;66:431-446.
5. Castello S, Podesta M, Menditto VG, Ibatci A, Pitto A, Figari O, Scarpati D, Magrassi L, Bacigalupo A, Piaggio G, Frassoni F. Intra-bone marrow injection of bone marrow and cord blood cells: an alternative way of transplantation associated with a higher seeding efficiency. *Exp Hematol* 2004;32:782-787.
6. Chen J, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, Sanchez-Ramos J, Chopp M. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke* 2001;32:2682-2688.
7. Del Toro G, Satwani P, Harrison L, Cheung YK, Brigid Bradley M, George D, Yamashiro DJ, Garvin J, Skerrett D, Bessmertny O, Wolownik K, Wischhover C, van de Ven C, Cairo MS. A pilot study of reduced intensity conditioning and allogeneic stem cell transplantation from unrelated cord blood and matched family donors in children and adolescent recipients. *Bone Marrow Transplant* 2004;33:613-622.
8. Erices A, Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 2000;109:235-242.
9. Escolar ML, Poe MD, Provenzale JM, Richards KC, Allison J, Wood S, Wenger DA, Pietryga D, Wall D, Champagne M, Morse R, Krivit W, Kurtzberg J. Transplantation of umbilical-cord blood in babies with infantile Krabbe's disease. *N Engl J Med* 2005;352:2069-2081.
10. Frassoni F, Podesta M, Maccario R, Giorgiani G, Rossi G, Zecca M, Bacigalupo A, Piaggio G, Locatelli F. Cord blood transplantation provides better reconstitution of hematopoietic reservoir compared with bone marrow transplantation. *Blood* 2003;102:1138-1141.
11. Fruchtman SM, Hurllet A, Dracker R, Isola L, Goldman B, Schneider BL, Emre S. The successful treatment of severe aplastic anemia with autologous cord blood transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2004;10:741-742.
12. Giarratana MC, Kobari L, Lapillonne H, Chalmers D, Kiger L, Cynober T, Marden MC, Wajzman H, Douay L. Ex vivo generation of fully mature human red blood cells from hematopoietic stem cells. *Nat Biotechnol* 2005;23:69-74.
13. Gluckman E, Broxmeyer HA, Auerbach AD, Friedman HS, Douglas GW, Devergie A, Esperou H, Thierry D, Socie G, Lehn P, et al. Hematopoietic reconstitution in a patient with Fanconi's anemia by means of umbilical-cord blood from an HLA-identical sibling. *N Engl J Med* 1989;321:1174-1178.
14. Gluckman E, Rocha V, Arcese W, Michel G, Sanz G, Chan KW, Takahashi TA, Ortega J, Filipovich A, Locatelli F, Asano S, Fagioli F, Vowels M, Sirvent A, Laporte JP, Tiedemann K, Amadori S, Abecassis M, Bordignon P, Diez B, Shaw PJ, Vora A, Caniglia M, Garnier F, Ionescu I, Garcia J, Koegler G, Rebullia P, Chevret S; Eurocord Group. Factors associated with outcomes of unrelated cord blood transplant: guidelines for donor choice. *Exp Hematol* 2004;32:397-407.
15. Gluckman E, Rocha V, Boyer-Chammard A, Locatelli F, Arcese W, Pasquini R, Ortega J, Souillet G, Ferreira E, Laporte JP, Fernandez M, Chastang C. Outcome of cord-blood transplantation from related and unrelated donors. Eurocord Transplant Group and the European Blood and Marrow Transplantation Group. *N Engl J Med* 1997;337:373-381.
16. Henning RJ, Abu-Ali H, Balis JU, Morgan MB, Willing AE, Sanberg PR. Human umbilical cord blood mononuclear cells for the

treatment of acute myocardial infarction. *Cell Transplant* 2004;13:729-739.

17. Hirata Y, Sata M, Motomura N, Takanashi M, Suematsu Y, Ono M, Takamoto S. Human umbilical cord blood cells improve cardiac function after myocardial infarction. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327:609-614.

18. Jaroscak J, Goltry K, Smith A, Waters-Pick B, Martin PL, Driscoll TA, Howrey R, Chao N, Douville J, Burhop S, Fu P, Kurtzberg J. Augmentation of umbilical cord blood (UCB) transplantation with ex vivo-expanded UCB cells: results of a phase 1 trial using the AastromReplicell System. *Blood* 2003;101:5061-5067.

19. Kogler G, Sensken S, Airey JA, Trapp T, Muschen M, Feldhahn N, Liedtke S, Sorg RV, Fischer J, Rosenbaum C, Greschat S, Knipper A, Bender J, Degistirici O, Gao J, Caplan AI, Colletti EJ, Almeida-Porada G, Muller HW, Zanjani E, Wernet P. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. *J Exp Med* 2004;200:123-135.

20. Krivit W, Sung JH, Shapiro EG, Lockman LA. Microglia: the effector cell for reconstitution of the central nervous system following bone marrow transplantation for lysosomal and peroxisomal storage diseases. *Cell Transplant* 1995;4:385-392.

21. Laughlin MJ, Barker J, Bambach B, Koc ON, Rizzieri DA, Wagner JE, Gerson SL, Lazarus HM, Cairo M, Stevens CE, Rubinstein P, Kurtzberg J. Hematopoietic engraftment and survival in adult recipients of umbilical-cord blood from unrelated donors. *N Engl J Med* 2001;344:1815-1822.

22. Laughlin MJ, Eapen M, Rubinstein P, Wagner JE, Zhang MJ, Champlin RE, Stevens C, Barker JN, Gale RP, Lazarus HM, Marks DI, van Rood JJ, Scaradavou A, Horowitz MM. Outcomes after transplantation of cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:2265-2275.

23. Locatelli F, Rocha V, Chastang C, Arcese W, Michel G, Abecasis M, Messina C, Ortega J, Badell-Serra I, Plouvier E, Souillet G, Jouet JP, Pasquini R, Ferreira E, Garnier F, Gluckman E. Factors associated with outcome after cord blood transplantation in children with acute leukemia. Eurocord-Cord Blood Transplant Group. *Blood* 1999;93:3662-3671.

24. Locatelli F, Rocha V, Reed W, Bernaudin

F, Ertem M, Grafakos S, Brichard B, Li X, Nagler A, Giorgiani G, Haut PR, Brochstein JA, Nugent DJ, Blatt J, Woodard P, Kurtzberg J, Rubin CM, Miniero R, Lutz P, Raja T, Roberts I, Will AM, Yaniv I, Vermynen C, Tannoia N, Garnier F, Ionescu I, Walters MC, Lubin BH, Gluckman E; Eurocord Transplant Group. Related umbilical cord blood transplantation in patients with thalassemia and sickle cell disease. *Blood* 2003;101:2137-2143.

25. Lu D, Sanberg PR, Mahmood A, Li Y, Wang L, Sanchez-Ramos J, Chopp M. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury. *Cell Transplant* 2002;11:275-281.

26. Mommaas B, Stegehuis-Kamp JA, van Halteren AG, Kester M, Enczmann J, Wernet P, Kogler G, Mutis T, Brand A, Goulmy E. Cord blood comprises antigen-experienced T cells specific for maternal minor histocompatibility antigen HA-1. *Blood* 2005;105:1823-1827.

27. Naruse K, Hamada Y, Nakashima E, Kato K, Mizubayashi R, Kamiya H, Yuzawa Y, Matsuo S, Murohara T, Matsubara T, Oiso Y, Nakamura J. Therapeutic neovascularization using cord blood-derived endothelial progenitor cells for diabetic neuropathy. *Diabetes* 2005;54:1823-1828.

28. Nieda M, Nicol A, Denning-Kendall P, Sweetenham J, Bradley B, Hows J. Endothelial cell precursors are normal components of human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 1997;98:775-777.

29. Noort WA, Kruiselsbrink AB, in't Anker PS, Kruger M, van Bezooijen RL, de Paus RA, Heemskerk MH, Lowik CW, Falkenburg JH, Willemze R, Fibbe WE. Mesenchymal stem cells promote engraftment of human umbilical cord blood-derived CD34(+) cells in NOD/SCID mice. *Exp Hematol* 2002;30:870-878.

30. Ott I, Keller U, Knoedler M, Gotze KS, Doss K, Fischer P, Uribauer K, Debus G, von Bubnoff N, Rudelius M, Schomig A, Peschel C, Oostendorp RA. Endothelial-like cells expanded from CD34+ blood cells improve left ventricular function after experimental myocardial infarction. *FASEB J* 2005;19:992-994.

31. Rizzieri DA, Long GD, Vredenburg JJ, Gasparetto C, Morris A, Stenzel TT, Davis P, Chao NJ. Successful allogeneic engraftment of mismatched unrelated cord blood following a

- nonmyeloablative preparative regimen. *Blood* 2001;98:3486-3488.
32. Rocha V, Cornish J, Sievers EL, Filipovich A, Locatelli F, Peters C, Remberger M, Michel G, Arcese W, Dallorso S, Tiedemann K, Busca A, Chan KW, Kato S, Ortega J, Vowels M, Zander A, Souillet G, Oakill A, Woolfrey A, Pay AL, Green A, Garnier F, Ionescu I, Wernet P, Sirchia G, Rubinstein P, Chevret S, Gluckman E. Comparison of outcomes of unrelated bone marrow and umbilical cord blood transplants in children with acute leukemia. *Blood* 2001;97:2962-2971.
33. Rocha V, Labopin M, Sanz G, Arcese W, Schwerdtfeger R, Bosi A, Jacobsen N, Ruutu T, de Lima M, Finke J, Frassoni F, Gluckman E; Acute Leukemia Working Party of European Blood and Marrow Transplant Group; Eurocord-Netcord Registry. Transplants of umbilical-cord blood or bone marrow from unrelated donors in adults with acute leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:2276-2285.
34. Rubinstein P, Carrier C, Scaradavou A, Kurtzberg J, Adamson J, Migliaccio AR, Berkowitz RL, Cabbad M, Dobrila NL, Taylor PE, Rosenfield RE, Stevens CE. Outcomes among 562 recipients of placental-blood transplants from unrelated donors. *N Engl J Med* 1998;339:1565-77.
35. Saavedra S, Sanz GF, Jarque I, Moscardo F, Jimenez C, Lorenzo I, Martin G, Martinez J, De La Rubia J, Andreu R, Molla S, Llopis I, Fernandez MJ, Salavert M, Acosta B, Gobernado M, Sanz MA. Early infections in adult patients undergoing unrelated donor cord blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002;30:937-43.
36. Sanchez-Ramos JR. Neural cells derived from adult bone marrow and umbilical cord blood. *J Neurosci Res* 2002;69:880-893.
37. Sanchez-Ramos JR, Song S, Kamath SG, Zigova T, Willing A, Cardozo-Pelaez F, Stedeford T, Chopp M, Sanberg PR. Expression of neural markers in human umbilical cord blood. *Exp Neurol* 2001;171:109-115.
38. Sanz GF, Saavedra S, Planelles D, Senent L, Cervera J, Barragan E, Jimenez C, Larrea L, Martin G, Martinez J, Jarque I, Moscardo F, Plume G, Andreu R, Regadera AI, Garcia I, Molla S, Solves P, de La Rubia J, Bolufer P, Benlloch L, Soler MA, Marty ML, Sanz MA. Standardized, unrelated donor cord blood transplantation in adults with hematologic malignancies. *Blood* 2001;98:2332-2338.
39. Schmidt D, Mol A, Neunschwander S, Breymann C, Gossi M, Zund G, Turina M, Hoerstrup SP. Living patches engineered from human umbilical cord derived fibroblasts and endothelial progenitor cells. *Eur J Cardiothorac Surg* 2005;27:795-800.
40. Shpall EJ, Quinones R, Giller R, Zeng C, Baron AE, Jones RB, Bearman SI, Nieto Y, Freed B, Madinger N, Hogan CJ, Slat-Vasquez V, Russell P, Blunk B, Schissel D, Hild E, Malcolm J, Ward W, McNiece IK. Transplantation of ex vivo expanded cord blood. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;8:368-376.
41. Staba SL, Escobar ML, Poe M, Kim Y, Martin PL, Szabolcs P, Allison-Thacker J, Wood S, Wenger DA, Rubinstein P, Hopwood JJ, Krivit W, Kurtzberg J. Cord-blood transplants from unrelated donors in patients with Hurler's syndrome. *N Engl J Med* 2004;350:1960-1969.
42. Taguchi A, Soma T, Tanaka H, Kanda T, Nishimura H, Yoshikawa H, Tsukamoto Y, Iso H, Fujimori Y, Stern DM, Naritomi H, Matsuyama T. Administration of CD34+ cells after stroke enhances neurogenesis via angiogenesis in a mouse model. *J Clin Invest* 2004;114:330-338.
43. Wadhwa PD, Lazarus HM, Koc ON, Jaroscak J, Woo D, Stevens CE, Rubinstein P, Laughlin MJ. Hematopoietic recovery after unrelated umbilical cord-blood allogeneic transplantation in adults treated with in vivo stem cell factor (R-MetHuSCF) and filgrastim administration. *Leuk Res* 2003;27:215-220.
44. Wagner JE, Kernan NA, Steinbuch M, Broxmeyer HE, Gluckman E. Allogeneic sibling umbilical-cord-blood transplantation in children with malignant and non-malignant disease. *Lancet* 1995;346:214-219.
45. Zheng Y, Watanabe N, Nagamura-Inoue T, Igura K, Nagayama H, Tojo A, Tanosaki R, Takaue Y, Okamoto S, Takahashi TA. Ex vivo manipulation of umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells with recombinant human stem cell factor can up-regulate levels of homing-essential molecules to increase their trans migratory potential. *Exp Hematol* 2003;31:1237-1246.