

Utilisation thérapeutique des cellules souches hématopoïétiques du sang de cordon

Les cellules souches hématopoïétiques, présentes dans le sang de cordon, sont spécifiquement enrichies en progéniteurs immatures. Leur utilisation pour la transplantation est relativement récente et a stimulé les recherches sur ces cellules. Elles forment *in vitro* plus de colonies et ont une meilleure expansion et une meilleure survie que les cellules souches du sang périphérique et le sang collecté sur un seul cordon lors d'un accouchement permet de repeupler la moelle d'un enfant. Les lymphocytes du sang de cordon sont, pour une large part, immatures. Même lors de transplantations non identiques dans le système HLA, on n'a observé que très peu de réactions du transplant contre l'hôte, ce qui a encouragé à créer des banques de sang de cordon utilisables chez les enfants, mais peut-être aussi chez les adultes. L'étude du transfert de gène dans des cellules souches hématopoïétiques du sang de cordon, à l'aide de vecteurs rétroviraux, a montré, de plus, des taux d'intégration provirale très élevés dans ces cellules, ce qui pourrait en faire un matériel de choix pour la thérapie génique.

Éliane Gluckman
Edgardo Carosella

ADRESSE

E. Gluckman : professeur d'hématologie, chef du service de greffe de moelle et directeur du laboratoire de biologie de la moelle osseuse. E. Carosella : directeur du laboratoire de recherche sur la biologie des cellules souches CEA DSV, Hôpital Saint-Louis, 1, avenue Claude-Vellefaux, 75010 Paris, France.

Les cellules souches hématopoïétiques issues de la moelle osseuse sont utilisées en thérapeutique depuis plus de vingt ans. De nombreux malades, atteints d'hémopathies malignes, d'aplasies médullaires ou de maladies héréditaires de la moelle ont pu ainsi être guéris. La technique de greffe de moelle est très simple puisqu'elle consiste à prélever de la

moelle osseuse du donneur par ponction-aspiration au niveau des os iliaques et à la réinjecter par voie intraveineuse au receveur. La moelle a pu ainsi être utilisée, soit en situation allogénique, provenant alors d'un donneur le plus souvent HLA identique apparenté, soit en situation autologue, après prélèvement chez le malade lors d'une période de rémission.

L'identification et la caractérisation des cellules souches hématopoïétiques font l'objet de travaux constants dans le but, d'une part, de les sélectionner en éliminant les éléments indésirables comme les cellules tumorales (purge) ou les cellules responsables de la réaction du greffon contre l'hôte (déplétion en cellules T) et, d'autre part, de les modifier par l'introduction de nouveaux gènes (transfert de gènes). Cette caractérisation est encore incomplète, mais il est actuellement possible d'obtenir un certain degré de purification des cellules souches hématopoïétiques en s'appuyant sur des marqueurs de membrane. De même, il est devenu possible, grâce à l'amélioration des techniques de cultures à long terme et à la découverte de facteurs de croissance et de lymphokines, d'obtenir une expansion de ces cellules *in vitro* tout en maintenant leur capacité de repeupler un individu à court et à long terme. Un courant de recherche consiste à étudier les cellules souches hématopoïétiques non médullaires prélevées, soit dans le sang après mobilisation par des facteurs de croissance hématopoïétiques, soit dans le sang du cordon ombilical recueilli à la naissance (*m/s n° 9, vol. 5, p. 698*).

Propriétés du sang de cordon ombilical

Le siège de la production de cellules souches hématopoïétiques change au cours de la vie embryonnaire et fœtale. D'abord produites dans la vésicule vitelline, puis dans le foie, les cellules migrent vers la moelle pendant toute la grossesse, si bien qu'à la naissance elles sont encore présentes dans le sang en grande quantité. Ultérieurement, le siège de l'hématopoïèse sera exclusivement médullaire, sauf dans les cas pathologiques. Dans le sang, leur nombre, très faible, peut être augmenté par l'injection de facteurs de croissance hématopoïétiques, comme le G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), ou au cours de la phase de réparation faisant suite à une chimiothérapie. Cela est à la base de l'utilisation des cellules souches hématopoïétiques périphériques dans les autogreffes. La présence de cellules souches hématopoïétiques dans le sang de cor-

don est connue depuis longtemps ; en revanche, leur utilisation pour la transplantation est une idée relativement récente [1, 2]. La première greffe de sang de cordon a été faite chez un enfant porteur de maladie de Fanconi en 1988 [3]. Depuis, près de 40 greffes ont été rapportées au registre international de greffe de sang de cordon [4]. C'est depuis ces premières tentatives de greffes que les propriétés des cellules de sang de cordon ont été étudiées de façon extensive (*m/s n° 10, vol. 9, p. 1110*). Ces études ont porté sur trois points : (1) quantifier les progéniteurs myéloïdes et en étudier la clonogénicité et les capacités d'expansion *in vitro* ; (2) préciser les propriétés immunologiques du sang de cordon ; (3) mettre au point le transfert de gènes dans les progéniteurs hématopoïétiques présents dans le sang de cordon.

Caractérisation des progéniteurs myéloïdes

Dès les premières études précliniques, faites par Broxmeyer [5], il était démontré que le prélèvement d'un seul sang de cordon, d'un volume d'environ 100 ml, contenait suffisamment de progéniteurs hématopoïétiques, mesurés en nombre de colonies granuleuses mixtes ou érythroïdes, pour permettre une prise de la greffe. Ultérieurement, il était démontré, par plusieurs auteurs, que ces cellules différaient de celles de la moelle en terme de taille des colonies [6], de survie en culture à long terme [7] et en terme d'expansion *in vitro* [8], sans qu'il fût possible de préciser s'il s'agissait d'une différence qualitative ou quantitative.

Les cellules souches hématopoïétiques expriment l'antigène CD34 à leur surface ; seulement 1 % d'entre elles sont CD34+CD38- ou CD34+CD45RA^{lo}CD71^{lo} dans la moelle et 4 % dans le sang de cordon ; c'est cette sous-population très minoritaire des cellules CD34+ qui contient les cellules souches hématopoïétiques [8, 9]. La cellule souche est normalement quiescente ; lorsqu'elle entre en cycle, par blocage du TGF- β endogène, son expansion est de 14 000 fois avec les CD34+CD38- de la moelle adulte [10]. La comparaison des propriétés d'expansion *in vi-*

tro des cellules CD34+CD45RA^{lo}CD71^{lo} issues de la moelle adulte, du sang de cordon ombilical et du foie fœtal a montré que la fraction de cellules capables de répondre aux facteurs de croissance en milieu sans sérum et leur capacité de produire des cellules souches CD34 diminuaient de façon importante avec l'augmentation de l'âge du donneur. La fraction souche est présente dans la population CD34+ CD38- HLA DR+ mais seulement 9 % de ces cellules ont une différenciation à la fois lymphoïde et myéloïde, suggérant qu'une purification encore plus grande pourrait être obtenue [8, 9]. Ces données ont été confirmées dans les expériences de greffe *in vivo* chez la souris SCID Hu [11-13] ou les expériences de greffes *in utero* chez le mouton [14]. Il a été démontré que les cellules de sang de cordon humaines, injectées à la souris SCID, pouvaient établir 10 % à 50 % de chimerisme à 28 jours sans ajout de facteurs de croissance hématopoïétiques, alors que la prise de cellules médullaires humaines nécessite impérativement l'addition de ces facteurs.

Il semblerait qu'il y ait des différences de cycle cellulaire entre les cellules du sang de cordon et celles de la moelle adulte. Environ 97 % des cellules CD34+ DR+ et CD34+DR- du sang de cordon sont en phase G₀/G₁, mais elles prolifèrent rapidement, si bien qu'au bout de 36 heures il n'en reste que 50 % en phase G₀/G₁. Dans la moelle adulte, 80 % des CD34+DR+ et 91 % des CD34+DR- sont en G₀/G₁. Après 36 heures de culture, 80 % des deux populations sont encore en G₀/G₁. Une des interprétations possibles serait que les cellules fœtales et néonatales seraient programmées de façon préférentielle vers la prolifération, ce qui serait un avantage pour l'expansion [15, 16]. Ces données soulignent l'intérêt de l'utilisation des cellules fœtales et néonatales pour la transplantation ; en effet, il semblerait que le nombre minimal de cellules nécessaires pour une prise de la greffe à long terme soit différent selon la source de cellules utilisées [17].

De nombreux points restent encore très controversés : quel est le nombre minimum de cellules souches nécessaires pour obtenir une reconstitu-

RÉFÉRENCES

1. Metcalf D. The basic biology of hematopoiesis. In : Metcalf D, ed. *Hematopoietic colony stimulating factors*. Amsterdam : Elsevier Sciences, 1984 : 1
2. Broxmeyer HE, Douglas GW, Hangoc G, et al. Human umbilical cord blood as a potential source of transplantable stem/progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989 ; 86 : 3828-32.
3. Gluckman E, Broxmeyer HE, Auerbach AD, 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 : 1174-8.
4. Wagner JE, Kernan NA, Broxmeyer HE, Gluckman E. Allogeneic umbilical cord blood transplantation : report of results in 26 patients. *Blood* 1993 ; 10 (suppl 1) : 86a.
5. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S, et al. Growth characteristics and expansion of human umbilical cord blood and estimation of its potential for transplantation in adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 89 : 4109-13.
6. Broxmeyer HE, Carow C, Hangoc G, Hendric PC, Cooper S. Hematopoietic stem and progenitor cells in human umbilical cord blood. *Hum Gene Transfer* 1991 ; 219 : 95-102.
7. Migliaccio G, Migliaccio AR, Druzin ML, Giardina PJV, Zsebo KM, Adamson JW. Long-term generation of colony-forming cells in liquid culture of CD34+ cord blood cells in the presence of recombinant human stem cell factor. *Blood* 1992 ; 79 : 2620-7.
8. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Cytokine-induced selective expansion and maturation of erythroid versus myeloid progenitors from purified cord blood precursor cells. *Blood* 1993 ; 81 : 3252-8.
9. Mayani H, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization of functionally distinct subpopulations of CD34+ cord blood cells in serum-free long-term cultures supplemented with hematopoietic cytokines. *Blood* 1993 ; 82 : 2664-72.
10. Hatzfeld J, Li ML, Brown EL, Sookdeo H, Levesque JP, O'Toole T, Gurney C, Clark SC, Hatzfeld A. Release of early human hematopoietic progenitors from quiescence by antisense transforming growth factor Beta 1 or Rb oligonucleotides. *J Exp Med* 1991 ; 174 : 925-9.
11. Dick JE, Lapidot T, Pflumio F. Transplantation of normal and leukemic human bone marrow into immune-deficient mice - development of animal models for human hematopoiesis. *Immunol Rev* 1991 ; 124 : 25-43.

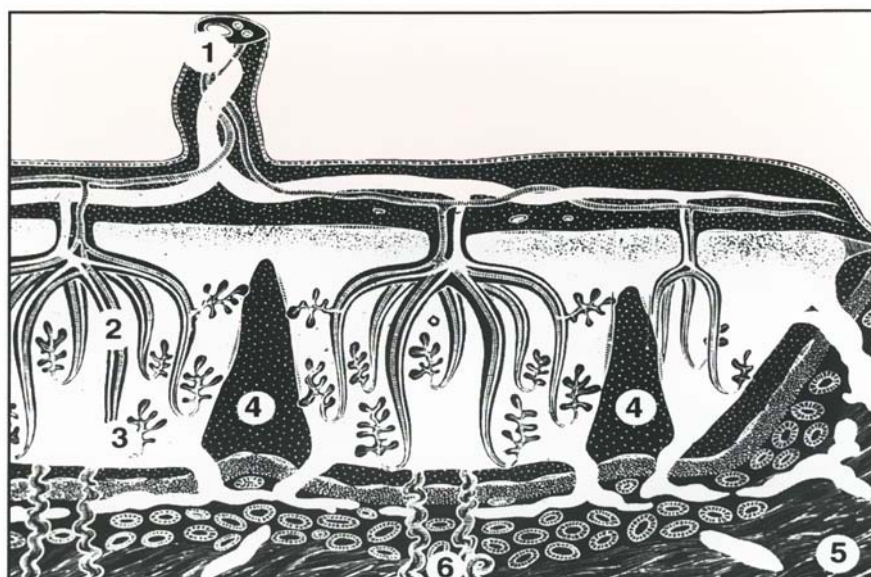


Figure 1. **La vascularisation du placenta.** 1 : artère et veine ombilicales dans le cordon (circulation fœtale) ; 2 : vaisseaux de la villosité choriale ; 3 : frondaison villositaire ; 4 : chambre intervillieuse ; 5 : myomètre ; 6 : artères hélicines (circulation maternelle).

tion lympho-hématopoïétique à long terme [5, 11, 18, 19] ? Il semblerait que, chez la souris, 30 cellules souches, très purifiées, soient suffisantes pour obtenir une prise à long terme. Chez l'homme, ces chiffres ne sont pas connus et doivent probablement varier en fonction des cellules utilisées, adultes ou fœtales, du type de greffe (autologue ou allogénique, HLA identique ou non), de l'état du stroma médullaire et de l'utilisation ou non d'un conditionnement lympho ou myéloablatif. L'expansion *in vitro* permet-elle l'autorenouvellement ou, au contraire, favorise-t-elle la différenciation ? Si cette seconde hypothèse était juste, cela signifierait que l'expansion *in vitro* favoriserait la différenciation aux dépens de l'expansion des cellules souches primitives, diminuant ainsi les capacités de reconstitution à long terme de l'hématopoïèse après greffe.

Propriétés immunologiques des cellules du sang de cordon

Un des avantages théoriques de l'utilisation du sang de cordon pour la transplantation est la réduction du risque de réaction du greffon contre l'hôte (*graft-versus-host disease*, GVH) en raison de l'immaturité immunologique du nouveau-né. Le petit

nombre de greffes rapportées à ce jour a montré la faible fréquence de la GVH en situation familiale HLA identique ou à partir d'un donneur familial différent pour un ou deux antigènes du système HLA. Cependant, il est impossible de conclure sur ces données cliniques car le nombre de cas est insuffisant et la totalité des greffes de sang de cordon rapportée a été effectuée chez l'enfant où l'incidence de la GVH est plus faible que chez l'adulte. De même, cette diminution de l'incidence et de la gravité de la GVH pourrait s'accompagner d'une réduction de l'effet antileucémique des cellules allogéniques injectées, ou effet GVL (*graft-versus-leukemic cells*), comme cela a été observé après greffe de moelle osseuse allogénique déplétée en cellules lymphoïdes T. L'ignorance où on est aujourd'hui de la nature des cellules effectrices de la GVH et de la GVL ne permet pas de répondre à cette question hormis par l'analyse et la comparaison des patients traités par des cellules de moelle ou de sang de cordon.

La réaction du greffon contre l'hôte peut être liée aux cellules du donneur mais aussi dans le cas du sang fœtal à une contamination par des lymphocytes maternels. La présence de globules rouges maternels dans le

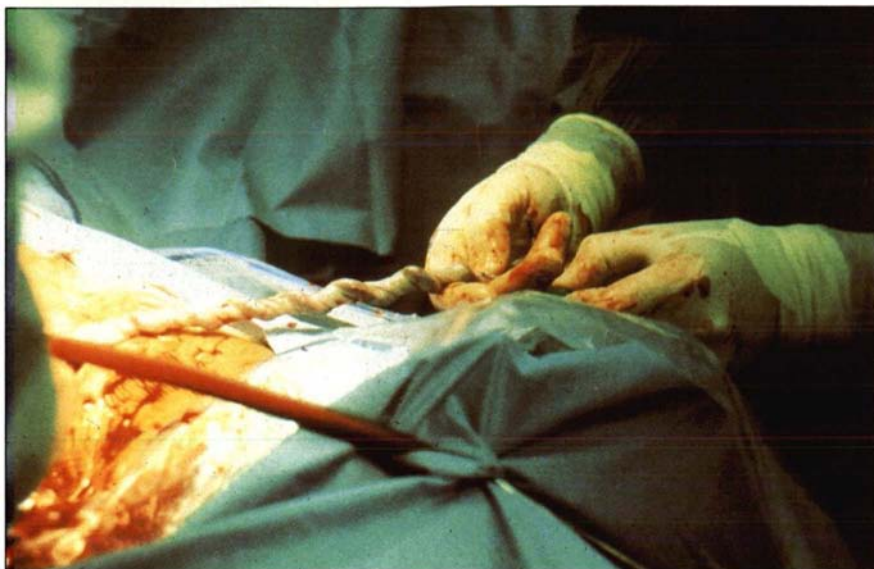


Figure 2. Prélèvement de sang de cordon au cours d'une césarienne.

sang du cordon est bien établie ; elle est de l'ordre de 0,6 à 2,3 ml. A l'aide de sondes minisatellites, une étude a permis d'observer une contamination par du sang maternel dans un cas sur 47 [20]. La signification biologique et clinique de ce phénomène n'est pas connue. L'existence de GVH à la naissance, chez des enfants atteints de déficit immunitaire combiné sévère, a été attribuée, sans preuves formelles, au passage transplacentaire de cellules maternelles. A l'inverse, des cellules maternelles ont été identifiées chez des nouveau-nés normaux ou avec déficit immunitaire congénital, sans qu'il y ait eu de conséquence délétère pour l'enfant, ce qui amène à s'interroger sur les capacités fonctionnelles de ces cellules.

La GVH aiguë est le résultat de la reconnaissance, par les cellules lymphoïdes T du donneur, d'allo-antigènes présents chez le receveur. La prolifération lymphoïde T et la sécrétion de lymphokines de l'inflammation comme l'IL2, le TNF α et l'interféron γ provoquent des destructions tissulaires, soit directes, soit indirectes par l'activation d'autres effecteurs comme les cellules cytotoxiques T, les cellules *natural killer* et les cellules B productrices d'anticorps.

Il semblerait qu'il y ait des différences notables entre les sous-populations lymphoïdes des cellules du sang de cordon et celles du sang adulte sans qu'il soit possible de savoir s'il s'agit d'une différence qualitative ou quantitative. Les différences observées dans la littérature semblent liées à des différences de technique (selon que l'analyse a été faite sur du sang total ou sur des cellules séparées par centrifugation en milieu Ficoll Hypaque). De plus, l'analyse des résultats est rendue très difficile par la grande variabilité observée d'un échantillon à l'autre.

Le nombre de cellules T (CD3) et des sous-populations lymphocytaires T auxiliaires (CD4) ou T suppresseurs/cytotoxiques (CD8) augmente au cours de la gestation. A la 17^e semaine de gestation, le nombre de lymphocytes représente 50 % du nombre final, contrastant ainsi avec celui des neutrophiles qui est très faible jusqu'à la naissance [22]. Il existe dans les cellules T du sang de cordon ombilical des sous-populations phénotypiquement immatures CD3-8⁺ et CD3-7⁺ qui n'existent pas dans le sang périphérique adulte. Le pourcentage de cellules CD3⁺ est significativement plus faible que dans le sang adulte (41 \pm 8, contre 71 \pm

6) ; la majorité de ces cellules T sont TcR α/β ⁺ (43 \pm 12), le pourcentage des cellules exprimant TcR γ/δ étant très faible (1 % à 3 %), identique à celui mesuré dans le sang périphérique adulte. Le pourcentage des lymphocytes CD4⁺ est légèrement inférieur à celui des lymphocytes du sang périphérique adulte (respectivement, 31 \pm 9 et 42 \pm 7). En ce qui concerne la population CD8⁺, elle est pratiquement similaire à celle du sang périphérique (respectivement, 26 \pm 6 et 32 \pm 6). Si nous considérons seulement les cellules CD3⁺CD8⁺ et CD3⁺CD4⁺, autrement dit si nous ne tenons pas compte des cellules CD3⁻CD8⁺ ou CD3⁻CD4⁺, le rapport T4/T8 est plus élevé dans les cellules du sang de cordon que dans les cellules du sang périphérique (respectivement, 2,4 et 1,7). La plupart des cellules T du sang de cordon sont des cellules naïves qui expriment les phénotypes CD45 RA ; les cellules *natural killer*, NK, (CD16⁺ 56⁺) sont plus nombreuses dans le sang de cordon (25 \pm 11) que dans le sang périphérique (13 \pm 6). Enfin, le pourcentage des cellules B (CD19⁺) est comparable à celui du sang périphérique (16 \pm 5 et 11 \pm 3 respectivement). La seule différence est que plus de 50 % des cellules B du sang de cordon sont CD5⁺ (10 \pm 7) [23-25].

Sur le plan des analyses fonctionnelles, il est accepté que la réponse aux mitogènes, dans le cadre de la stimulation cellulaire induite par la PHA, le PWM ou la ConA, en un temps déterminé, ne définit pas exactement les différences entre les réponses prolifératives des cellules du sang de cordon et du sang périphérique ; dans ces conditions, la réponse proliférative des cellules du sang de cordon peut être diminuée ou non, suivant les auteurs [23-27]. En fait, si l'on compare les aires des courbes de prolifération à différents jours de culture, on observe la même prolifération pour les deux types cellulaires, mais selon des cinétiques différentes [26].

La réponse proliférative allogénique des cellules T du sang de cordon est la même ou plus élevée que celle observée dans les cultures de sang périphérique adulte ou de moelle osseuse ; en revanche, leur capacité stimulante est diminuée. L'équipe de Deacock *et al.*, à partir d'analyses de

RÉFÉRENCES

12. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Huang T, Caceres Cortes J, Minden M, *et al.* A cell initiating human acute myeloid leukemia after transplantation in SCID mice. *Nature* 1994 ; 367 : 645-8.
13. Vormoor J, Lapidot T, Pflumio F, Risdon G, Paterson B, Broxmeyer HE, *et al.* Immature human cord blood progenitors engraft and proliferate to high levels in severe combined immunodeficient mice. *Blood* 1994 ; 83 : 2489-97.
14. Srour EF, Zanjani ED, Cornetta K, Traycoff CM, Flake AW, Hedrick M. Persistence of human multilineage, self renewing lymphohematopoietic stem cells in chimeric sheep. *Blood* 1993 ; 82 : 3333-42.
15. Traycoff CM, Abboud MR, Laver J, *et al.* Evaluation of the *in vitro* behavior of phenotypically defined populations of umbilical cord blood hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 1994 ; 22 : 215-22.
16. Broxmeyer HE, Hangoc G, Cooper S. Clinical and biological aspects of human umbilical cord blood as a source of transplantable hematopoietic stem and progenitor cells. *Bone Marrow Transplant* 1992 ; 9 : 64-7.
17. Cardoso AA, Li ML, Batard P, Hatzfeld A, Brown EL, Levesque JP, Sookdeo H, Panterne B, Sansilvestri P, Clark SC, Hatzfeld J. Release from quiescence of CD34+ CD38- human umbilical cord blood cells reveals their potentiality to engraft adults. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 8707-11.
18. Thierry D, Hervatin F, Traineau R, *et al.* Hematopoietic progenitors cells in cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1992 ; 9 : 101-4.
19. Hows JM, Marsh JCW, Bradley BA, *et al.* Human cord blood. A source of transplantable stem cells. *Bone Marrow Transplant* 1992 ; 9 : 105-8.
20. Huang S, Terstappen LWMM. Lymphoid and myeloid differentiation of single human CD34+, HLA-DR+, CD38- hematopoietic stem cells. *Blood* 1994 ; 83 : 1515-26.
21. Socie G, Gluckman E, Carosella E, Brosard Y, Lafon C, Brison O. Search for maternal cells in human umbilical cord blood by polymerase chain reaction amplification of two minisatellite sequences. *Blood* 1994 ; 83 : 340-4.
22. Thiliganathan B, Mansur CA, Morgan G, Nicolaidis KH. Fetal T-lymphocyte subpopulation in normal pregnancies. *Fetal Diag Ther* 1992 ; 7 : 53-61.
23. Harris DT, Schumacher JM, Locascio J, *et al.* Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T-lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992 ; 86 : 10006-10.
24. Griffiths Chu S, Patterson AK, Berger CL, Edelson RL, Chu CA. Characterization of immature T-cell subpopulations in neonatal blood. *Blood* 1984 ; 64 : 296-300.
25. Rabian-Herzog C, Lesage S, Gluckman E, *et al.* Characterization of lymphocyte subpopulations in cord blood. *Bone Marrow Transplant* 1992 ; 9 : 64-7.
26. Pirenne-Ansard H, Eljaafari A, Bourillon A, *et al.* Comparison of T-cell functional changes during childhood with the ontogeny of CDW29 and CD45RA expression on CD4+ T-cells. *Pediatr Res* 1992 ; 32 : 81-6.
27. Risdon G, Gaddy J, Stehman FB, Broxmeyer HE. Proliferative and cytotoxic response of human cord blood T-lymphocytes following allogeneic stimulation. *Cell Immunol* 1994 ; 154 : 14-24.
28. Deacock JS, Schwarer PA, Bridge J, *et al.* Evidence that umbilical cord blood contains a higher frequency of HLA class II-specific alloreactive T cells than adult peripheral blood. *Transplantation* 1992 ; 53 : 1128-34.
29. Bessler H, Sirota L, Notti I, Milo T, Djaldetti M. IL2 receptor gene expression and IL2 production by human pre-term newborn cells. *Clin Exp Immunol* 1993 ; 93 : 479-83.
30. Pirenne-Ansart Y, Paillard F, De Groote D, *et al.* Gene modulation in activated newborn lymphocytes. *Pediatr Res* 1994 ; in press.
31. Bensussan A, Gluckman E, El Marsafy S, *et al.* By55mAb delineates within human cord blood and bone marrow lymphocytes distinct cell subsets mediating cytotoxic activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994 ; 91 : 9136-40.
32. Bofill M, Akbaar AN, Salmon M, Robinson M, Burford G, Janossy G. Immature CD45RA low Ro low T cells in the human cord blood. I. Antecedents of CD45 Ra+ unprimed T cells. *J Immunol* 1994 ; 152 : 5613-23.
33. Cicuttini FM, Martin M, Salvaris E, *et al.* Support of human cord blood progenitor cells on human stromal cell lines transformed by SV40 large T-antigen under the influence of an inducible (metallothionein) promoter. *Blood* 1992 ; 80 : 102-12.
34. Moritz T, Keller DC, Williams DA. Human cord blood cells as targets for gene transfer. Potential use in genetic therapies of severe combined immunodeficiency disease. *J Exp Med* 1993 ; 178 : 529-36.
35. Reisbach G, Bartke I, Kempkes B, *et al.* Characterization of hemopoietic cell populations from human cord blood expressing c-kit. *Exp Hematol* 1993 ; 21 : 74-9.
36. Lu L, Xiao M, Clapp DW, Li ZH, Broxmeyer HE. High efficiency retroviral mediated gene transduction into single isolated immature and replatable CD34(3+) hematopoietic stem/progenitor cells from human umbilical cord blood. *J Exp Med* 1993 ; 178 : 2089-96.

dilution limite, a mis en évidence une fréquence cellulaire T auxiliaire alloréactive très supérieure dans le sang de cordon par rapport au sang périphérique [28]. Mais, contrairement aux cellules du sang périphérique, la stimulation des cellules du sang de cordon par les anticorps anti-CD2 et anti-CD3 induit une réponse proliférative très faible. Celle-ci est indépendante de la concentration des anticorps utilisés et de la durée de la culture et n'atteint la valeur observée avec le sang adulte qu'après l'âge de 5 ans.

La réponse proliférative aux interleukines IL2, IL4 et IL7 des cellules T du sang de cordon est similaire ou plus élevée que celle des cellules T du sang périphérique [26]. La quantité et le type de cytokine sécrétée par les lymphocytes T du sang de cordon dépend de la stimulation employée : en réponse allogénique, les quantités d'IL2 et d'interféron γ sécrétés au troisième jour de culture sont beaucoup plus importantes dans le surnageant de culture des cellules du sang périphérique que dans celui des cellules du sang de cordon [26] ; en réponse mitogénique, la sécrétion d'IL2 induite par la PHA est, contrairement à ce que l'on observe en réponse allogénique, plus élevée dans les surnageants des cultures de cellules du sang de cordon. Cette différence est encore plus marquée (6 à 7 fois) quand la mesure est réalisée sur des cultures dès 48 h [28]. Néanmoins, sur des essais faits après culture de durée variable, on ne trouve pas de différence de sécrétion de l'IL2 par les cellules du sang de cordon et du sang adulte. Les cellules du sang de cordon sécrètent très faiblement de l'interféron γ et de l'IL3. En réponse aux anticorps anti-CD2 ou CD3, la sécrétion d'IL2 et d'interféron γ dans les surnageants de culture de sang de cordon est très faible ou absente. Dans les mêmes conditions, la sécrétion d'IL3 est aussi très faible et inférieure à celle observée dans les cultures des cellules du sang périphérique [29].

La cytotoxicité allogénique des cellules T du sang de cordon (aussi bien cytotoxicité primaire que secondaire) est significativement plus faible que celle observée sur les effecteurs T du sang adulte [26]. La fréquence des précurseurs cytotoxiques allogé-

niques CTL semble plus élevée (mais pas de façon statistiquement significative) dans les cellules du sang adulte que dans les cellules du sang de cordon [27]. En fait, il semblerait que l'activité cytotoxique des cellules du sang de cordon soit essentiellement le fait des cellules NK [30]. A l'aide d'un anticorps ne reconnaissant que les cellules fonctionnellement cytotoxiques du sang de cordon (BY55), il a été démontré qu'elles sont exclusivement de phénotype NK (CD3-CD56+CD16+CD11b+BY55) [31]. Par ailleurs, il a été démontré que le sang de cordon était enrichi en cellules NK immatures, ce qui pourrait lui conférer des propriétés suppressives [32]. Au total, les cellules du sang de cordon sont caractérisées par un phénotype lié à la présence de sous-populations T et B immatures. Avec une diminution des cellules T CD3+, la plupart de ces cellules CD4 sont des cellules naïves (CD45 RA). Fonctionnellement, bien que la réponse proliférative allogénique aux mitogènes et à l'IL2, l'IL4 et l'IL7 soit conservée, la réponse aux anticorps CD2 et CD3 est déficiente, ainsi que la possibilité de stimulation allogénique et la réponse cytotoxique allogénique. Le rôle des cellules NK dans la genèse des réactions de GVH et de GVL est controversé. L'étude des sous-populations BY55+ et des sous-populations NK immatures pourrait apporter quelques éclaircissements sur le mécanisme de ces complications.

Transfert de gènes dans les cellules de sang de cordon ombilical

Une difficulté rencontrée dans l'utilisation des cellules souches hématopoïétiques pour le transfert de gènes et la thérapie génique est liée à l'absence de caractérisation des cellules souches totipotentes, à la nécessité de mettre la cellule en cycle pour l'intégration d'un vecteur rétroviral et au petit nombre de cellules intégrant ce virus. De nombreuses études sont en cours *in vitro* et chez l'animal pour essayer d'améliorer le rendement. Parmi les voies de recherche, on note l'étude de nouveaux vecteurs à tropisme préférentiel pour les cellules souches hématopoïétiques, l'expansion *in vitro* de cellules souches hématopoïétiques extrêmement purifiées et l'utilisation de cellules fœtales et néonatales [33-35].

Il a été montré par plusieurs auteurs que les cellules fœtales et néonatales sont, *in vitro*, plus infectables par les vecteurs rétroviraux que les cellules adultes [36]. Une intégration provirale de 40 % peut ainsi être détectée dans des cultures de progéniteurs issus de sang de cordon dans un milieu contenant IL3, IL6 et KL (*kit-ligand* ou *stem cell factor*) [35]. Avec l'*adeno-associated virus* (AAV), des taux d'intégration de l'ordre de 70 % ont été obtenus dans les colonies granulocytaires [38].

Les premiers essais de thérapie génique à partir de sang de cordon ont été faits chez trois enfants porteurs d'un déficit en adénosine désaminase (ADA). Le diagnostic avait été fait pour ces enfants *in utero* d'un déficit en ADA, maladie entraînant un déficit immunitaire sévère. Le sang de cordon, prélevé à la naissance, a été enrichi en cellules CD34 et exposé pendant trois jours à une culture contenant le virus LASN (contenant le gène codant pour ADA et neoR) puis réinjecté aux enfants. Les résultats sont encore très préliminaires mais il semblerait que le vecteur ait été détecté dans le sang de deux enfants sans qu'il soit possible, à ce stade, de savoir s'il y aura une correction partielle ou totale du déficit à long terme (résultats non publiés).

Utilisation clinique des cellules du sang de cordon ombilical

Résultats des greffes faites à partir du sang de cordon ombilical

A la suite de la première greffe, faite avec succès en 1988, chez un enfant porteur de maladie de Fanconi avec le sang du cordon de sa sœur HLA identique [3], une cinquantaine de greffes de sang de cordon ont été rapportées [4, 39-44]. Dans la plupart des cas, le donneur était un membre de la fratrie. Viennent d'être rapportées les données concernant 34 enfants, 22 enfants atteints de maladie maligne et 12 atteints de maladie non maligne, greffés d'octobre 1988 à novembre 1993. L'âge médian était de 5 ans (0,8 à 16 ans) [4]. Le donneur était HLA identique dans 23 cas

et avec une à trois différences HLA dans 11 cas. Le temps moyen pour atteindre 500 neutrophiles par microlitre de sang après la greffe a été de 25 jours. Chez trois patients, la greffe n'a pas pris et, chez un malade, on a observé une reconstitution autologue. Il n'y a pas eu de GVH chez les patients greffés avec un donneur HLA identique ou ne présentant qu'une seule différence HLA. Chez les six sujets présentant plusieurs différences HLA, une GVH n'a été observée que dans deux cas. Il est encore trop tôt pour savoir si ce faible nombre de GVH s'accompagnera d'une augmentation du rejet et des rechutes leucémiques.

Par ailleurs, deux enfants ont été greffés avec du sang de cordon non apparenté provenant du *New York Blood Center* (non publié). Les deux donneurs étaient différents pour un antigène HLA. Le premier patient, âgé de 3 ans, atteint d'une leucémie en rechute réfractaire à la chimiothérapie, a eu une prise de la greffe mais est décédé d'une pneumonie interstitielle, le second semble aller bien trois mois après la greffe.

Ces résultats confirment donc que le sang d'un seul cordon contient un nombre suffisant de cellules hématopoïétiques pour assurer une prise de la greffe à long terme, que la fréquence de la GVH a été faible, même en situation non HLA identique et que la reconstitution immunologique a été tout à fait satisfaisante. L'étude du chimérisme lympho-hématopoïétique à court et à long terme a montré une reconstitution du type du donneur chez les six malades survivant à long terme à l'hôpital Saint-Louis.

Les banques de sang de cordon

Ces résultats ont justifié la constitution de banques de sang de cordon ombilical dans lesquelles les cellules, prélevées à la naissance, sont typées pour le système HLA et conservées congelées pour être utilisées en situation autologue, allogénique, apparentée ou non. L'équipe de P. Rubinstein a congelé plus de 2000 recueils de sang de cordon [45]. Des efforts similaires se font également en Europe où, sous l'égide du groupe européen des greffes de moelle (EBMT), les techniques de prélèvement, de

RÉFÉRENCES

37. Zhou SZ, Cooper S, Kang LY, Ruggieri L, Heimfeld S, Srivastava A, Broxmeyer HE. Adeno associated virus 2-mediated high efficiency gene transfer into immature and mature subsets of hematopoietic progenitor cells in human umbilical and cord blood. *J Exp Med* 1994 ; 179 : 1867-75.
38. Zhou SZ, Cooper S, Kang LY, Srivastava A, Broxmeyer HE. Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer in hematopoietic progenitor cells in human umbilical cord blood. *Blood* 1993 ; 10 (suppl 1) : 303a.
39. Wagner JE, Broxmeyer HE, Byrd RL, et al. Transplantation of umbilical cord blood after myeloablative therapy. Analysis of engraftment. *Blood* 1992 ; 79 : 1874-81.
40. Vilmer E, Sterkers G, Rahimy C, et al. HLA-mismatched cord blood transplantation in a patient with advanced leukemia. *Transplantation* 1992 ; 53 : 1155-7.
41. Gluckman E, Devergie A, Thierry D, et al. Clinical applications of stem cell transfusion from cord blood and rationale for cord blood banking. *Bone Marrow Transplant* 1992 ; 9 : 114-7.
42. Bogdanic V, Nemet D, Kastelan A, et al. Umbilical cord blood transplantation in a patient with Philadelphia chromosome positive chronic myeloid leukemia. *Transplantation* 1993 ; 56 : 477-9.
43. Vowels MR, Lamptang R, Berdoukas V, et al. Correction of X-linked lymphoproliferative disease by transplantation of cord blood stem cells. *N Engl J Med* 1993 ; 329 : 1623-5.
44. Kohlikumar M, Shahidi NT, Broxmeyer HE, et al. Haematopoietic stem progenitor cell transplant in Fanconi anaemia using HLA-matched sibling umbilical cord blood cells. *Br J Haematol* 1993 ; 85 : 419-22.
45. Rubinstein P, Rosenfeld RE, Adamson JW, Stevens CE. Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood* 1993 ; 81 : 1679-90.
46. Hows J, Bradley B, Joyce D, Thierry D, Gluckman E. Umbilical cord blood for transplantation. *Lancet* 1992 ; 340 : 921-2.
47. Gluckman E, Wagner J, Hows J, Kernan N, Bradley B, Broxmeyer HE. Cord blood banking for hematopoietic stem cell transplantation. An international cord blood transplant registry. *Bone Marrow Transplant* 1993 ; 11 : 199-200.
48. Harris DT, Schumacher MJ, Rychlik S, et al. Collection, separation and cryopreservation of umbilical cord blood for use in transplantation. *Bone Marrow Transplant* 1994 ; 13 : 135-43.

collecte, de congélation et de stockage ont été standardisées [46-48]. Les méthodes de mesure des progéniteurs hématopoïétiques, de détection des maladies virales et génétiques ont été comparées.

De nombreuses questions se posent après ces premiers essais : quel est le nombre minimum de cellules nécessaires et ce nombre sera-t-il suffisant pour un adulte ? La taille de la banque de sang de cordon doit-elle être de l'ordre de deux millions, comme celle des donneurs de moelle, ou peut-on orienter les prélèvements vers certaines populations moins bien représentées sur les fichiers actuels ? En effet, ceux-ci sont constitués surtout de donneurs blancs d'origine européenne ; or une grande proportion de malades vient de minorités ethniques ; en raison des différences d'haplotypes selon l'origine ethnique, on ne peut leur trouver de donneur sur les fichiers actuels. Si la réduction de la GVH se confirme, quel degré d'incompatibilité HLA pourra-t-il être toléré ? Seules l'augmentation du nombre de patients et l'évaluation des résultats permettront de répondre à ces questions.

L'avantage théorique des banques de sang de cordon est évident. Outre l'absence de risques pour le donneur, la source de cellules est illimitée ; il y a $3,5 \times 10^6$ naissances par an aux États-Unis, ce qui représente une quantité énorme de cellules souches hématopoïétiques inexploitées ! Un autre avantage est la diminution du délai entre la demande d'un donneur et la greffe puisque les cellules congelées sont immédiatement disponibles alors que la recherche d'un donneur de moelle peut durer plusieurs mois.

Tous ces aspects ont été longuement discutés au cours de plusieurs réunions et seul l'avenir permettra de dire si l'enthousiasme suscité par cette méthode permettra de guérir un plus grand nombre de malades ■

Summary

Therapeutic use of cord blood stem cells

Human hematopoietic precursors stem cells are under extensive study, as they are used for allogeneic or autologous transplantation, for positive or negative selection of some cell subsets, or for the introduction of new genes. Cord blood hematopoietic stem cells were shown to differ from adult bone marrow stem cells, because of their enrichment in immature progenitors. When compared to adult bone marrow stem cells, hematopoietic stem cells from cord blood yield a higher number of bigger colonies, they survive and expand better in long term culture and they have a higher efficiency of gene transfer. Immunologically, they are immature and enriched in naive inactivated lymphoid cells. It has been demonstrated that a single unit of cord blood contains enough stem cells to engraft children with various malignant or non malignant marrow disorders. Even, in HLA partially mismatched transplants, the number and severity of graft versus host disease has been limited. This has promoted the establishment of cord blood banks for use of unrelated stem cell transplants in children and perhaps in adults.

TIRÉS À PART

E. Gluckman.