

## RECOMMANDATIONS POUR LE TEST CLONOGENIQUE DES PROGÉNITEURS CFU-GM

Ce chapitre général a pour but d'améliorer la standardisation du test clonogénique des progéniteurs CFU-GM (Colony Forming Unit – Granulocyte Macrophage) en appliquant des règles de mise en culture et de lecture des colonies adaptées aux différents prélèvements de CSH (Cellules Souches Hématopoïétiques).

Ces recommandations s'appliquent au test clonogénique des progéniteurs CFU-GM réalisé dans le cadre du contrôle de la qualité des greffons hématopoïétiques.

### PRINCIPE

Le test clonogénique des progéniteurs CFU-GM repose sur la mise en évidence indirecte des progéniteurs hématopoïétiques présents dans l'échantillon par leur capacité à former des colonies sur milieu semi-solide contenant différents facteurs de croissance. Ces facteurs permettent la prolifération et la différenciation des cellules immatures en divers types de cellules matures. Les colonies sont dénombrées et identifiées généralement après 14 jours d'incubation sauf justification contraire.

### MILIEU DE CULTURE

Afin d'éviter les variations liées à la préparation, utiliser des milieux de culture semi-solides (à base de méthylcellulose ou de collagène) prêts à l'emploi dont les matières premières ainsi que le lot de milieu qui en est issu ont été qualifiés par le fabricant. Différentes références sont disponibles dans le commerce. Il appartient à chaque centre de déterminer la clonogénicité CFU-GM moyenne obtenue sur la référence utilisée et de la vérifier à chaque changement de lot, par comparaison entre ancien et nouveau lot, sur un produit représentatif de l'activité. Cet échantillon devra répondre aux critères de conformité habituels. Pour ces vérifications, il est également possible de se constituer un témoin positif dont on déterminera la clonogénicité après décongélation. Respecter les conditions de conservation et d'utilisation définies par le fabricant du milieu.

#### Choix du milieu de culture :

Lorsque le test CFU-GM est dédié à la détermination du potentiel CFU-GM, il est recommandé d'utiliser un milieu sans Epo (Erythropoïétine). Lorsque le nombre de BFU-E (Burst Forming Unit - Erythroid) est également évalué pour des besoins propres aux producteurs, le milieu avec Epo sera maintenu mais il est conseillé d'utiliser un milieu où la proportion de BFU-E ne dépasse pas 60%. Toutefois, l'expérience montre qu'avec un support semi-solide à base de méthylcellulose, l'usage d'un milieu sans EPO rend la lecture plus facile.

### PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON POUR MISE EN CULTURE

Afin d'avoir un échantillon le plus représentatif possible de la poche dont il est issu, l'échantillon sera mis en culture après une dilution adaptée dans le milieu de base (ex : IMDM/ Iscove's Modified Dulbecco's Medium) avec le cas échéant, une étape de déplaquettisation et/ou de sédimentation des globules rouges pour les échantillons de MO (Moelle Osseuse) totale ou d'USP (Unité de Sang Placentaire). Pour ces derniers, il est en effet possible d'éliminer les globules rouges (désérythrocytation) en utilisant des milieux de sédimentation préférables à la séparation par gradient de densité qui est déconseillée ou bien en pratiquant une lyse des globules rouges. Au préalable, la méthode de désérythrocytation devra être validée et le taux de clonogénicité établi. Il est cependant primordial de ne pas modifier le ratio cellules totales/CD34 de l'échantillon afin de déterminer avec fiabilité la dose de CFU-GM/kg. Les produits congelés ne nécessitent pas de désérythrocytation.

---

*Les prescriptions générales et les monographies générales de la Pharmacopée européenne ainsi que le préambule de la Pharmacopée française s'appliquent.*

## DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION D'ENSEMENCEMENT

### En fonction du pourcentage de CD34+ dans l'échantillon

L'ensemencement en fonction du nombre de CD34+ permet d'obtenir une corrélation entre le nombre de progéniteurs CFU-GM et le nombre de CD34+ présents dans le greffon. La mise en culture se fera donc d'après la numération des cellules CD34+ par cytométrie en flux (Ph Eur 2.7.23). Toutefois, compte-tenu de contraintes propres aux laboratoires impliqués dans le contrôle des greffons, il n'est pas toujours possible de connaître les résultats de cette numération avant la culture. Dans cette situation, et dans le cas des produits de cytophérèse, il est recommandé d'estimer le nombre de CD34+ attendu sur la base de la valeur en CD34+ dans le sang mobilisé avant la cytophérèse et du rendement en CD34+ de la cytophérèse.

La détermination de la concentration d'ensemencement, décrite dans une procédure, doit être effectuée sur la base de la numération des CD34+ sauf justification contraire. Lorsque l'on dispose du pourcentage de CD34+, elle peut être calculée de la façon suivante :

$n \text{ CD34+}/\text{boîte de 1 mL} = \% \text{ CD34+} \times N \text{ leucocytes /mL}$  où n correspond au nombre de CD34+ ciblés selon la nature des cellules.

### En fonction de la nature des cellules

Pour les CSP (Cellules Souches Périphériques) avant congélation :

- Définir la concentration d'ensemencement en fonction du pourcentage de CD34+ de l'échantillon afin d'avoir environ 150 à 300 CD34+/mL selon le milieu utilisé en visant un nombre de colonies CFU-GM par boîte compris entre 20 et 80. Prendre en compte la clonogénicité moyenne obtenue sur le milieu utilisé.
- Si le pourcentage de CD34+ n'est pas connu, réaliser au moins 2 concentrations différentes (à définir sur la base de la médiane du % de CD34+ dans les produits préparés)<sup>1</sup>. L'absence de la connaissance du nombre de CD34+ conduit à utiliser 2 à 3 concentrations cellulaires finales, généralement, 10 000, 40 000 et 80 000 cellules/mL.
- Il est possible de s'appuyer sur les CD34+ circulants pour estimer la concentration de cellules nucléées à ensemercer<sup>2</sup>.

Le nombre de cellules CD34+ peut également être ajusté selon la pathologie pour les greffons autologues (à définir au niveau de chaque centre) et selon le contexte, les greffons allogéniques pouvant présenter une clonogénicité moyenne supérieure à celle des greffons autologues.

Pour les prélèvements de moelles osseuses (MO) totales, il est recommandé d'ensemencer de 250 à 500 CD34+/mL selon la stratégie de fenêtrage utilisée (soit 500/mL lorsque l'ensemble des CD34+ a été pris en compte). La MO comporte en effet une population hétérogène de cellules CD34+ allant de faiblement brillantes à très brillantes.

Pour les prélèvements de sangs placentaires « totaux », un ensemencement en fonction du pourcentage de CD34+ conduit souvent à une concentration cellulaire d'environ 100 000 cellules/mL (150-300 CD34+/mL). Il est conseillé d'ajouter une concentration à 40 000 cellules/mL pour mieux apprécier les colonies si un tapis de globules rouges était trop important dans la boîte de concentration supérieure.

Pour les USP miniaturisées, si le contrôle est fait avant congélation, il est conseillé de réaliser le test CFUGM après concentration (buffycoat).

<sup>1</sup> Par exemple, pour les CSP reçues dans le cadre du contrôle externe, médiane égale à 0,8%, 35 à 40 000 cellules/mL conviennent donc à de nombreux cas. Mais risque de ne pas évaluer correctement les produits à taux très bas ou très fort de CD34+

<sup>2</sup> En réalisant au préalable une validation interne de sa méthode pour vérifier le nombre de CD34+ réellement mis en culture

*Les prescriptions générales et les monographies générales de la Pharmacopée européenne ainsi que le préambule de la Pharmacopée française s'appliquent.*

Pour les cellules CD34+ immuno-sélectionnées, il est recommandé d'ensemencer autour de 500 CD34+/mL.

Pour les produits décongelés, ensemencer entre 250 et 500 CD34+ viables /mL selon les milieux de culture et le type de produits utilisés du fait d'une clonogénicité moyenne plus faible que pour les CSH avant congélation.

### Ensemencement différé

Des résultats optimaux sont obtenus lorsque le test fonctionnel est réalisé après le prélèvement du produit de thérapie cellulaire et jusqu'à 24H post-prélèvement. L'ensemencement au-delà de 24H et inférieur à 48H ne devrait être réservé qu'à certains cas tels que les produits issus de donneurs du fichier des donneurs volontaires de CSH et pour correspondre au plus près à la qualité du greffon tel qu'il va être délivré. Dans le cas d'un ensemencement différé de l'injection du produit, il est conseillé de valider des conditions de conservation adaptées. Les paramètres qui pourraient influencer la stabilité tels que la richesse en granulocytes, la cellularité, la viabilité, l'âge du donneur sont à considérer pour l'interprétation des résultats.

### LECTURE DES COLONIES ET VALIDATION ANALYTIQUE

- Lecture au microscope inversé de la totalité de la boîte à 14 jours ou moins si justifié, y compris les colonies présentes sur les bords. La dose CFU-GM est déterminée en prenant en compte les colonies CFU-GM, CFU-G (Colony Forming Unit – Granulocyte) et CFU-GEMM (Colony Forming Unit – Granulocyte Erythroid Megakaryocyte Macrophage) et en distinguant les colonies macrophagiques.
- Sur le plan technique, le test est validé si au moins 40 colonies totales par boîte ou au moins 20 CFU-GM par boîte sont obtenues.
- Si plusieurs concentrations ont été réalisées, lire les boîtes correspondant le mieux au nombre de colonies attendues au regard du nombre de CD34+ ensemencées. Si le nombre de CD34 du produit n'est pas disponible à J14, lire toutes les concentrations, sachant que les boîtes les plus riches ne sont pas forcément synonyme de meilleure clonogénicité en raison d'une possible saturation.

### INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats sont généralement exprimés en CFU-GM/10<sup>5</sup> cellules, en CFU-GM/mL de la poche ou CFU-GM/kg de receveur et la clonogénicité doit être déterminée (nombre de CFU-GM/nombre de CD34 x 100). Les doses sont calculées de la façon suivante :

**Nombre de CFU-GM/10<sup>5</sup> cellules =**  
(Nb de CFU-GM comptées/Nb de cellules ensemencées) x 100 000

**Nombre de CFU-GM/mL =**  
(Nb de CFU-GM comptées/Nb de cellules ensemencées) x [concentration en leucocytes de la poche]

**Nombre de CFU-GM/kg =** (si greffon attribué)  
(Nb CFU-GM/mL x volume de la poche en mL) / poids du patient

Pour le critère de fonctionnalité du greffon, une dose minimale de CFU-GM/kg doit être définie au regard de la corrélation CD34/CFU-GM évaluée en condition intra-laboratoire et selon l'origine des CSH. Si malgré la validation technique de l'ensemble des conditions opératoires, la culture présente moins de 20 CFU-GM ou une clonogénicité anormalement faible (pour les CSP, <10%) ou forte (>40%), il convient d'alerter sur la qualité du greffon et d'identifier les causes dans la mesure du

*Les prescriptions générales et les monographies générales de la Pharmacopée européenne ainsi que le préambule de la Pharmacopée française s'appliquent.*

possible. A titre indicatif, le taux de clonogénicité attendu est généralement compris pour les CSP et USP entre 10 % et 30 %, pour les prélèvements de moelle osseuse entre 5 % et 20 %, pour les produits décongelés CSP autour de 10 %, pour les USP décongelées entre 10 % et 20 %.

## VALIDATION DE LA TECHNIQUE

La mise en œuvre de cet essai nécessite une validation technique dont au moins les 2 premières étapes devront être réalisées préalablement à son utilisation pour la qualification des greffons.

- Répétabilité intra-essai (déterminer le coefficient de variation pour chaque type de colonies lues en réalisant au moins 12 boîtes de culture (6 tubes) avec le même échantillon et le même milieu).
- Variations inter-lecteurs : déterminer la variation minimale acceptable entre les lecteurs pour leur habilitation à la lecture des colonies.
- Si nécessaire, étude de la linéarité lors de la mise en place du test (par exemple, si les performances du milieu ne sont pas connues.)
- Étude de la clonogénicité inter-essais.
- Participation à des contrôles externes: Reproductibilité inter-laboratoires.
- Vérification inter-lots des milieux de culture.
- Définir une validation qui soit à la fois statistiquement suffisante et acceptable au regard du coût élevé des milieux de culture.

---

*Les prescriptions générales et les monographies générales de la Pharmacopée européenne ainsi que le préambule de la Pharmacopée française s'appliquent.*