



<http://portaildoc.univ-lyon1.fr>

Creative commons : Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale -
Pas de Modification 2.0 France (CC BY-NC-ND 2.0)



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr>

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1

INSTITUT DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

FACULTÉ DE PHARMACIE

8, avenue Rockefeller - 69373 LYON Cedex 08

Année 2016

THÈSE n° 34-2016

MÉMOIRE

**DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES DE PHARMACIE INDUSTRIELLE ET
BIOMÉDICALE**

Soutenu devant le jury interrégional

Le 21 Octobre 2016

Par Nacira ABBASSI

Née le 05 Avril 1985 à Souk-Ahras, ALGERIE

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 1988 tient lieu de

T H E S E

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Étude de la stabilité du milieu de culture et des couches nourricières
utilisés pour la production de médicaments de thérapie innovante-
préparés ponctuellement (feuillets épidermiques)**

JURY

Président : Pr. Fabrice PIROT

Membres : Dr. Céline AUXENFANS

Dr. Pascale PASCAL

Dr. Adrien ROSSARY

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD LYON 1

- | | |
|---|-----------------------|
| • Président de l'Université | M. Frédéric FLEURY |
| • Présidence du Conseil Académique | M. Hamda BEN HADID |
| • Vice-Président du Conseil d'Administration | M. Didier REVEL |
| • Vice-Président de la Commission Recherche | M. Fabrice VALLEE |
| • Vice-Président de la Formation et de la Vie Universitaire | M. Philippe CHEVALIER |

Composantes de l'Université Claude Bernard Lyon 1

SANTÉ

UFR de Médecine Lyon Est	Directeur : M. Jérôme ETIENNE
UFR de Médecine Lyon Sud Charles Mérieux	Directeur : Mme Carole BURILLON
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directrice : Mme Christine VINCIGUERRA
UFR d'Odontologie	Directeur : M. Denis BOURGEOIS
Institut des Techniques de Réadaptation	Directeur : M. Yves MATILLON
Département de formation et centre de recherche en Biologie Humaine	Directeur : Anne-Marie SCHOTT

SCIENCES ET TECHNOLOGIES

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. Fabien DE MARCHI
UFR de Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives (STAPS)	Directeur : M. Yannick VANPOULLE
Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon (ex ISTIL)	Directeur : M. Pascal FOURNIER
I.U.T. LYON 1	Directeur : M. Christophe VITON
Institut des Sciences Financières et d'Assurance (ISFA)	Directeur : M. Nicolas LEBOISNE
ESPE	Directeur : M. Alain MOUGNIOTTE

ISPB – Faculté de Pharmacie Lyon
LISTE DES DÉPARTEMENTS PÉDAGOGIQUES

DÉPARTEMENT PÉDAGOGIQUE DE SCIENCES PHYSICO-CHIMIQUE ET PHARMACIE GALÉNIQUE

- **CHIMIE ANALYTIQUE, GÉNÉRALE, PHYSIQUE ET MINÉRALE**
Monsieur Raphaël TERREUX (Pr)
Monsieur Pierre TOULHOAT (Pr - PAST)
Madame Julie-Anne CHEMELLE (MCU)
Monsieur Lars-Petter JORDHEIM (MCU-HDR)
Madame Christelle MACHON (AHU)

- **PHARMACIE GALÉNIQUE -COSMÉTOLOGIE**
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Madame Stéphanie BRIANCON (Pr)
Madame Françoise FALSON (Pr)
Monsieur Hatem FESSI (Pr)
Monsieur Fabrice PIROT (PU - PH)
Monsieur Eyad AL MOUAZEN (MCU)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Ghania HAMDI-DEGOBERT (MCU-HDR)
Monsieur Plamen KIRILOV (MCU)
Monsieur Damien SALMON (AHU)

- **BIOPHYSIQUE**
Monsieur Richard COHEN (PU – PH)
Madame Laurence HEINRICH (MCU)
Monsieur David KRYZA (MCU – PH - HDR)
Madame Sophie LANCELOT (MCU - PH)
Monsieur Cyril PAILLER-MATTEI (MCU-HDR)
Madame Élise LEVIGOUREUX (AHU)

DÉPARTEMENT PÉDAGOGIQUE PHARMACEUTIQUE DE SANTÉ PUBLIQUE

- **DROIT DE LA SANTÉ**
Monsieur François LOCHER (PU – PH)
Madame Valérie SIRANYAN (MCU - HDR)

- **ÉCONOMIE DE LA SANTÉ**
Madame Nora FERDJAOUI MOUMJID (MCU - HDR)
Madame Carole SIANI (MCU – HDR)
Monsieur Hans-Martin SPÄTH (MCU)

- **INFORMATION ET DOCUMENTATION**
Monsieur Pascal BADOR (MCU - HDR)

- **HYGIÈNE, NUTRITION, HYDROLOGIE ET ENVIRONNEMENT**
Madame Joëlle GOUDABLE (PU – PH)

- **INGÉNIERIE APPLIQUÉE À LA SANTÉ ET DISPOSITIFS MÉDICAUX**
Monsieur Gilles AULAGNER (PU – PH)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)

- **QUALITOLOGIE – MANAGEMENT DE LA QUALITE**
Madame Alexandra CLAYER-MONTEMBAULT (MCU)
Monsieur Vincent GROS (MCU-PAST)
Madame Audrey JANOLY-DUMENIL (MCU-PH)
Madame Pascale PREYNAT (MCU PAST)

- **MATHEMATIQUES – STATISTIQUES**
Madame Claire BARDEL-DANJEAN (MCU-PH)
Madame Marie-Aimée DRONNE (MCU)
Madame Marie-Paule PAULTRE (MCU - HDR)

DÉPARTEMENT PÉDAGOGIQUE SCIENCES DU MÉDICAMENT

- **CHIMIE ORGANIQUE**
Monsieur Pascal NEBOIS (Pr)
Madame Nadia WALCHSHOFER (Pr)
Monsieur Zouhair BOUAZIZ (MCU - HDR)
Madame Christelle MARMINON (MCU)
Madame Sylvie RADIX (MCU -HDR)
Monsieur Luc ROCHEBLAVE (MCU - HDR)
- **CHIMIE THÉRAPEUTIQUE**
Monsieur Roland BARRET (Pr)
Monsieur Marc LEBORGNE (Pr)
Monsieur Laurent ETTOUATI (MCU - HDR)
Monsieur Thierry LOMBERGET (MCU - HDR)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
- **BOTANIQUE ET PHARMACOGNOSIE**
Madame Marie-Geneviève DIJOUX-FRANCA (Pr)
Madame Marie-Emmanuelle HAY DE BETTIGNIES (MCU)
Madame Isabelle KERZAON (MCU)
Monsieur Serge MICHALET (MCU)
- **PHARMACIE CLINIQUE, PHARMACOCINÉTIQUE ET ÉVALUATION DU MÉDICAMENT**
Madame Roselyne BOULIEU (PU – PH)
Madame Magali BOLON-LARGER (MCU - PH)
Madame Christelle CHAUDRAY-MOUCHOUX (MCU-PH)
Madame Céline PRUNET-SPANNO (MCU)
Madame Catherine RIOUFOL (MCU- PH-HDR)

DÉPARTEMENT PÉDAGOGIQUE DE PHARMACOLOGIE, PHYSIOLOGIE ET TOXICOLOGIE

- **TOXICOLOGIE**
Monsieur Jérôme GUITTON (PU – PH)
Madame Léa PAYEN (PU-PH)
Monsieur Bruno FOUILLET (MCU)
Monsieur Sylvain GOUTELLE (MCU-PH)
- **PHYSIOLOGIE**
Monsieur Christian BARRES (Pr)
Monsieur Daniel BENZONI (Pr)
Madame Kiao Ling LIU (MCU)
Monsieur Ming LO (MCU - HDR)
- **PHARMACOLOGIE**
Monsieur Michel TOD (PU – PH)
Monsieur Luc ZIMMER (PU – PH)
Monsieur Roger BESANCON (MCU)
Monsieur Laurent BOURGUIGNON (MCU-PH)
Madame Evelyne CHANUT (MCU)
Monsieur Nicola KUCZEWSKI (MCU)
Madame Dominique MARCEL CHATELAIN (MCU-HDR)
- **COMMUNICATION**
Monsieur Ronald GUILLOUX (MCU)

- **ENSEIGNANTS ASSOCIES TEMPORAIRES**
Monsieur Olivier CATALA (Pr-PAST)
Madame Corinne FEUTRIER (MCU-PAST)
Madame Mélanie THUDEROZ (MCU-PAST)

DÉPARTEMENT PÉDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMÉDICALES A

- **IMMUNOLOGIE**
Monsieur Jacques BIENVENU (PU – PH)
Monsieur Guillaume MONNERET (PU-PH)
Madame Cécile BALTER-VEYSSEYRE (MCU - HDR)
Monsieur Sébastien VIEL (AHU)
- **HÉMATOLOGIE ET CYTOLOGIE**
Madame Christine VINCIGUERRA (PU - PH)
Madame Brigitte DURAND (MCU - PH)
Monsieur Yohann JOURDY (AHU)
- **MICROBIOLOGIE ET MYCOLOGIE FONDAMENTALE ET APPLIQUÉE AUX BIOTECHNOLOGIES INDUSTRIELLES**
Monsieur Patrick BOIRON (Pr)
Monsieur Jean FRENEY (PU – PH)
Monsieur Frédéric LAURENT (PU-PH-HDR)
Madame Florence MORFIN (PU – PH)
Monsieur Didier BLAHA (MCU)
Madame Ghislaine DESCOURS (MCU-PH)
Madame Anne DOLEANS JORDHEIM (MCU-PH)
Madame Emilie FROBERT (MCU - PH)
Madame Véronica RODRIGUEZ-NAVA (MCU-HDR)
- **PARASITOLOGIE, MYCOLOGIE MÉDICALE**
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Nathalie ALLIOLI (MCU)
Madame Samira AZZOUZ-MAACHE (MCU - HDR)

DÉPARTEMENT PEDAGOGIQUE DES SCIENCES BIOMÉDICALES B

- **BIOCHIMIE – BIOLOGIE MOLÉCULAIRE - BIOTECHNOLOGIE**
Madame Pascale COHEN (Pr)
Monsieur Alain PUISIEUX (PU - PH)
Madame Émilie BLOND (MCU-PH)
Monsieur Karim CHIKH (MCU - PH)
Madame Carole FERRARO-PEYRET (MCU - PH-HDR)
Monsieur Boyan GRIGOROV (MCU)
Monsieur Hubert LINCET (MCU-HDR)
Monsieur Olivier MEURETTE (MCU)
Madame Caroline MOYRET-LALLE (MCU – HDR)
Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Stéphanie SENTIS (MCU)
Monsieur Anthony FOURIER (AHU)
- **BIOLOGIE CELLULAIRE**
Madame Bénédicte COUPAT-GOUTALAND (MCU)
Monsieur Michel PELANDAKIS (MCU - HDR)
- **INSTITUT DE PHARMACIE INDUSTRIELLE DE LYON**
Madame Marie-Alexandrine BOLZINGER (Pr)
Monsieur Daniel HARTMANN (Pr)
Monsieur Philippe LAWTON (Pr)
Madame Sandrine BOURGEOIS (MCU)
Madame Marie-Emmanuelle MILLION (MCU)
Madame Alexandra MONTEMBAULT (MCU)

Madame Angélique MULARONI (MCU)
Madame Valérie VOIRON (MCU - PAST)

- **Assistants hospitalo-universitaires sur plusieurs départements pédagogiques**
Madame Florence RANCHON
- **Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)**
Madame Charlotte BOUARD (86ème section)
Madame Laure-Estelle CASSAGNES (85ème section)
Monsieur Karim MILADI (85ème section)
Madame Laurence PAGES (87ème section)

Pr : Professeur

PU-PH : Professeur des Universités, Praticien Hospitalier

MCU : Maître de Conférences des Universités

MCU-PH : Maître de Conférences des Universités, Praticien Hospitalier

HDR : Habilitation à Diriger des Recherches

AHU : Assistant Hospitalier Universitaire

PAST : Personnel Associé Temps Partiel

REMERCIEMENTS

Aux membres du jury,

A Monsieur le Professeur Fabrice PIROT,

Je vous remercie d'avoir accepté de prendre part à ce projet en tant que président du jury et du temps que vous y avez consacré. Je vous remercie également de la confiance que vous m'avez accordé lors de mon passage dans votre service, ainsi que dans les projets auxquels vous m'avez permis de participer. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A Madame le Docteur Céline AUXENFANS,

Pour m'avoir confié ce projet et accepté de diriger ma thèse. Je te remercie pour la confiance que tu m'as accordée pendant les deux ans et demi que j'ai passé à la BTC. Merci pour ta patience, tes conseils et ta gentillesse. J'ai énormément appris au cours de cette expérience très enrichissante. Merci pour tout.

A Madame le Docteur Pascale PASCAL,

Je vous remercie d'avoir accepté d'être membre de ce jury. J'ai apprécié de travailler à vos côtés ces deux dernières années. Merci pour votre gentillesse, votre bonne humeur et votre disponibilité.

A Monsieur le Docteur Adrien ROSSARY,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury, et d'avoir pris de votre temps afin de juger ce travail.

A toute l'équipe de la Banque de Tissus et Cellules,

A l'équipe CQ : Amélie, Sophie, Thomas et Fabienne, ce fut un réel plaisir de travailler à vos côtés. Merci pour votre aide pour la mise en œuvre de ce protocole, votre disponibilité et votre bonne humeur.

A l'équipe « cornées », Eric, Françoise et Dominique, merci pour votre gentillesse et votre accueil.

Adeline, merci pour ta bonne humeur et ta vivacité d'esprit qui fait que tu devines toujours ce qui se passe dans ma vie !

A toute l'équipe du Laboratoire des Substituts Cutanés,

A Odile Damour, même si je n'ai pas eu le privilège de travailler avec vous, c'est un honneur de faire partie de votre équipe.

A Marie-Rose, Lara et Elodie, pour les moments passés en ZAC, dans les bureaux ou encore en MTI... Elodie, je te souhaite pleins de bonnes choses après la fin de ta thèse. Lara, je te souhaite bien du courage pour finir ta thèse. Marie-Rose, je te souhaite le meilleur pour ta nouvelle vie à trois.

A Jonathan, merci de m'avoir formé à la culture cellulaire. Merci pour ton aide pour le FACS, et pour toutes les petites choses que tu as pris le temps de m'expliquer.

A Fanny et Sabine, les meilleures des 5AHU. Fanny, un grand merci pour le travail que nous avons réalisé ensemble, pas toujours dans les meilleures des conditions, mais toujours dans la bonne humeur !

A Serge et Laurent, pour votre disponibilité, vos conseils et votre aide précieuse.

A Sabah, pour ta bonne humeur et nos discussions.

A toute l'équipe LABSKIN : Aurélie, Sandrine et Marion, merci pour votre bonne humeur. J'ai beaucoup apprécié nos discussions, en ZAC, en Histo ou ailleurs !

Aux équipes hospitalières avec qui j'ai eu l'occasion de travailler pendant mon internat, **l'équipe Annonéenne et l'équipe Viennoise**, même si je quitte le monde hospitalier, je ne suis pas moins reconnaissante de tout ce que vous m'avez appris.

A tous mes co-internes, spécialement à mes deux préférés : **Julien et Baptiste**.

A mes parents, merci d'avoir toujours été présents pour moi, pour votre soutien, pour tous vos conseils et la confiance que vous m'accordez. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait pour moi.

A Amel, Amine, Maha, Virginie, Mahdi et Elise, merci pour votre présence, votre soutien sans faille et vos critiques, souvent constructives, mais pas que !!! Je vous adore.

A Inès, ma nièce préférée.

A tous mes amis, merci de faire partie de ma vie.

A mon petit rayon de soleil, Elyssa.

Sommaire

REMERCIEMENTS	6
Sommaire	8
Liste des abréviations	11
Liste des figures	12
Liste des tableaux	13
Introduction	14
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	15
I. La peau (3).....	16
A. La structure de la peau	17
1. L'épiderme	17
2. La jonction dermo-épidermique	21
3. Le derme.....	21
4. L'hypoderme	23
II. Les brûlures	23
A. Epidémiologie	24
B. Physiopathologie	24
C. Classification des brûlures	25
1. La surface de la brûlure	25
2. La profondeur de la brûlure.....	26
3. Le terrain de la brûlure	28
D. Prise en charge chirurgicale de la brûlure :	28
1. L'autogreffe.....	29
2. L'allogreffe cutanée	31
3. Les feuillets épidermiques de culture.....	32
III. Cadre juridique	34
A. Les médicaments de thérapie innovante.....	34
1. Réglementation européenne	35
2. Réglementation française :	37
3. Différents types de MTI	37
4. Matières premières :	38
5. Essais cliniques et Autorisation de Mise sur le Marché : spécificités des MTI	40
Objectifs	44
PARTIE EXPÉRIMENTALE.....	45

I. Protocole expérimental.....	46
A. Données d'entrée.....	46
B. Design du protocole	46
C. Données de sortie	48
II. Matériels et méthodes.....	48
A. Culture des kératinocytes :	48
B. Culture de fibroblastes :	49
C. Culture de feuillet épidermique.....	50
D. Contrôle qualité sur les CNI.....	50
1. Viabilité au bleu Trypan.....	50
E. Contrôles qualité sur le MCK.....	50
1. Stérilité	50
2. Recherche d'endotoxines bactériennes	51
F. Contrôles libératoires des FE	51
1. Contrôle d'aspect cellulaire.....	51
2. Stérilité	51
3. Potentiel clonogénique des kératinocytes (informatif).....	51
4. Contrôles de pureté cellulaire.....	52
5. Contrôle de l'intégrité des FE	53
6. Spécifications	53
III. Interface organisationnelle	54
Résultats	55
A. Viabilité des CNI au bleu trypan.....	55
B. Contrôle de stérilité du MCK.....	56
C. Contrôles d'apyrogénicité du MCK	56
D. Potentiel clonogénique	57
E. Contrôles de pureté cellulaire.....	59
1. Contrôle d'identité, de pureté et de fonctionnalité cellulaire : kératinocytes-CD49f.....	59
2. Recherche de mélanocytes contaminants – HMB45	60
3. Recherche de fibroblastes contaminants – CD90.....	61
F. Contrôle d'aspect et d'intégrité des FE.....	62
G. Récapitulatif des résultats.....	63
Discussion	64
Conclusions	67

ANNEXES	68
Annexe 1 : Procédé de fabrication des feuillets épidermiques	69
Annexe 2 : Liste des manipulations substantielles (45).....	70
Annexe 3 : Procédure de demande d'autorisation d'essai clinique de MTI	71
Annexe 4 : Exemple de feuille de résultat de Bact'Alert®	72
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	73

Liste des abréviations

AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM	Agence Nationale de Sécurité du Médicament
BPF	Bonnes Pratiques de Fabrication
BTC	Banque de Tissus et Cellules
CAT	Committee for Advanced Therapies
CE	Commission Européenne
CFE	Colony Forming Efficiency
CFU	Colony Forming Unit
CNI	Couches nourricières irradiés
CSP	Code de Santé Public
CTB	Centre de Traitement des Brûlés
CV/CE	Cellules vivantes / cellules Ensemencées
DMSO	Diméthyl Sulfoxyde
EC	Essais Cliniques
EGF	Epidermal Growth Factor
EMA	Agence Européenne du Médicament
EPU	Epidermal Proliferative Unit
FE	Feuillets Epidermiques
HCL	Hospices Civils de Lyon
JDE	Jonction Dermo-épidermique
MCK	Milieu de culture pour Kératinocytes
MEC	Matrice Extracellulaire
MTI	Médicaments de Thérapie Innovante
MTI-PP	Médicaments de Thérapie Innovante – Préparés Ponctuellement
NR	Non réalisé
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PD	Population Doubling
PSM	Poste de Sécurité Microbiologique
PTC	Produits de Thérapie Cellulaire
TC	Taux de Croissance
UE	Union Européenne
UI	Unité Internationale

Liste des figures

Figure 1. Structure de la peau d'après Géras (3).....	16
Figure 2 : Les différentes populations cellulaires de l'épiderme (3).....	19
Figure 3 : Unité de prolifération épidermique (EPU) (9).....	20
Figure 4 : Calcul des surfaces corporelles brûlées en pourcentage de la surface corporelle totale selon la table de Lund et Browder (22,23)	25
Figure 5 : Histologie de la profondeur d'une brûlure (22)	26
Figure 6 : Brûlure du second degré superficiel du dorsum de la main caractérisée par la présence de phlyctènes (23).....	27
Figure 7 : brûlure du troisième degré de la cuisse et du genou, avec escarre cutanée et veines superficielles thrombosées (23).....	28
Figure 8 : Prélèvement de greffon cutané à l'aide d'un Dermatôme (26).....	29
Figure 9 : Amplification et pose d'une greffe dermo-épidermique en filet (23,26).....	30
Figure 10 : Greffe mince amplifiée en pastille selon le procédé Humeca TM (23)	30
Figure 11 : Photo locaux de la BTC/HCL pour la production de MTI-PP.....	33
Figure 12 : Pourcentage d'études de médicaments de thérapies innovantes par pays en 2014 (22) 41	41
Figure 13 : Schéma du protocole de stabilité MCK-CNI.....	47
Figure 14 : Aspect microscopique des CNI ensemencées.....	55
Figure 15 : Viabilité des souches de fibroblastes irradiées utilisées pour les 3 études.	55
Figure 16 : Clones des trois souches testées.....	58
Figure 17 : Recherche de kératinocytes CD49f par cytométrie en flux	59
Figure 18 : Recherche de mélanocytes contaminants par Immunocytologie	60
Figure 19 : Recherche de fibroblastes contaminants par cytométrie en flux.....	61
Figure 20 : aspect des kératinocytes en culture.....	62
Figure 21 : intégrité physique des FE.....	62

Liste des tableaux

Tableau 1 : MTI ayant reçus une AMM.....	43
Tableau 2 : Identification des souches de kératinocytes et de CNI utilisées.....	48
Tableau 3 : Composition du milieu de culture pour kératinocytes (MCK).....	49
Tableau 4 : Tests et spécifications de validation du procédé FE.....	53
Tableau 5 : Planning du protocole expérimental.....	54
Tableau 6 : Résultats des contrôles de stérilité par Bact'Alert® à J0 et J30.....	56
Tableau 7 : Résultats des dosages d'endotoxines de 3 lots de MCK par étude.....	56
Tableau 8 : Potentiel clonogénique, dédoublement de population et taux de croissance des trois souches testées.	57
Tableau 9 : récapitulatif des résultats obtenus lors des 3 études de stabilité.....	63

Introduction

La peau est la barrière protectrice de l'organisme. Lorsque son intégrité est mise en péril par une brûlure, celle-ci constitue une agression locale et systémique. En 2011, environ 9 000 personnes victimes de brûlures sont hospitalisées en France métropolitaine. Les brûlures les plus graves sont traitées dans un Centre de Traitement des Brûlés (CTB). La prise en charge chirurgicale des patients porteurs de brûlures étendues et profondes est difficile. Le traitement de référence est l'autogreffe cutanée. Cependant, lorsque la brûlure atteint 70 % de la surface corporelle, la peau saine est insuffisante pour recouvrir l'ensemble des brûlures. Les chirurgiens peuvent alors avoir recours aux Feuilles Epidermiques cultivés (FE).

La Banque de Tissus et Cellules (BTC) des Hospices Civils de Lyon (HCL) prépare des FE pour le traitement des grands brûlés depuis 1988. Cette technique, développée par Rheinwald et Green en 1975, consiste à extraire et cultiver des cellules souches épidermiques, les kératinocytes prolifératifs, à partir de peau saine, et de reconstruire ainsi des FE en culture. Ces derniers sont greffés aux patients brûlés à plus de 70 % de la surface corporelle. Les FE ont grandement contribué à l'amélioration du pronostic vital des patients grands brûlés (1,2).

Malgré l'expérience de plus de 20 ans de la BTC dans la production de FE, une mise en conformité à la réglementation a été nécessaire ces dernières années. En effet, avec la mise en application du règlement européen n°1394/2007 au niveau français, les FE ont désormais le statut de médicaments de thérapie innovantes-préparés ponctuellement (MTI-PP). L'un des points mis en œuvre par la BTC conformément aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) a été de valider la stabilité des matières premières et des produits thérapeutiques annexes (PTA) utilisés dans la production des FE.

Le but de ce travail est d'étudier la stabilité de deux PTA très critiques pour le procédé : le milieu de culture pour kératinocytes (MCK) et les couches nourricières de fibroblastes irradiés (CNI).

PARTIE

BIBLIOGRAPHIQUE

I. La peau (3)

La peau est le plus grand organe humain, pesant en moyenne 5 kg et représentant une surface de 1.5 à 2 m² (4). Bien qu'elle soit présente sur l'ensemble du corps humain, sa répartition n'est pas homogène et son épaisseur varie en fonction de la localisation. D'un point de vue histologique, la peau est constituée de trois tissus complémentaires et superposés : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (**Figure 1**).

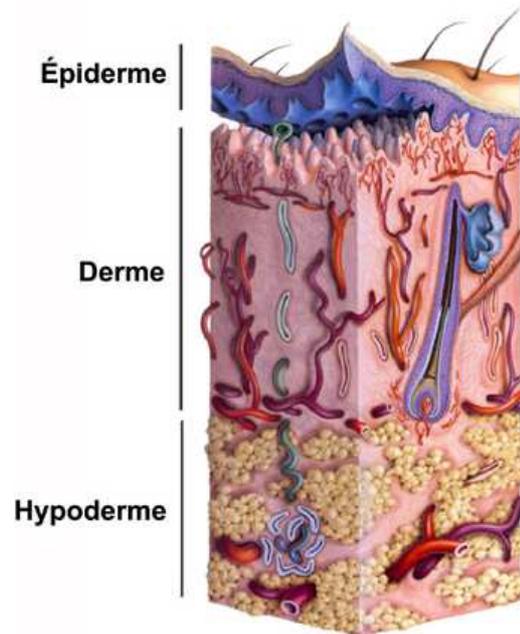


Figure 1. Structure de la peau d'après Géras (3)

La peau est un organe essentiel. À l'interface entre le milieu intérieur et extérieur, elle assure de multiples fonctions :

- **Une fonction de protection** contre les agressions extérieures, les traumatismes mécaniques, les toxines chimiques et les agents infectieux, grâce à la cohésion épiderme-derme, l'élasticité du derme et l'amortissement des chocs par l'hypoderme. Elle assure en permanence son propre renouvellement et sa réparation en cas de blessure. Les mélanocytes épidermiques permettent sa protection contre les rayons ultra-violet.

- **Une fonction barrière** avec une perméabilité sélective vis-à-vis de l'extérieur. L'intégrité de la couche cornée, le pH acide de la peau et la flore résidente nous protègent des agressions infectieuses. La peau est un organe immunitaire à part entière. Riche en cellules immunologiques, capables de reconnaître et de présenter des antigènes aux lymphocytes T protégeant ainsi l'individu. En revanche le passage transcutané de petites

molécules est possible et est utilisé en pharmacologie. La peau est aussi une barrière évitant les déperditions en eau et en électrolytes, expliquant les pertes hydro-électrolytiques importantes chez les brûlés.

- **Un rôle de thermorégulation**, non seulement passif, du fait de son épaisseur, mais également actif, via la transpiration.
- **Une fonction métabolique** puisqu'elle synthétise la vitamine D, dans la partie profonde de l'épiderme, sous l'influence des rayons ultraviolets B. De plus, le tissu adipeux constituant l'hypoderme est un réservoir de cellules souches et une réserve énergétique pour l'organisme.
- La peau est aussi **l'organe du toucher**, grâce aux multiples terminaisons nerveuses étroitement connectées aux cellules cutanées.

A. La structure de la peau

1. L'épiderme

L'épiderme est la partie la plus externe de la peau, c'est un épithélium pluristratifié et kératinisé. N'étant pas vascularisé, les nutriments proviennent du derme et y pénètrent par diffusion. Il est constitué à 90 % de kératinocytes et 10 % de mélanocytes, cellules de Langerhans et cellules de Merkel. Son épaisseur est proche de celle du papier, mais elle varie, d'un endroit à l'autre du corps, de quatre à dix couches cellulaires.

a) *Les populations cellulaires de l'épiderme*

(1) Les kératinocytes:

Les kératinocytes sont les cellules majoritaires de l'épiderme. Ils sont ainsi nommés, car leur activité spécifique est la synthèse de kératine, protéine fibreuse et insoluble dans l'eau, qui confère à la peau sa propriété barrière. Le stade de différenciation des kératinocytes conditionne leur aspect morphologique et structural, et permet de diviser l'épiderme en quatre couches cellulaires continues. On retrouve de la profondeur vers la surface cutanée :

- **La couche basale ou *stratum germinatum***, couche la plus profonde de l'épiderme en contact avec la jonction dermo-épidermique, elle est constituée d'une seule assise de cellules cylindriques ou cubiques. Les kératinocytes de cette couche portent le nom de cellules germinatives, car ils ont une activité mitotique intense (nombre de divisions fixé).

Les kératinocytes basaux, en quittant la membrane basale, perdent leur capacité de division cellulaire, migrent et entament leur programme de différenciation.

- **La couche épineuse ou *stratum spinosum***, elle est composée de quatre à cinq assises de cellules aplaties disposées parallèlement à la surface cutanée. Les kératinocytes sont volumineux, de forme polygonale et ont tendance à s'aplatir dans les régions les plus superficielles. Ces cellules sont attachées entre elles par un grand nombre de desmosomes qui leur confère un aspect en forme d'épines. Ces attaches desmosomiales assurent une grande cohésion entre les cellules et sont responsables, en partie, de la très grande résistance mécanique de cette couche cellulaire.

- **La couche granuleuse**, ou *stratum granulosum*, est formée de deux à cinq assises de kératinocytes aplaties. Au niveau de cette couche, deux nouvelles structures apparaissent, les granules de kératohyaline et les kératinosomes, ou corps d'Odland, contenant des protéines et des lipides. Ceux-ci sont déversés dans les espaces intercellulaires et s'organisent en bicouches lamellaires pour former un ciment intercornéocytaire. La couche granuleuse délimite la couche interne métaboliquement active de l'épiderme.

- **La couche cornée** ou *stratum corneum* est constituée, suivant la localisation, de 4 à 20 couches de cellules mortes, aplaties et complètement kératinisées. Les kératinocytes appartenant au stratum corneum ne possèdent plus de noyau ni d'organites cytoplasmiques et sont remplis de kératine : ce sont des cornéocytes. La membrane plasmique des cellules persiste et s'épaissit donnant l'enveloppe cutanée.

À partir de la couche basale, où se situent les cellules à haut potentiel prolifératif, les kératinocytes vont suivre un programme de différenciation. Ils se remplissent de kératine au fur et à mesure, passant des kératinocytes basaux aux kératinocytes cornés. La desquamation des cellules cornées est compensée par le renouvellement perpétuel de l'épiderme. Ce phénomène, d'une durée de 30 jours, est non seulement indispensable au maintien du nombre de cellules, mais aussi à la physiologie même du *stratum corneum*.

(2) Les mélanocytes :

Ce sont des cellules dendritiques représentant 2 à 4 % des cellules épidermiques et situées au niveau de la couche basale de l'épiderme. Elles ont une fonction propre : la mélanogénèse par la synthèse de mélanine, pigment responsable de la couleur de la peau. Les mélanines sont stockées au sein d'organelles spécifiques, les mélanosomes, qui sont transférés aux kératinocytes voisins (1 mélanocyte pour 36 kératinocytes) par l'intermédiaire des dendrites des mélanocytes, on parle d'unité épidermique de

mélanisation (**Figure 2**). Ces mélanosomes forment un écran au-dessus des noyaux des kératinocytes, les protégeant ainsi des effets nocifs des rayons ultraviolets (5).

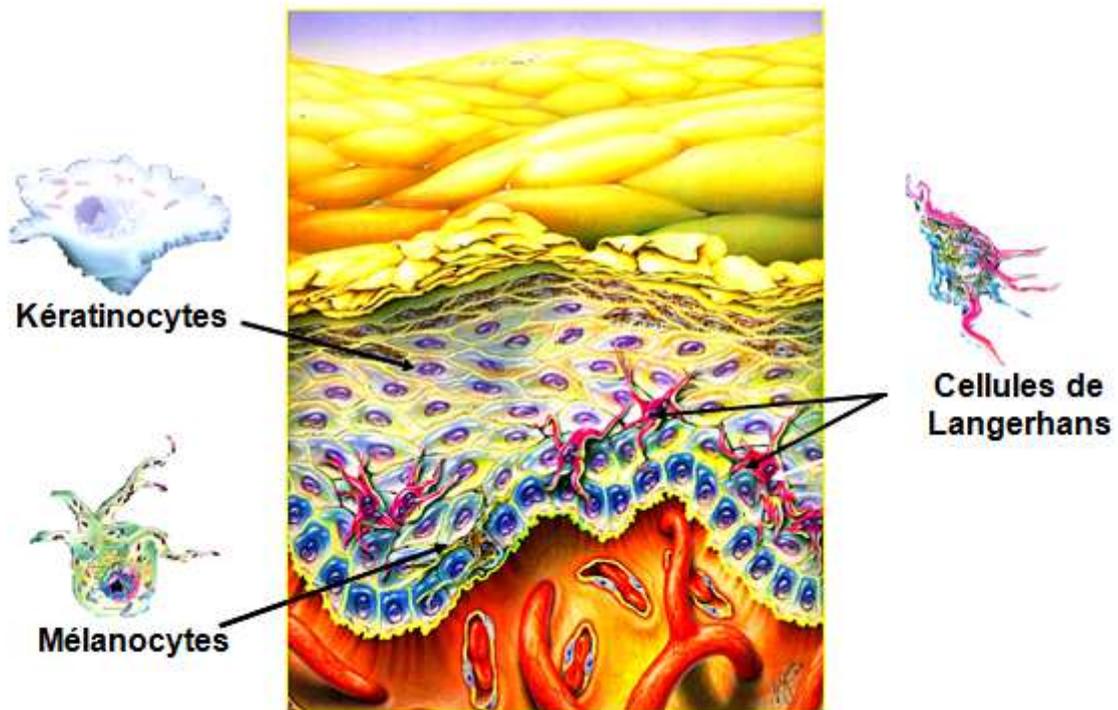


Figure 2 : Les différentes populations cellulaires de l'épiderme (3)

(3) Les cellules de Langerhans

Elles représentent 1 à 5 % des cellules de l'épiderme. Il s'agit de cellules dendritiques issues des précurseurs hématopoïétiques de la moelle osseuse. Elles jouent un rôle déterminant dans la réponse immunitaire de l'épiderme. En effet, une fois activées par des antigènes exogènes, elles quittent l'épiderme, traversent la jonction dermo-épidermique (JDE) et atteignent par voie lymphatique les ganglions régionaux où elles présentent les antigènes à des lymphocytes T naifs.

(4) Les cellules de Merkel

D'origine neuro-épithéliale, ce sont des récepteurs sensoriels cutanés, faisant de la peau l'organe du toucher. Elles représentent moins de 1 % des cellules épidermiques. Elles sont situées au niveau basal de l'épiderme en contact avec une terminaison nerveuse non myélinisée. Elles sont irrégulièrement réparties à la surface du corps humain et plus abondantes au niveau des zones sensibles au toucher (lèvres, paume des mains).

b) Les cellules souches épidermiques

L'homéostasie de la peau est assurée tout au long de la vie de l'organisme. Ce phénomène est possible grâce aux kératinocytes basaux prolifératifs, présents dans les espaces interfolliculaires, au niveau des zones appelées unités prolifératives de l'épiderme (Epidermal Proliferative Unit, EPU). L'organisation des EPU a été décrite pour la première fois en 1974 par Potten, il s'agit de structures stables et constantes, composées d'un empilement régulier d'une dizaine de cellules basales provenant d'une seule cellule souche (6). Elles présentent les mêmes caractéristiques que toutes les cellules souches, à savoir :

- Une haute capacité d'auto-renouvellement durant toute la vie de l'organisme,
- Un potentiel de différenciation élevé,
- Leur capacité à être activée (in vivo par une blessure ou in vitro par des conditions de culture adéquates), et à proliférer pour régénérer l'épiderme,
- Un cycle cellulaire lent (7), en dehors du processus de cicatrisation.

Toutes les cellules prolifératives de la couche basale de l'épiderme ne sont pas des cellules souches. L'équilibre entre le renouvellement des cellules souches et leur différenciation est assuré par la division asymétrique : une cellule souche donne naissance à une cellule souche et/ou une cellule d'amplification transitoire aboutissant à la production d'une dizaine de kératinocytes basaux, formant une base hexagonale autour de la cellule centrale (**Figure 3**) (8).

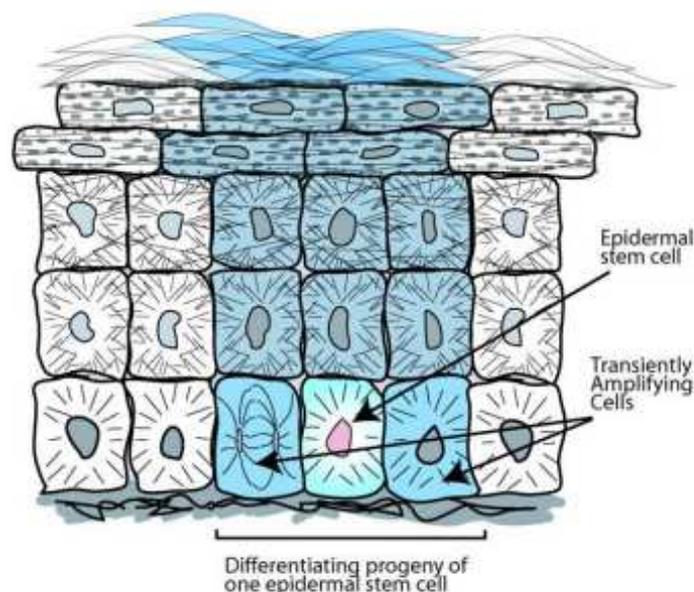


Figure 3 : Unité de prolifération épidermique (EPU) (9)

À ce jour, aucun marqueur biochimique ne permet de distinguer spécifiquement les cellules souches kératinocytaires des cellules d'amplification transitoire, mais le niveau d'expression de certains marqueurs peut varier (10). La technique de référence permettant de différencier les cellules souches des cellules d'amplification transitoire est l'étude de leur **potentiel clonogénique**. Mise au point en 1987 par Barrandon et Green (11), cette technique consiste à ensemercer les kératinocytes à faible densité. Trois types de colonies se développent en fonction de l'état de différenciation des cellules :

- **Les holoclones**, grosses colonies à bords réguliers, dérivant d'une cellule souche épidermique. Ils représentent les colonies non différenciées ayant le plus fort potentiel de prolifération et pouvant être amplifiées à long terme.
- **Les méroclones**, dérivant de cellules d'amplification transitoire, ont un potentiel de prolifération intermédiaire.
- **Les paraclones**, petites colonies à bords irréguliers provenant de cellules différenciées qui ne survivent pas en culture.

Cette méthode fonctionnelle, permettant également leur quantification, reste à ce jour la technique incontestable pour mettre en évidence une cellule souche.

2. La jonction dermo-épidermique

La JDE relie, comme son nom l'indique, l'épiderme et le derme. Elle correspond à une zone comprise entre les cellules basales de l'épiderme et les couches superficielles du derme. En plus de son rôle mécanique d'ancrage de l'épiderme au derme, elle contrôle les échanges de produits métaboliques. La JDE intervient au niveau de la croissance, de la réparation et de la différenciation des kératinocytes de l'épiderme.

3. Le derme

Beaucoup plus épais que l'épiderme (1 à 2 mm d'épaisseur), le derme est un tissu conjonctif de soutien, responsable de la souplesse et de l'élasticité de la peau. Les papilles dermiques, qui s'imbriquent dans l'épiderme, lui donnent un aspect ondulé. Le derme constitue le support de l'épiderme. Il contient les glandes sudoripares et les follicules sébacés.

Le derme est composé de deux structures histologiquement différentes :

- En profondeur, le **derme réticulaire** constitue la majeure partie du derme (environ 80 %), il est ainsi appelé en raison de l'agencement entrelacé des fibres de collagène.
- **Le derme papillaire**, situé directement sous la JDE, il doit son nom à la présence de nombreuses papilles entre les crêtes épidermiques. Cette couche est assez lâche, très vascularisée et riche en fines fibres de collagène entrelacées. C'est dans cette partie du derme que s'effectuent les échanges nutritifs avec les couches profondes de l'épiderme.

Ainsi, quel que soit la localisation, le derme est composé de :

Fibroblastes, principale population cellulaire, ils ont un aspect fusiforme et sont d'origine mésenchymateuse. Ils sont responsables de la synthèse de la majorité des molécules de la matrice extracellulaire (MEC) telles que les collagènes, l'élastine, la fibronectine et les glycoprotéines de structure. Leur activité est intense au cours des phénomènes de cicatrisation. Les fibroblastes participent également à la régulation de la prolifération et de la différenciation des kératinocytes. Ils agissent sur les cellules épidermiques par voie paracrine au travers de la synthèse de cytokines et de facteurs de croissance (FC) (12,13).

À côté des fibroblastes, d'autres cellules résidentes sont associées aux structures présentes dans le derme comme les vaisseaux sanguins, les terminaisons nerveuses ou encore les glandes (sébacées et sudoripares). À titre d'exemple on peut citer **les cellules endothéliales, musculaires, nerveuses et les cellules épithéliales du follicule pileux**. Dans la matrice extracellulaire dermique, une autre population cellulaire, mobile ou migrante, d'origine hématopoïétique est présente : elle regroupe **des macrophages, des mastocytes, des cellules dendritiques dermiques** et en faible proportion dans les conditions physiologiques, **des plasmocytes, des lymphocytes et des granulocytes neutrophiles et éosinophiles**. Ces cellules jouent des rôles dans l'élimination des déchets, l'auto-régénération, l'activation de l'immunité et par conséquent la défense de l'organisme.

La MEC est constituée d'un réseau de fibres, baignant dans une substance fondamentale amorphe composée de protéoglycanes et glycoprotéines de structure. Les molécules de la MEC interagissent entre elles et avec les cellules avoisinantes au travers de récepteurs situés à la surface cellulaire (comme les intégrines par exemple). Ces interactions lui assurent des propriétés de résistance et d'élasticité. On peut classer les composants matriciels en quatre grandes familles : **(i) les collagènes** qui forment la trame fibreuse, **(ii) le tissu élastique** très complexe, **(iii) les protéoglycannes** et les

glycosaminoglycannes qui remplissent les interstices et (iv) Les **glycoprotéines** de structure dont le rôle essentiel est d'assurer l'interface entre les cellules et la matrice. La MEC ne doit pas être considérée comme un support inerte pour les cellules qui l'habitent notamment par sa capacité à fixer des FC qu'elle restitue en fonction des besoins. Elle interagit en permanence avec les cellules et agit donc sur leur morphologie, leur multiplication et leur métabolisme.

Ainsi, le derme, outre son rôle de soutien et de nutrition, donne à la peau sa solidité et son élasticité. Il permet aussi l'ancrage des annexes cutanées.

4. L'hypoderme

L'hypoderme, couche la plus profonde de la peau, est un tissu conjonctif richement vascularisé et innervé composé de lobules adipeux. Ces derniers sont délimités par des travées de fibres de collagènes, issues du derme, qui se fixent aux muscles ou aux os limitant ainsi la mobilité de la peau. Les lobules adipeux contiennent essentiellement des cellules graisseuses, les adipocytes, ainsi que des fibroblastes. L'hypoderme est également un réservoir de cellules souches pouvant se différencier en adipocytes, ostéoblastes, myoblastes, chondrocytes, cellules endothéliales et cellules neuronales (14,15).

L'hypoderme, traversé par le réseau vasculaire et nerveux, renferme également la partie profonde des annexes cutanées. Son épaisseur varie de 6 mm à plusieurs cm en fonction de la localisation anatomique, de l'âge, du sexe et de l'indice de masse corporelle. Il permet d'assurer une protection mécanique et thermique (isolant) et a un rôle énergétique (graisse de réserve).

II. Les brûlures

La peau est la barrière protectrice de l'organisme. Elle est donc particulièrement exposée aux agressions, notamment aux brûlures. Ces dernières sont des pathologies pouvant être d'origine intentionnelle (agression, suicide) ou accidentelle (accidents de la circulation, accidents de travail ou accident de la vie courante). Les brûlures peuvent être extrêmement traumatisantes, entraînant des séquelles physiques et psychologiques majeures, et pouvant, dans les cas les plus graves, mettre en jeu le pronostic vital.

A. Epidémiologie

En 2011, 8670 personnes ont été hospitalisées en France pour des brûlures, dont 3541 ont été pris en charge dans un CTB. Les brûlures étaient graves chez 11,5 % de patients hospitalisés dans un CTB (16). Les brûlures sont dites graves si la surface brûlée est supérieure à 20 % avant l'âge de 5 ans, supérieure à 30 % après l'âge de 5 ans et/ou accompagnée d'une atteinte des voies respiratoires (17). Le nombre de décès enregistré en milieu hospitalier était de 215, dont 75 % ont eu lieu en CTB (16).

La prise en charge d'un brûlé doit être adaptée à la gravité de son état. Celle-ci est fonction de l'agent causal, de la durée d'exposition, de la localisation, la profondeur, la surface des tissus touchés ainsi que de l'état général du patient (l'existence de lésions associées, en particulier respiratoires). La rapidité et la qualité des soins sont également des facteurs essentiels. Les brûlures les plus fréquentes sont bénignes et ne nécessitent qu'un traitement par des topiques locaux. En cas de brûlures étendues et profondes, l'atteinte du recouvrement cutané peut mettre en jeu le pronostic vital et demandera des soins plus importants. De plus, une brûlure mal soignée évolue vers des plaies chroniques, des rétractions et des cicatrices hypertrophiques.

B. Physiopathologie

Selon l'OMS, « une brûlure est une lésion de la peau ou d'un autre tissu organique principalement causée par la chaleur ou les rayonnements, la radioactivité, l'électricité, la friction ou le contact avec des produits chimiques » (18). Dans la plupart des cas, les brûlures sont dues à des lésions par flamme (30 à 50 %) ou par liquides chauds (30 à 50 %). Les autres mécanismes (chimiques, électriques ou radiations) ne représentent que 2 à 5 % des causes de brûlures (19).

La peau étant l'organe le plus important de la défense immunitaire et du maintien de l'homéostasie, lorsque son intégrité est mise en péril par une brûlure, celle-ci constitue non seulement une agression locale, mais aussi systémique de l'organisme (20).

Au niveau local, on retrouve (i) une zone centrale de nécrose où survient une coagulation protéique, (ii) une zone de souffrance tissulaire ischémique et (iii) une zone fortement inflammatoire péri lésionnelle. En fonction de la prise en charge et de l'arrêt de l'exposition à l'agent causal, ces zones peuvent évoluer encore pendant plusieurs heures.

Au niveau locorégional, on assiste dès les premières minutes après la brûlure à une réaction inflammatoire extrêmement violente par libération, après lyse cellulaire, de médiateurs inflammatoires en grande quantité.

Au niveau systémique, la libération de ces substances pro-inflammatoires entraîne dans les premières heures une hyperperméabilité vasculaire responsable d'un œdème généralisé et d'une dépression myocardique probablement liée à la libération d'agents cardio dépresseurs au moment de l'agression thermique. Cet ensemble de facteurs provoque un choc hypovolémique vrai, qui va entraîner une modification des circulations locales. La perfusion du cerveau et du cœur va ainsi être privilégiée au détriment de celle des autres organes comme les reins, le système digestif ou encore la peau (risque de complications ischémiques de ces organes). (20,21)

C. Classification des brûlures

La gravité d'une brûlure est évaluée par plusieurs paramètres :

1. La surface de la brûlure

Exprimée en pourcentage de la surface corporelle totale, son évaluation prend en compte un certain nombre de paramètres tel que l'âge et la localisation de la brûlure. Selon les recommandations de la société française d'études et de traitements des brûlures de 1992, la table de Lund et Browder (**Figure 4**) représente la méthode la plus précise pour l'évaluation du pourcentage de la surface corporelle brûlée en fonction de l'âge du patient (22).

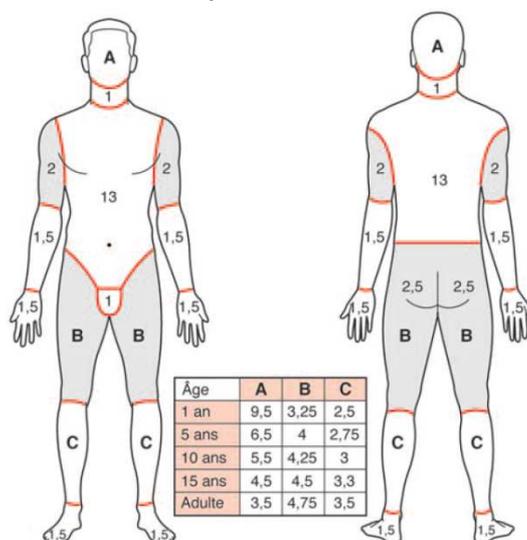


Figure 4 : Calcul des surfaces corporelles brûlées en pourcentage de la surface corporelle totale selon la table de Lund et Browder (22,23)

2. La profondeur de la brûlure

Le degré de destruction des cellules basales de l'épiderme détermine la profondeur d'une brûlure. En effet, par la présence de cellules souches capables de proliférer, la couche basale est indispensable pour une cicatrisation spontanée. La profondeur joue en outre, un rôle décisionnel dans l'élaboration des modalités thérapeutiques de prise en charge. Sa définition est clinique et histologique. Le diagnostic de profondeur est difficile, car l'aspect clinique est souvent polymorphe et sujet à des variations dans les 48 premières heures qui suivent le traumatisme. La nature de l'agent causal et les circonstances de survenue sont une aide non négligeable pour l'établissement du diagnostic.

Trois degrés de profondeur de la brûlure cutanée sont classiquement décrits (**Figure 5**) :

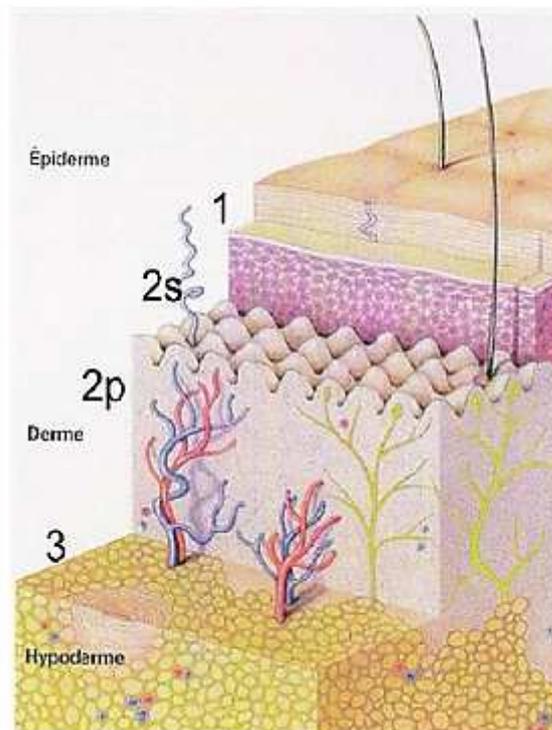


Figure 5 : Histologie de la profondeur d'une brûlure (22)

a) Premier degré

Les brûlures du premier degré correspondent à une atteinte des couches superficielles de l'épiderme sans atteinte de la couche basale. Elles se reconnaissent à la présence de lésions érythémateuses douloureuses sans décollement (pas de phlyctène). La cicatrisation spontanée se fait en 4 à 5 jours après desquamation et sans aucune séquelle (22). Les coups de soleil sont un bon exemple de brûlures du premier degré et s'avèrent le type de brûlure le plus fréquemment rencontré.

b) Le second degré

Les brûlures du second degré peuvent être superficielles ou profondes.

Le deuxième degré superficiel correspond à une lésion de la quasi-totalité de l'épiderme avec écrêtement de la couche basale et atteinte du derme papillaire. Sur le plan morphologique, il est caractérisé par la présence constante de phlyctènes (**Figure 6**) à parois épaisses suintantes dont le plancher est rose/rouge et saigne à la scarification. La cicatrisation est spontanée en 10 à 14 jours et sans séquelle fonctionnelle, mais avec possibilité de dyschromie résiduelle.



Figure 6 : Brûlure du second degré superficiel du dorsum de la main caractérisée par la présence de phlyctènes (23)

Le deuxième degré profond correspond à une destruction plus ou moins complète de l'épiderme (excepté au niveau des annexes épidermiques : poils, glandes sudoripares et sébacées) et de la membrane basale, accompagnée de l'atteinte du derme réticulaire. Ces brûlures présentent, comme celles du deuxième degré superficiel, des phlyctènes à fond rouge brun avec quelques zones blanchâtres. Le deuxième degré profond est souvent peu douloureux, car peu de terminaisons nerveuses sont fonctionnelles. La cicatrisation spontanée à partir des annexes est possible en l'absence d'infection, mais lente (entre 21 et 35 jours) et de mauvaise qualité, laissant des cicatrices hypertrophiques (22). Les brûlures du second degré profond nécessitent des greffes pour pallier ce problème.

Cette classification des brûlures du second degré est théorique. En pratique, il est souvent difficile de différencier à l'admission le second degré superficiel du second degré profond. Il faut attendre le 12^{ème} – 15^{ème} jour pour qu'il y ait, ou non, cicatrisation spontanée pour faire la différence (24).

c) Le troisième degré

Les brûlures du troisième degré correspondent à une destruction totale de l'épiderme et de la membrane basale, ainsi qu'une atteinte profonde du derme et parfois de l'hypoderme. Ayant un aspect variable (du blanc au brun, parfois noire carbonné) (**Figure 7**) elles peuvent occasionner la destruction des muscles, des tendons et de l'os sous-jacent. Les brûlures du troisième degré sont indolores et insensibles au toucher lorsqu'elles détruisent totalement les terminaisons nerveuses. Elles nécessitent obligatoirement un traitement chirurgical (22).



Figure 7 : brûlure du troisième degré de la cuisse et du genou, avec escarre cutanée et veines superficielles thrombosées (23).

3. Le terrain de la brûlure

L'âge de la victime est un élément de gravité à prendre en compte : la brûlure aura un retentissement plus important aux périodes extrêmes de la vie (nourrisson, vieillard). D'autres paramètres pouvant aggraver le pronostic sont à prendre en compte, comme l'existence d'une insuffisance chronique (cardiaque respiratoire ou rénale) ou d'une pathologie grave préexistante.

D. Prise en charge chirurgicale de la brûlure :

L'objectif de la chirurgie du grand brûlé est de traiter les causes de défaillances, en restaurant le plus rapidement possible la barrière cutanée. Celle-ci permet une protection contre les infections et les pertes hydro-caloriques. Dans un deuxième temps, un traitement chirurgical est indispensable pour les brûlures du second degré profond et les brûlures du troisième degré (25).

La prise en charge chirurgicale d'une brûlure consiste en l'exérèse des tissus brûlés suivie du recouvrement des plaies. Différentes techniques de greffe existent, complémentaires les unes aux autres.

1. L'autogreffe

La greffe cutanée mince autologue est la technique de référence. Elle est effectuée immédiatement après l'excision des lésions. Le prélèvement est généralement effectué à l'aide d'un dermatôme électrique sur des régions saines ou cicatrisées de la peau du patient (site donneur) (**Figure 8**), et appliqué sur les zones brûlées excisées (site receveur). Ces dernières doivent être bien vascularisées et exemptes d'infections afin d'assurer une bonne prise du greffon. Le patient est donc à la fois le donneur et le receveur de la greffe. Le prélèvement se limite à l'épiderme et à la partie superficielle des papilles dermiques (0,2 à 0,3 mm d'épaisseur). Une grande partie de la couche basale subsiste au niveau de la zone donneuse, permettant une cicatrisation spontanée et une ré-épithélialisation en 10 à 15 jours. Les sites donneurs peuvent ainsi être prélevés à plusieurs reprises. Le choix de la localisation du site donneur doit être fait en prenant en compte la coloration de la greffe, qui doit être compatible avec la coloration cutanée de la zone receveuse. Les sites donneurs les plus fréquemment utilisés (dans la mesure du possible) sont les cuisses et le cuir chevelu (25).



Figure 8 : Prélèvement de greffon cutané à l'aide d'un Dermatôme (26)

La greffe cutanée mince peut être utilisée **en peau pleine** (utilisation du greffon tel qu'il est prélevé, sans amplification) ou **en filet (mesh graft)** (**Figure 9**). En effet, chez les patients brûlés sur une surface importante, l'amplification du greffon est réalisée à l'aide d'un ampli-greffon (25), qui va transformer la bande de peau prélevée en un filet, multipliant ainsi sa surface par un facteur variable de 1,5 à 6 (le plus souvent 3). L'épithélialisation des espaces situés entre les mailles du filet se fait secondairement à

partir de ces dernières (26). Cette technique permet également une meilleure prise de greffe par le drainage spontané des exsudats et hématomes au travers des mailles du filet. Cependant, l'aspect maillé reste visible après cicatrisation complète, limitant son utilisation aux zones non découvertes.

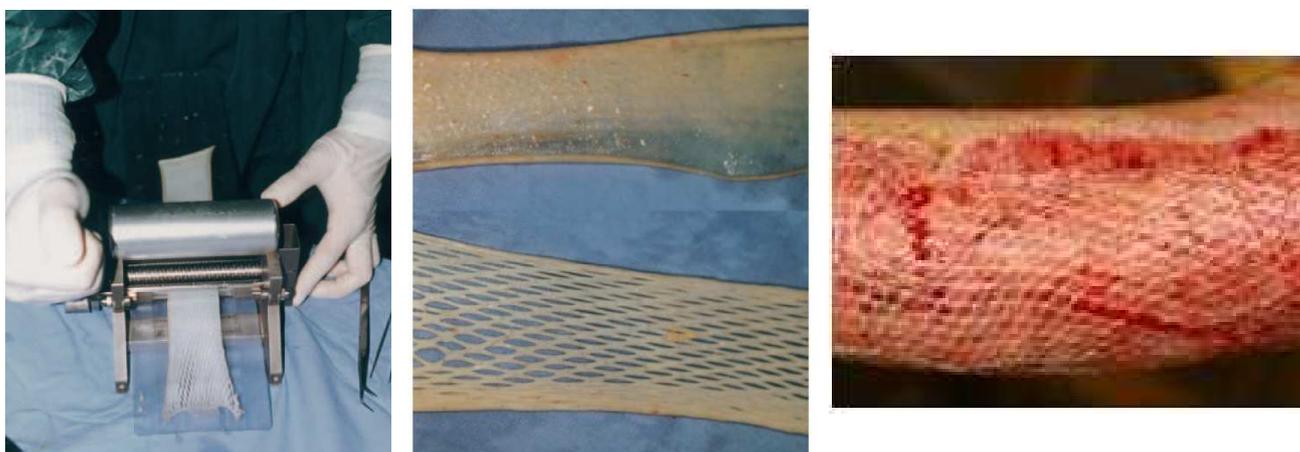


Figure 9 : Amplification et pose d'une greffe dermo-épidermique en filet (23,26)

Une amplification plus grande du greffon cutané est possible par la technique de la **greffe en pastille (Figure 10)**. Ce procédé original (HumecaTM) permet de découper le greffon en petites pastilles carrées, puis de les coller sur un support en tissu avec un pliage spécial qui, une fois déplié, va amplifier la surface initiale jusqu'à 15 fois (27). Cette technique est réservée aux brûlés les plus graves, lorsque le prélèvement cutané sain est très réduit. Pour des raisons esthétiques, la greffe en pastille est utilisée sur des surfaces couvertes telles que le tronc ou les membres inférieurs.

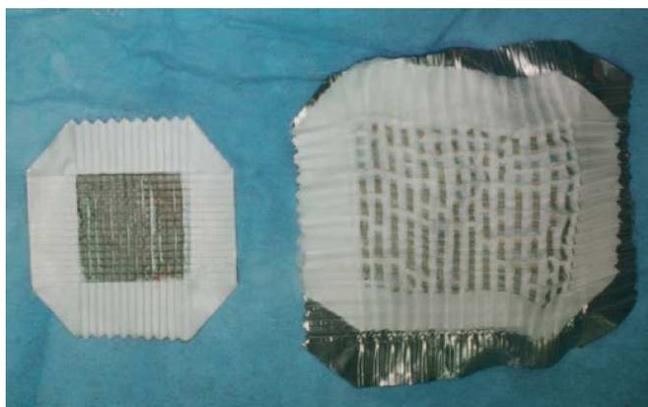


Figure 10 : Greffe mince amplifiée en pastille selon le procédé HumecaTM (23)

Les greffes de peau totale sont principalement utilisées pour le traitement chirurgical des séquelles de brûlures. Prélevées au bistouri, ces greffes comportent toute

l'épaisseur de la peau, épiderme et derme avec ses annexes. La zone donneuse, incapable de ré-épithélialisation, est suturée. La particularité de cette technique est la présence du derme complet, qui empêche la rétractation des greffes. Elle est également utilisée en phase aiguë pour le traitement des brûlures de paupières, dont la tendance à la rétractation est très grande (25,26).

Malgré la multiplication des techniques, l'autogreffe cutanée peut vite être limitée par la disponibilité des sites donneurs. Ainsi, lorsque la brûlure est importante, la quantité de peau saine est insuffisante pour recouvrir les zones brûlées. Les chirurgiens ont alors recours à **l'allogreffe cutanée**, généralement en association à l'autogreffe (**greffe sandwich**) (28).

2. L'allogreffe cutanée

La cicatrisation définitive d'un brûlé n'est possible qu'à partir de ses propres kératinocytes. Tout épiderme étranger est destiné à être rejeté à court ou moyen terme. Cependant, la nécessité d'une couverture cutanée rapide dans le cas de brûlures étendues, impose le recours à des greffes cutanées allogéniques, d'origine humaine. Le prélèvement de ces allogreffes répond à la réglementation des prélèvements de tissus, et est conditionné par l'anonymat, la gratuité et le consentement. Leur utilisation comporte des risques de transmission de maladies au receveur, malgré une sécurisation virologique (VIH 1 et 2, HTLV 1 et 2, VHB, VHC) et microbiologique du prélèvement (29). Le chirurgien doit donc en tenir compte et en évaluer le rapport bénéfice/risque. Lorsque l'indication de leur utilisation thérapeutique est posée, la technique doit faire l'objet d'une information auprès des patients (ou de leurs proches) et de mesures permettant la traçabilité.

Le donneur de la peau peut être soit décédé (à cœur battant ou à cœur arrêté), dans ce cas le consentement repose sur la non-opposition, soit, plus rarement, vivant (résidus opératoires de chirurgie plastique), le consentement exprès du donneur est alors obligatoire (29,30). Après le prélèvement, les greffons cutanés allogéniques sont transformés (contrôle morphologique), conditionnés (en poches, pots ou conteneurs stériles) puis conservés selon plusieurs techniques. On retrouve **(i)** la réfrigération à + 4 °C, dans des milieux différents (31–33) et sur des périodes différentes (de quelques jours à 6 semaines) (34), **(ii)** préservation par le glycérol à forte concentration (35), **(iii)** la cryopréservation en vapeur d'azote avec du glycérol (36) ou du DMSO (diméthyl sulfoxyde) (37). Cette technique est largement répandue, car elle présente comme principal avantage une longue durée de

conservation, pouvant dépasser les 10 ans (38). Enfin (iv) la lyophilisation, par déshydratation des greffons après congélation sous vide, associée, par exemple, à une stérilisation par oxyde d'éthylène (39). Cette dernière technique est très peu utilisée.

Les allogreffes cutanées ne sont qu'une couverture temporaire :

- Elles apportent une protection métabolique et anti-infectieuse.
- Elles favorisent le bourgeonnement des tissus en apportant les facteurs nécessaires à la cicatrisation.
- Elles jouent également un rôle très important sur l'atténuation de la douleur par simple effet mécanique.

Le sujet brûlé étant immunodéprimé, les greffons allogéniques sont tolérés et ne sont rejetés qu'au bout de 2 à 4 semaines (contre 8 à 10 jours chez un patient sain)

Les allogreffes cutanées peuvent être utilisées seules, lorsque les zones donneuses sont rares ou absentes au démarrage du traitement. Elles sont également indispensables lors de l'utilisation de FE autologues où elles servent de sous-sol dermique essentiel à leur prise. Enfin, dans la technique « sandwich » citée précédemment, les allogreffes sont utilisées en association avec des autogreffes très largement expansées. L'allogreffe protège alors l'autogreffe et lui apporte des FC.

3. Les feuillets épidermiques de culture

La culture de kératinocytes a été initiée aux États-Unis en 1975, avec la technique de Rheinwald et Green, qui consiste à cultiver in vitro les cellules d'une biopsie de peau de quelques centimètres carrés (40). Les feuillets épidermiques sont obtenus par l'amplification des kératinocytes cultivés jusqu'à l'obtention d'un feuillet cohésif. Ils sont ensuite greffés sur le patient. Le délai entre la réception de la biopsie et la première greffe est de 3 semaines. Cette technique est utilisée par la BTC des HCL pour le CTB depuis 1988 (1).

Les feuillets autologues (préparés à partir d'une biopsie de peau du patient) sont utilisés lorsque le patient est brûlé sur plus de 70 % de surface corporelle (41). Les zones saines à prélever ne sont plus suffisantes, un recouvrement par des cultures d'épiderme peut être décidé par le chirurgien en charge du patient. Les FE ne contenant pas de structures dermiques, celles-ci peuvent être apportées par des allogreffes, ou pour pallier à

la pénurie d'allogreffes, des autogreffes très largement expansées. L'apport dermique va permettre un bon ancrage de l'épiderme et augmenter la prise de la greffe.

Les FE allogéniques (préparés à partir de cellules d'une peau de donneur) présentent l'avantage de pouvoir être disponibles sous forme de banque de cellules. Ils peuvent être préparés en une dizaine de jours, ou immédiatement sous forme de feuillets allogéniques congelés selon un protocole validé. Il ne semble pas y avoir de différence de cicatrisation entre les FE allogéniques frais ou cryopréservés. Du fait de leur activité cicatrisante, ils sont greffés sur les sites donneurs d'autogreffe. Ils assurent également un traitement des brûlures étendues du deuxième degré rapide et efficace, avec de meilleurs résultats esthétiques que l'autogreffe. Une étude rétrospective a été réalisée au sein de la BTC sur les patients traités par FE allogéniques entre 1997 et 2012. Les 59 patients qui ont été greffés de FE allogéniques sur leur site donneur ont retrouvés une épithélialisation complète en 7 jours. Les FE allogéniques ont également été utilisés pour le recouvrement des brûlures du second degré profond chez 11 patients. Une cicatrisation complète des sites a été décrite en 7 jours en moyenne (2).

Procédé de fabrication des Feuilletts épidermiques

Les feuillets épidermiques sont des MTI-PP, fabriqués au sein de la BTC du Groupement Hospitalier Édouard Herriot. Ils sont indiqués pour le recouvrement des grands brûlés en complément à l'autogreffe de peau autologue. La préparation de ces MTI-PP est réalisée dans des zones à atmosphère contrôlée selon les BPF (Figure 11).



Figure 11 : Photo locaux de la BTC/HCL pour la production de MTI-PP

La peau saine est le matériel de départ. Le prélèvement dermo-épidermique subit d'abord un traitement par grattage, dégraissage, délipidation et décontamination. Les

kératinocytes sont ensuite extraits par digestion enzymatique et cultivés en primoculture (P0) sur des CNI. Après le premier passage, correspondant à la trypsination des cellules qui sont ré-ensemencées, les cellules sont dites en phase P1. On parle ensuite de P2 puis de P3 à chaque étape de trypsination/ré-ensemencement.

Les CNI sont constituées de fibroblastes inactivés par irradiation gamma, incapables de proliférer, mais qui conservent leurs capacités à sécréter des facteurs nécessaires à la croissance des kératinocytes. Les fibroblastes ont une capacité d'adhésion inférieure à celle des kératinocytes, ils seront décollés par ces derniers, puis éliminés lors des changements de milieu. La CNI est comme le milieu de culture, indispensable à la prolifération des kératinocytes, par (i) la synthèse de matrice extra cellulaire favorisant leur adhésion en culture, (ii) la sécrétion de FC et (iii) l'inhibition de la prolifération des propres fibroblastes du patient (42).

Les FE sont obtenus après la mise en culture en 12 à 15 jours de kératinocytes en P0, P1, P2 pour donner des feuilletts épidermiques en P1, P2 ou P3. Les FE à confluence sont décollés du fond de la boîte par traitement enzymatique par une protéase neutre : la dispase. Une gaze vaselinée est alors placée sur le FE qui va y adhérer. Les bords du FE sont rabattus sur la gaze vaselinée et l'ensemble est placé dans le conditionnement primaire contenant du milieu de culture. Des contrôles de la qualité du produit sont réalisés tout au long du procédé. Il s'agit de (i) contrôles de sécurité : contrôles microbiologiques (stérilité par Bact'Alert[®] à divers étapes de la production, examens virologiques avant traitement de la peau, Myco'Alert[®]) et contrôles d'impuretés cellulaires (recherches de fibroblastes-CD90 et de mélanocytes-HMB45 contaminants), (ii) contrôles d'efficacité : contrôles d'identité de kératinocytes-CD49f et du potentiel clonogénique.

Une fois le produit fini libéré, il est transporté au bloc opératoire où il sera greffé sur le patient dans les heures qui suivent (**annexe 1**).

III. Cadre juridique

A. Les médicaments de thérapie innovante

Le cadre réglementaire entourant les médicaments de thérapie innovante (MTI) est très complexe. En raison de leur nouveauté et de la complexité de leurs procédés de fabrication, ils sont associés à des risques potentiels, mal connus. C'est pourquoi ils font

l'objet d'une réglementation européenne spécifique par rapport aux médicaments conventionnels ou aux autres médicaments biologiques, afin de garantir un haut niveau de protection de la santé publique.

1. Réglementation européenne

Entré en vigueur le 30 décembre 2008, le règlement européen (qui constitue l'instrument juridique le plus élevé dans la hiérarchie des textes du droit européen) CE N° 1394/2007 regroupe les approches thérapeutiques qui font appel dans leurs mécanismes d'actions aux gènes, tissus ou cellules sous le nom de « médicaments de thérapie innovante », une nouvelle classe de médicament s'inscrivant dans la catégorie plus large de biothérapie. Ce règlement introduit des dispositions spécifiques pour ces médicaments, qui viennent compléter les dispositions générales, énoncées dans la directive 2001/83/CE instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain (43).

Ce règlement ne déroge pas aux principes fondamentaux énoncés dans la directive 2004/23/CE relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules humains. Mais lorsqu'un MTI contient des cellules ou des tissus humains, la directive 2004/23/CE s'applique uniquement en ce qui concerne le don, l'obtention et le contrôle du tissu ou des cellules qui serviront à l'élaboration du MTI qui est sous le règlement 1394/2007 (44).

Le règlement 1394/2007 institue un nouveau comité en charge de l'évaluation des MTI : le Committee for Advanced Therapies (CAT). Il s'agit d'un comité scientifique multidisciplinaire qui s'est vu confié un certain nombre de missions : **(i)** rendre un avis sur les dossiers de demande d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) **(ii)** certifier les données de qualité et les données précliniques obtenues au cours du développement d'un produit, **(iii)** prendre en charge la procédure de classification qui consiste à clarifier ou à confirmer au demandeur le statut de MTI ainsi que la catégorie de produit de thérapie innovante à laquelle il appartient (45). En effet, trois grands types de produits existent aujourd'hui, chacun relevant d'un cadre réglementaire spécifique : les MTI, MTI-PP et les préparations de thérapie cellulaire (PTC).

a) Médicaments de thérapie innovante et préparation de thérapie cellulaire

Les MTI suivent le règlement européen n°1394/2007 et sont régulés au niveau national pour les essais cliniques (EC) et au niveau européen pour leur mise sur le marché et l'ensemble des procédures de suivi post-AMM. Les PTC sont des produits cellulaire ou tissulaire (allogéniques ou autologues) à finalité thérapeutique. Ces préparations ne sont pas des médicaments au sens du code de santé publique (CSP), mais sont des produits de santé, sous la compétence de l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament (ANSM) et sont réglementées au niveau national sur la base de la directive 2004/23/CE (46). Les MTI sont à différencier des PTC, qui peuvent être, pour certains d'entre eux, des produits proches d'un point de vue biologique et médical. Le règlement n° 1394/2007 établit deux critères essentiels définissant à quelle catégorie appartient un produit thérapeutique :

- Le recours à une « manipulation substantielle » pour transformer les cellules et tissus initiaux. Une manipulation substantielle (**Annexe 2**) vise à « obtenir des caractéristiques biologiques, des fonctions physiologiques ou des propriétés structurales utiles à la régénération, à la réparation ou au remplacement recherchés »
- Le caractère homologue ou hétérologue du site d'injection ou d'implantation du produit thérapeutique.

Ainsi, un produit dont le procédé de fabrication ne fera pas appel à des modifications substantielles et dont la destination sera la même chez le donneur et le receveur sera une préparation cellulaire/tissulaire. Par exemple, lorsqu'un prélèvement de moelle osseuse est réalisé en vue d'une greffe allogénique de cellules hématopoïétiques, le produit cellulaire prélevé et utilisé à des fins homologues est considéré comme une PTC, dans la mesure où il ne fait pas l'objet de manipulations substantielles. Si le même prélèvement et la même ingénierie cellulaire sont réalisés en vue de l'injection des cellules médullaires mononucléées autologues dans le cadre d'une indication autre qu'une greffe allogénique de cellules hématopoïétiques, donc d'un usage non homologue, le produit cellulaire est alors considéré comme un MTI, il doit alors être fabriqué conformément aux BPF applicable aux médicaments à usage humain. Si l'établissement est situé en France, celui-ci devra être un établissement pharmaceutique autorisé par l'ANSM en application des articles L. 5124-1 (établissement pharmaceutique privé) ou L. 5124-9-1 (établissement pharmaceutique créé au sein d'organismes à but non lucratif ou d'établissements publics autres que les établissements de santé) du CSP.

b) Médicament de thérapie innovante-préparé ponctuelle

Catégorie de MTI défini par la terminologie « exemption hospitalière » à l'article 28 du règlement n°1394/2007. Il s'agit d'un MTI qui, du fait de ses caractéristiques et de sa destination, est préparé de façon ponctuelle et utilisé au sein du même état membre dans un hôpital, sur la base d'une prescription médicale nominative à l'intention d'un malade déterminé. Cette catégorie de MTI a été créée afin de permettre aux petites structures, notamment aux hôpitaux, d'accéder à l'innovation. Ces MTI-PP sont sous le régime des MTI, mais sont cependant exempté de la clause de l'AMM centralisée. Ils doivent alors suivre un cadre réglementaire national et ne pourront être utilisés que dans l'état membre ou ils sont fabriqués. Ils n'ont donc pas vocation à être commercialisés dans toute l'Union Européenne. La fabrication de ces médicaments sera de ce fait autorisée localement et il appartient à chaque état membre de définir les conditions d'autorisation nationale. En France, la définition de ces MTI-PP est introduite au 17 de l'article L. 5121-1 du CSP. Les états membres doivent toutefois prendre en compte certains pré-requis précisés dans le règlement européen comme le fait que ces médicaments devront être préparés selon des normes de qualité spécifiques et suivre le système de pharmacovigilance

2. Réglementation française :

Jusqu'au en 1998, il n'y avait pas de réglementation sur les produits de thérapie cellulaire et tissulaire en France. La loi n°98-535 du 1er juillet 1998 prévoit un cadre réglementaire spécifique pour ces produits. Cependant, et conformément au droit européen, les règlements européens sont d'application immédiate pour les états membres. Les conséquences du règlement n°1394/2007 ont entraîné des modifications du CSP français, déclinées par la loi n° 2011-302 du 22 mars 2011. Elle donne notamment la possibilité aux établissements publics (sauf aux établissements de santé) et aux organismes à but non lucratif de créer en leur sein des établissements pharmaceutiques. Cette loi définit également les MTI-PP, dont les conditions d'autorisations des établissements qui pourront les fabriquer et des médicaments ainsi préparés sont précisées par le décret n° 2012-1236 du 6 novembre 2012.

3. Différents types de MTI

a) Les médicaments de « thérapie génique »

Par médicament de thérapie génique, on entend un médicament biologique qui contient ou constitue un acide nucléique recombinant. Il est administré à des personnes en vue de réguler, de réparer, de remplacer, d'ajouter ou de supprimer une séquence

génétique. Son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique dépend directement de la séquence d'acide nucléique recombinant qu'il contient ou du produit de l'expression génétique de cette séquence (44).

b) Les médicaments de « thérapie cellulaire somatique »

Ce sont des cellules ou des tissus qui ont fait l'objet d'une manipulation substantielle de façon à modifier leurs caractéristiques biologiques, leurs fonctions physiologiques ou leurs propriétés structurelles. Il peut également s'agir de cellules ou de tissus qui ne sont pas destinés à être utilisés pour la ou les mêmes fonctions essentielles chez le receveur et le donneur. Ces cellules/tissus doivent posséder des propriétés permettant de traiter, de prévenir ou de diagnostiquer une maladie à travers l'action métabolique, immunologique ou pharmacologique de ses cellules ou tissus (44).

c) Les médicaments « issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire »

Sont considérés comme « issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire » les cellules ou tissus qui répondent à au moins l'une des conditions suivantes :

- Les cellules ou tissus ont été soumis à une manipulation substantielle, de façon à obtenir des caractéristiques biologiques, des fonctions physiologiques ou des propriétés structurelles utiles à la régénération, à la réparation ou au remplacement recherchés.
- Les cellules ou les tissus ne sont pas destinés à être utilisés pour la (les) même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et chez le donneur (44).

d) Les médicaments « combinés de thérapie innovante »

Ce sont des MTI, donc des médicaments de thérapie cellulaire, de thérapie génique ou d'ingénierie tissulaire, qui intègrent dans leur composition un ou plusieurs dispositifs médicaux. Leur partie cellulaire ou tissulaire doit contenir des cellules ou des tissus viables. Dans le cas où ce médicament ne contient pas des cellules ou des tissus viables, il doit être susceptible d'avoir sur le corps humain une action qui peut être considérée comme essentielle par rapport à celle des dispositifs précités (44).

4. Matières premières :

a) Les cellules et tissus, matériel de départ :

Les cellules utilisées pour la production de MTI peuvent provenir de 4 sources différentes :

- du patient ; elles sont alors dites autologues. Malgré les limites d'approvisionnement, elles présentent comme avantages de ne pas soulever de problèmes éthiques et d'être bien tolérées par le patient.

- d'un donneur ; il s'agit dans ce cas de cellules allogéniques. Elles sont disponibles en plus grand nombre comparés aux cellules autologues, mais elles peuvent être à l'origine de réactions immunitaires de rejet. Elles peuvent également soulever des problèmes éthiques si, par exemple, les cellules allogéniques sont des cellules embryonnaires.

- d'une autre espèce ; ce sont des cellules xénogéniques. L'approvisionnement est alors aisé, mais en plus des réactions immunitaires, il existe un risque de transmission d'un nouveau virus d'une espèce à une autre. Les cellules xénogéniques n'ont encore jamais fait l'objet d'un EC en France.

- d'une lignée cellulaire ; il s'agit de cellules immortalisées, dont l'approvisionnement est infini, qui peuvent non seulement provoquer des réactions immunitaires, mais peuvent également être à l'origine de l'apparition de tumeur chez le receveur.

b) Les produits thérapeutiques annexes

Les PTA sont définis par l'article L. 1263-1 du CSP comme étant « tout produit, à l'exclusion des dispositifs médicaux, entrant en contact avec des organes, tissus, cellules ou produits issus du corps humain ou d'origine animale au cours de leur conservation, de leur préparation, de leur transformation, de leur conditionnement ou de leur transport, avant leur utilisation thérapeutique chez l'homme, ainsi que tout produit entrant en contact avec des embryons dans le cadre d'une activité d'assistance médicale à la procréation ».

Pour l'essentiel, cette catégorie de produits comprend des milieux de conservation de greffons (tissus, organes), des milieux utilisés dans le cadre de la fécondation *in vitro*, ou des milieux utilisés au cours de la préparation de produits de thérapie cellulaire. Créé en 1998, le statut de PTA n'existe qu'en France. Leur commercialisation est soumise à une autorisation préalable délivrée par l'ANSM, après évaluation de leur qualité, de leur sécurité et de leur efficacité *in vitro* (**décret n° 2004-829 du 19 août 2004**) (47). L'autorisation peut être modifiée, suspendue ou retirée par l'Agence. Deux **arrêtés du 19 août 2004** complètent cette disposition réglementaire : l'un définit le contenu du dossier accompagnant la demande d'autorisation de mise sur le marché (48), l'autre précise les bonnes pratiques concernant leur préparation, transformation, conditionnement, conservation, importation, transport et distribution (49). En pratique, la demande

d'autorisation d'AMM est adressée par le fabricant s'il est situé sur le territoire français, ou par l'importateur dans le cas d'un PTA fabriqué en dehors de l'hexagone.

Les PTA entrent dans le cadre de la biovigilance. La biovigilance a pour objectif de prévenir les risques liés, notamment, à l'utilisation des PTA, tels que le risque de transmission d'un agent infectieux, permettant ainsi d'optimiser leur sécurité d'emploi.

5. Essais cliniques et Autorisation de Mise sur le Marché : spécificités des MTI

a) Essais cliniques

(1) Législation

En France, tout EC réalisé doit obtenir une autorisation préalable de l'ANSM. Alors que le délai de réponse pour les produits chimiques est de 30 jours avec une autorisation implicite (silence de l'agence vaut acceptation), ce délai passe à 90 jours (180 jours si demande de complément d'informations) quand il s'agit de MTI, avec une autorisation explicite (silence de l'agence vaut refus). Pour prendre la décision d'autoriser ou non un EC, l'agence est conseillée par un groupe d'experts sur les recherches biomédicales portant sur les thérapies innovantes. En parallèle, le promoteur de l'EC doit déposer un dossier auprès du Comité de Protection des Personnes qui doit donner son avis dans un délai de 35 jours (44) (**Annexe 3**).

(2) Les Essais cliniques en quelques chiffres

La majeure partie de la recherche dans les MTI est menée par des petites entreprises et des entités sans but lucratif, qui représentent près de 70 % des commanditaires d'EC de MTI, alors que les grandes entreprises pharmaceutiques prennent en charge moins de 2 % de l'ensemble des EC (50).

Depuis 2006, les EC de produits à base de cellules souches mésenchymateuses ont connu une très forte progression. Le nombre d'EC de médecine régénératrice était de 193 EC en 2010. Le domaine cardiovasculaire était particulièrement investigué avec 92 EC (48 %). La thérapie cellulaire permettrait une alternative aux greffes cardiaques ou autres traitements très lourds. Les aires thérapeutiques « traditionnelles » de la thérapie cellulaire étaient encore très représentées (25 %), avec 23 EC de traitements cutanés (incluant les soins des cicatrices) et 26 EC concernant des traitements du cartilage et des pathologies osseuses. Il est intéressant de noter que ces pathologies sont très investiguées par les

sociétés privées : l'industrie assure la promotion de 90 % des EC recensés dans ces domaines. Les autres aires thérapeutiques étaient très minoritaires. Cependant, certaines sont très innovantes comme le système nerveux central pour lequel un EC utilisant des cellules souches embryonnaires vient d'être autorisé aux États-Unis. Peu de produits devraient arriver sur le marché à court terme, car seules 21 phases III étaient en cours (51).

Cependant, des chiffres plus récents sont plus encourageants. Deux études menées dans le but de répertorier l'ensemble des essais cliniques utilisant des MTI dans le monde (à l'exception du Japon), montrent que (i) les EC portant sur les MTI ont largement évolué depuis 2010, leur nombre a doublé entre juin 2013 (2740) et juin 2014 (4760), (ii) une part prépondérante dans ce domaine revient aux États-Unis (58 %), mais la France est leader en Europe, devant l'Allemagne, l'Espagne et l'Italie (52) (**Figure 12**).

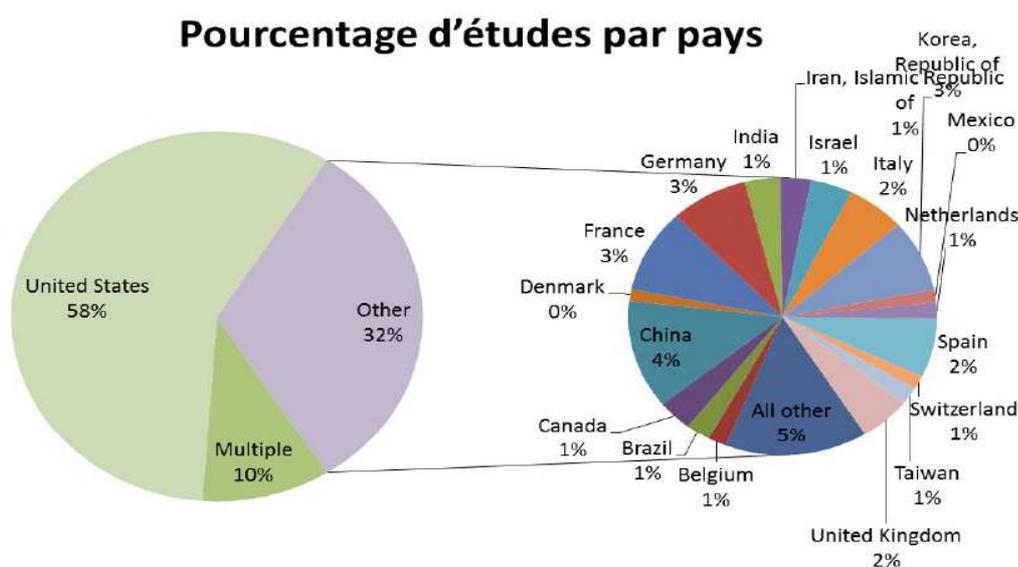


Figure 12 : Pourcentage d'études de médicaments de thérapies innovantes par pays en 2014 (22)

b) Autorisation de Mise sur le Marché et état des lieux 2013

Le règlement MTI a été conçu pour garantir un niveau élevé de protection de la santé humaine et pour assurer la libre circulation des MTI dans l'Union Européenne (UE). Sa pierre angulaire est l'obligation d'obtenir une autorisation préalable de mise sur le marché pour tout MTI. Cette autorisation ne peut être accordée que si une évaluation scientifique de la qualité, de l'efficacité et de la sécurité démontre que les avantages l'emportent sur les risques. Les MTI font l'objet d'une AMM centralisée délivrée par la

Commission Européenne, après évaluation de l'Agence Européenne du Médicament (EMA).

Sept ans après la publication du règlement, les AMM accordées sont peu nombreuses. Un rapport de la commission au parlement européen et au conseil a fait le point sur la situation des MTI dans l'UE et a analysé l'incidence du règlement sur les thérapies innovantes. Au 30 juin 2013, l'EMA avait reçu dix demandes d'autorisation de mise sur le marché de MTI. Cinq d'entre elles concernaient des produits qui se trouvaient déjà sur le marché de l'UE. Quatre ont franchi toutes les étapes de la procédure et se sont vu octroyer une AMM par la Commission (ChondroCelect[®], Glybera[®], Maci[®] et Provenge[®]). En revanche, quatre demandes d'AMM n'ont pas abouti. L'une d'elles visait un produit qui se trouvait déjà sur le marché avant l'entrée en vigueur du règlement MTI (50). Depuis la parution de ce rapport, une nouvelle AMM a été accordée en 2015 pour l'Holoclar[®], médicament orphelin à base de cellules épithéliales cornéennes humaines. L'AMM de Maci[®] a été suspendu à cause de l'absence de site de fabrication autorisé, alors que celle de Provenge[®] a été retirée à la demande du fabricant (**Tableau 1**).

Tableau 1 : MTI ayant reçus une AMM

Nom commercial (fabricant)	Date de l'AMM européenne	Composition	Indications
ChondroCelect® (Tigenix NV)	05/10/2009	Chondrocytes autologues	Réparation des lésions cartilagineuses localisées et symptomatiques des condyles fémoraux du genou
Glybera® (uniQure Biopharma B.V.)	25/10/2012	Virus modifié pour transporter le gène de la lipoprotéine lipase dans les cellules de l'organisme	Déficit en lipoprotéine lipase (à l'origine d'épisodes récurrents de pancréatites aiguës)
Maci® (Genzyme Europe B.V)	27/06/2013 Suspendue le 08/09/2014	Chondrocytes autologues implantés sur une membrane de collagène	Implant utilisé pour réparer les défauts du cartilage du genou
Provenge® (Dendreon Corporation)	06/09/2013 Retirée le 06/05/2015	Cellules dendritiques autologues activées	Vaccin antitumoral pour les patients atteints de cancers de la prostate résistants aux anti-androgènes
Holoclar® (Holistem Therapie Avanzate)	17/02/2015	Cellules épithéliales cornéennes humaines autologues amplifiées ex vivo contenant des cellules souches	Déficiência en cellules souches limbiques modérée à sévère causée par des brûlures, notamment des brûlures chimiques, aux yeux

Objectifs

La BTC des HCL produit des FE allogéniques et autologues pour le CTB depuis 1988. Dans le cadre de la mise en place et de l'application de la nouvelle réglementation MTI-PP dont font partie les FE, la BTC s'est mise en conformité avec les BPF, notamment en ce qui concerne les locaux, le procédé de fabrication et les processus qualité. La BTC a été autorisée par les autorités de santé à préparer et à distribuer des MTI-PP en 2014 (n° de l'autorisation en cours : ETI/16/M/001). Les FE autologues ont été autorisés sous la nouvelle réglementation en 2016, sous le n° MTI-PP08

Conformément aux exigences des BPF, nous avons décidé de mettre en place des études de stabilité des matières premières et des PTA. Le but étant de valider les péremptions mises en place. Deux de ces PTA sont particulièrement critiques du fait de leur importance et de leur utilisation constante au cours du procédé de fabrication des FE. Il s'agit du MCK et des CNI. Leur péremption, selon des spécifications internes, sont respectivement de 1 mois et de 3 semaines.

Un protocole testant à la fois la stabilité du MCK et des CNI a été mis en place. L'objectif de ce protocole est de :

- Valider l'efficacité et la stabilité du MCK à 1 mois et des CNI à 3 semaines.
- Étudier l'impact de l'utilisation du MCK et des CNI à péremption sur les contrôles qualités libérateurs des FE.
- Étudier l'impact de l'utilisation de ces deux PTA à péremption sur la stabilité des FE dans leur conditionnement final.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

I. Protocole expérimental

A. Données d'entrée

Lors d'une étude réalisée en 2009-2010 à la BTC, la stabilité physicochimique pendant un mois à 5 ± 3 °C d'un milieu de culture pour cellules épithéliales de muqueuse orale, de composition proche de celle du MCK, a été démontrée. Les résultats obtenus ont permis de démontrer qu'il n'y avait pas de différence significative entre l'osmolalité, la stérilité, le pH et la composition ionique des milieux testés à J0 et J30.

Concernant les CNI, des études réalisées au sein de la BTC ont permis de démontrer leur stabilité à 37 °C, en atmosphère humide sous 5 % de CO₂, sur une durée de 3 semaines, avec un changement de milieu de culture à deux semaines. Ces études ayant été réalisées il y a plus de 10 ans, nous avons décidé de revalider ces données selon les BPF, dans un protocole testant à la fois la stabilité et l'efficacité du MCK et des CNI à péremption.

B. Design du protocole

Trois conditions ont été testées (Figure 13) :

- **Condition A** : CNI à 12 ± 2 jours et MCK à 1 mois après fabrication
- **Condition B** : CNI à 3 semaines et MCK à 1 mois après fabrication
- **Condition C** : il s'agit de la condition contrôle, les CNI seront utilisés à 12 ± 2 jours et MCK à 5 ± 2 jours après fabrication

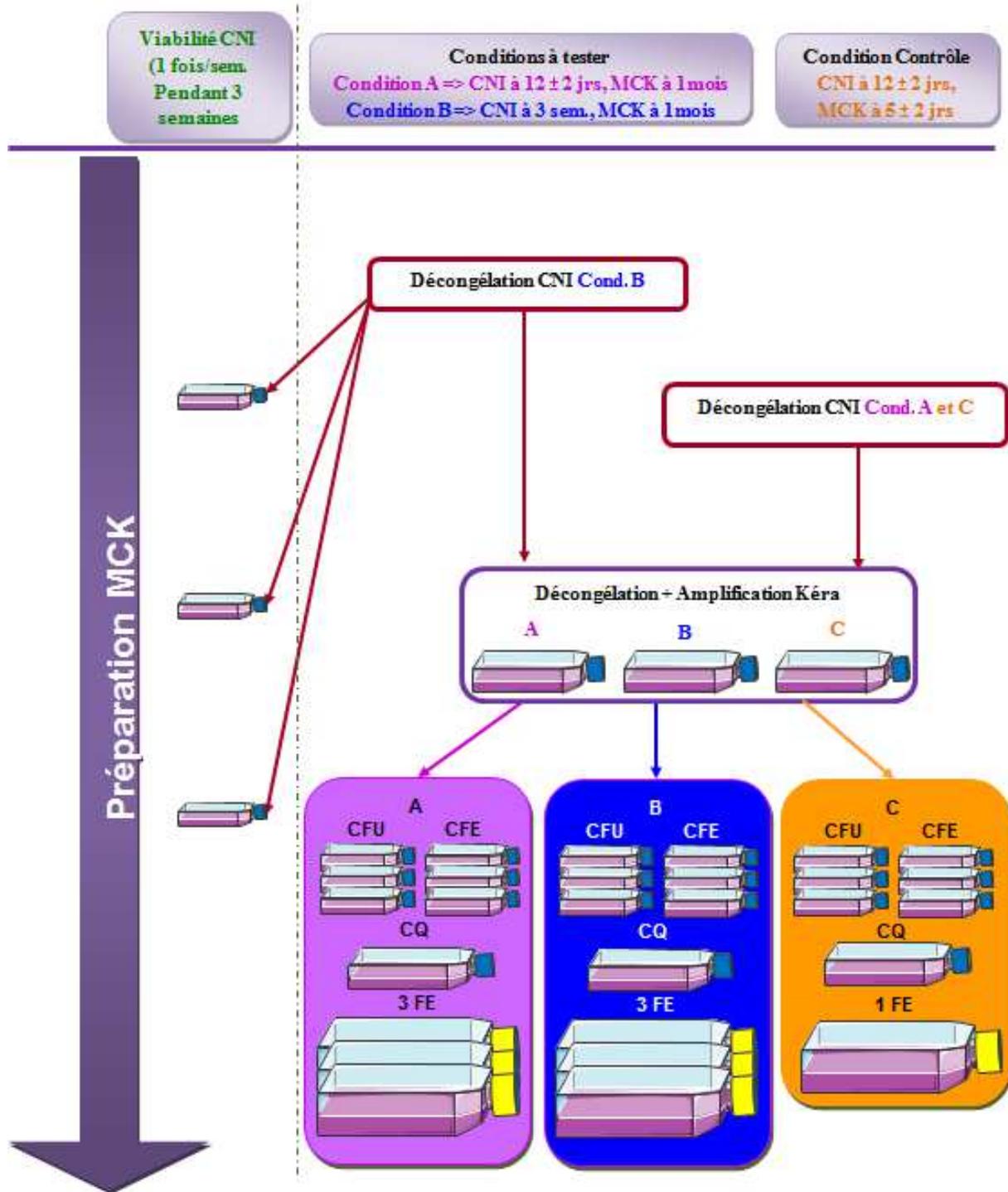


Figure 13 : Schéma du protocole de stabilité MCK-CNI

Chaque condition a été testée sur des kératinocytes de 3 donneurs différents, ensemencés sur 3 lots différents de CNI (Tableau 2), puis conservés à 37°C, en atmosphère humide sous 5% de CO₂. Les CNI proviennent toutes de la même banque de travail, seule la date de congélation de ces cellules inactivées change. Une première étape d'amplification a été réalisée, puis les kératinocytes ont été trypsinés et réensemencés dans des flasques pelables de 150 cm² pour la production de FE, et en flasques de 25 cm² et 75 cm² pour les contrôles qualités (Tableau 4). À chaque étape d'ensemencement ou de changement de milieu, les MCK utilisés étaient soit à un mois de conservation à 5 ± 3 °C pour les conditions A et B, soit à 5 ± 2 jours de conservation pour la condition C. Les FE obtenus sont conservés à 22 ± 3°C, dans du DMEM. Leur intégrité (absence de trous) est contrôlée à 6h et 24h.

Tableau 2 : Identification des souches de kératinocytes et de CNI utilisées

Souches Kératinocytes	Passage	CNI
K5045	FE en P3	CNI γ 130313 du 09/12/2014
K185	FE en P4	CNI γ 180215 du 26/02/2015
K233	FE en P2	CNI γ 100316 du 18/03/2016

C. Données de sortie

Les conditions permettant d'obtenir des résultats conformes aux spécifications, d'une manière reproductible, sur les 3 souches de kératinocytes testées seront acceptées.

II. Matériels et méthodes

A. Culture des kératinocytes :

Les kératinocytes sont cultivés selon la technique de Rheinwald et Green (40). Les cellules sont issues d'un prélèvement de peau humaine saine. Cette biopsie subit plusieurs traitements : délipidation par un bain d'éthanol à 95° puis séparation dermo-épidermique par action enzymatique de la dispase, et enfin, mise en suspension des kératinocytes de l'épiderme par la coupure des jonctions intercellulaires par une autre enzyme, la trypsine-EDTA (Sigma). Après numération sur cellule de Malassez et évaluation de leur viabilité, les kératinocytes sont ensemencés pour amplification.

Dans le cadre de cette étude, les différentes souches de kératinocytes utilisées proviennent de la banque de réserve de la BTC, elles ont été utilisées à différents passages. Ces cellules, conservées dans de la vapeur d'azote grâce à un cryoprotectant, le diméthyl sulfoxyde (DMSO), sont décongelées rapidement à 37°C au bain-marie. Après centrifugation pour éliminer le DMSO, les cellules sont énumérées et leur viabilité évaluée, puisensemencées à raison de 6000 à 8000 cellules par cm² dans des flasques, sur des CNI, et cultivées dans du MCK dont la composition est décrite dans le Tableau 3. Ce dernier est renouvelé trois fois par semaine. Les cultures sont conservées dans un incubateur à 37°C, en atmosphère humide sous 5% de CO₂.

Tableau 3 : Composition du milieu de culture pour kératinocytes (MCK)

Composants	Fournisseurs	Concentrations	Vol. pour 500 ml de milieu
DMEM	Invitrogen / Gibco	58%	290 ml
HAM F12	Invitrogen / Gibco	30%	150 ml
Sérum de Veau FetalClone II	Hyclone	10 %	50 ml
Hydrocortisone	Upjohn	0,4 µg/ml	1 ml
Umuline®	Lilly	0,12 UI/ml	600 µl
Isuprel®	Abbott	0,4 µg/ml	1 ml
Adénine	Préparation pharma.	24,3 µg/ml	5 ml
Tri Iodo Thyronine	Préparation pharma.	2 nM	500 µl
EGF**	R&D Systems	10 ng/ml	500 µl
Amphotéricine B*	Lilly	1 µg/ml	500 µl
Pénicilline G 1MU*	PanPharma	100 UI/ml	250 µl
Gentamycine 10 mg/ml*	PanPharma	20 µg/ml	1 ml

* Les antibiotiques doivent être ajoutés extemporanément lors de l'utilisation du milieu.

** L'EGF doit être ajouté extemporanément lors de l'utilisation du milieu. Il n'est jamais ajouté lors de l'ensemencement.

B. Culture de fibroblastes :

Les fibroblastes utilisés sont des fibroblastes irradiés, provenant d'une banque sécurisée réalisée au sein de la BTC. Les cellules utilisées sont irradiées en passage 9 ou 10 dans un irradiateur avec une source au ⁶⁰Co. Le temps d'irradiation est calculé en fonction de la puissance de la source de façon à obtenir une énergie finale de 60 Grays. Ainsi, les

fibroblastes irradiés ne se multiplient plus, mais continuent à synthétiser des facteurs solubles favorables à la croissance des kératinocytes co-cultivés.

C. Culture de feuillet épidermique

Quatre jours après la confluence des kératinocytes, soit entre J12 et J15, les FE formés sont détachés du fond du support de culture, les flasques de 150 cm² pelables, sous l'action d'une protéase neutre : la dispase. Cette enzyme préserve les jonctions intercellulaires et donc l'intégrité de l'épithélium cultivé, mais coupe les interactions cellules-plastique. Les FE sont ensuite transférés sur une gaze vaselinée, permettant leur manipulation, puis placés dans leur conditionnement primaire qui contient du DMEM comme milieu de transport.

D. Contrôle qualité sur les CNI

1. Viabilité au bleu Trypan

Les CNI sont cultivées dans un incubateur à 37°C, en atmosphère humide sous 5% de CO₂. Avant ensemencement des kératinocytes, leur milieu de culture est changé à 2 semaines. L'évolution de leur viabilité peut être testée après décollement des fibroblastes à l'aide de la trypsine-EDTA. Les fibroblastes ainsi récupérés sont énumérés sur une cellule de Malassez après coloration au bleu Trypan (colorant d'exclusion). Le rapport cellules trypsinées vivantes/cellules ensemencées (**CV/CE**) permet d'apprécier l'évolution dans le temps du nombre de fibroblastes irradiés vivants.

E. Contrôles qualité sur le MCK

1. Stérilité

À la fin de la préparation du MCK, un échantillon de milieu est prélevé et ensemencé dans 2 flacons d'hémoculture Bact'Alert® (aérobies et anaérobies). Cette technique permet de rechercher les bactéries, levures et champignons. Les deux flacons sont ensemencés sous un PSM classe A, avec 5 ml de milieu de culture par flacon, puis placés dans un automate Bact'Alert® (Biomérieux). Le contrôle microbiologique du milieu MCK doit être négatif en culture à 10 jours (**Annexe 4**), avec une libération provisoire des lots de MCK en cas d'absence de germes à 3 jours.

2. Recherche d'endotoxines bactériennes

Le dosage des endotoxines est sous-traité au laboratoire de contrôles de la pharmacie à usage intérieur du groupement hospitalier Edouard Herriot. La technique utilisée est le test de Lysat d'Amœbocytes de Limule réalisée sur du milieu MCK (**selon le chapitre 2.6.14 de la Pharmacopée Européenne, version en vigueur**). Il n'existe pas de monographie pharmacopée spécifiant le seuil de concentration en endotoxines du MCK. De ce fait, nous nous sommes basés sur les spécifications des fournisseurs de milieux de conservation de cornées : inférieur à 1UI/mL pour Stem Alpha[®] et inférieur à 2,5UI/mL pour Eurobio[®]. Nous avons décidé de nous mettre dans les conditions les plus drastiques en fixant la spécification pour la recherche d'endotoxines bactériennes à inférieur à 1UI/mL.

F. Contrôles libérateurs des FE

1. Contrôle d'aspect cellulaire

À chaque étape du procédé, notamment avant le décollement du FE, une observation microscopique est réalisée. Les kératinocytes doivent être adhérents, avec un aspect pavimenteux à contour sombre. Les mélanocytes, d'aspect de cellule dendritique, et les fibroblastes, d'aspect fusiformes, sont éliminés au fur et mesure des passages pour ne retrouver, à confluence, qu'un tapis cohésif de kératinocytes.

2. Stérilité

La stérilité des FE est contrôlée à J-4 avant leur décollement, sur du surnageant de culture sans antibiotiques. Un second Bact'Alert[®] est réalisé le jour du transfert du FE, sur du milieu DMEM prélevé avant conditionnement. Le contrôle microbiologique doit être négatif en culture à 10 jours, les résultats sont donc obtenus en post-greffe. L'absence de germes à 3 jours pour le Bact'Alert[®] réalisé à J-4 permet une libération provisoire des FE avant la greffe. Dans le cadre de cette étude, la stérilité des FE n'a pas été réalisée.

3. Potentiel clonogénique des kératinocytes (informatif)

Il s'agit de la méthode de référence pour quantifier les cellules souches épidermiques. Les kératinocytes sont ensemencés à faible densité (250 cellules) dans 6 flasques de 25 cm² et cultivés selon la méthode décrite précédemment (cf. culture des kératinocytes).

La culture est poursuivie 12 à 14 jours jusqu'à ce que les colonies soient bien visibles (nombre de cellules par clone > 50).

Sur les 6 flasquesensemencées, 3 seront utilisés pour réaliser la coloration des colonies à la rhodamine B (Sigma). **Le Colony Forming Unit ou CFU** correspond au nombre de colonies qui se sont formées. Sur les 3 flasques restantes, une numération cellulaire au bleu de trypan sera réalisée. Le pourcentage de cellules ayant adhéré et formées un holoclone ou un méroclone ou **Colony Forming Efficiency (CFE)** se calcule à partir du CFU et de l'inoculum:

$$CFE = \frac{CFU}{Inoculum} \times 100$$

Le taux de croissance (TC) se calcule à partir du **doublent de population (PD)**

$$PD = \frac{\ln \frac{\text{nombre de cellules}}{CFU}}{\ln 2}$$

$$TC = \frac{PD}{\text{nombre de jours de culture}}$$

Les spécifications des CFE sont de : supérieur ou égal à 1% pour les FE autologues et supérieur ou égal à 2% pour les FE allogéniques.

4. Contrôles de pureté cellulaire

a) *Analyse par cytométrie en flux*

La cytométrie en flux permet d'analyser de manière quantitative le phénotype des cellules isolées à partir de cultures ou de tissus dissociés. Dans le cas de contrôle de pureté des FE, des cellules amplifiées au même passage que celui des FE sont analysées. Les cellules doivent présenter à leur surface le marqueur CD49f, spécifique aux kératinocytes basaux, avec moins de 10 % de la population cellulaire exprimant le CD90, marqueur des fibroblastes contaminants.

b) *Recherche de mélanocytes par immunocytologie par cytospin*

Le cytospin est un procédé de centrifugation permettant, à partir de suspension cellulaire, de concentrer et de projeter des cellules sur une lame d'analyse cytologique. Cette technique permet donc de réaliser une analyse phénotypique par immunocytologie à partir d'un nombre relativement faible de cellules (le plus souvent moins de 100 000

cellules), tout en préservant leur intégrité. Cette technique est préférée à la cytométrie en flux dans le cas où l'antigène à détecter est intracytoplasmique ou quand les anticorps disponibles sur le marché ne sont pas suffisamment spécifiques et/ou n'ont pas une affinité optimale en cytométrie en flux. Dans le cadre des contrôles de la pureté cellulaire des FE, la recherche du marqueur HMB45, spécifique aux mélanocytes est réalisée par immunocytologie après concentration des cellules sur une lame par cyospin. Le nombre de mélanocytes contaminants doit être inférieur à 5/spot, soit inférieur à 1/1000 cellules.

5. Contrôle de l'intégrité des FE

Un contrôle macroscopique de l'intégrité physique des FE est réalisé à 6h et 24h après le décollement et le conditionnement des FE.

6. Spécifications

Dans le **Tableau 4** sont résumés les différents tests à réaliser et les spécifications attendues.

Tableau 4 : Tests et spécifications de validation du procédé FE

Stérilité	Endotoxines Bactériennes	Potentiel clonogénique (informatif)		Pureté cellulaire	Aspect cellulaire	Stabilité des FE
Bact'Alert® négatifs en culture après 10 jours d'incubation.	Concentration en endotoxines bactériennes inférieure à 1UI/ml.	CFU tests supérieur à 90 % des CFU de la condition contrôle	CFE > 2%	-Kératinocytes CD49f > 90% -Fibroblastes CD90 < 10% -Mélanocytes-HMB45 < 5 cellules par spot	Aspect : -Pavimenteux à contour sombre -Absence de vacuole -Absence de germes -Croissance clonale	Intégrité des FE à 6h et 24h.

III. Interface organisationnelle

Tableau 5 : Planning du protocole expérimental

Etape		Contrôle	Etude 1 : K5045	Etude 2 : K185	Etude 3 : K233	
Fabrication MCK1		Bact' Alert J0 et J30 Recherche d'endotoxines à J30	05/12/2014 05/01/2015	12/06/2015 13/07/2015	02/08/2016 02/09/2016	
Fabrication MCK2		Bact' Alert J0 et J30 Recherche d'endotoxines à J30	08/12/2014 07/01/2015	15/06/2015 15/07/2015	05/08/2016 05/09/2016	
Fabrication MCK3		Bact' Alert J0 et J30 Recherche d'endotoxines à J30	09/12/2014 08/01/2015	19/06/2015 17/07/2015	09/08/2016 09/09/2016	
Fabrication MCK4		Bact' Alert J0	12/12/2014	22/06/2015	12/08/2016	
Fabrication MCK5		Bact' Alert J0 et à J30	15/12/2014 12/01/2015	24/06/2015	16/08/2016	
Fabrication MCK6		Bact' Alert J0	17/12/2014	26/06/2015	19/08/2016	
Fabrication MCK7		Bact' Alert J0	19/12/2014	03/07/2015	30/08/2016	
Fabrication MCK8		Bact' Alert J0	22/12/2014	10/07/2015	06/09/2016	
Fabrication MCK9		Bact' Alert J0	26/12/2014	17/07/2015	13/09/2016	
Fabrication MCK10		Bact' Alert J0	02/01/2015	24/07/2015	/	
Fabrication MCK11		Bact' Alert J0	09/01/2015	/	/	
Fabrication MCK12		Bact' Alert J0	16/01/2015	/	/	
Décongélation CNI pour cond. B		Viabilité à décongélation À 1 semaine À 2 semaines À 3 semaines À 4 semaines	09/12/2014 16/12/2014 24/12/2014 02/01/2015 09/01/2015	26/06/2015 03/07/2015 10/07/2015 17/07/2015 /	16/08/2016 23/08/2016 30/08/2016 06/09/2016 /	
Changement de milieu CNI pour cond. B à 2 sem.		/	24/12/2014	10/07/2015	30/08/2016	
Décongélation CNI condition A et C		Viabilité à décongélation	30/12/2014	07/07/2015	26/08/2016	
Décongélation kératinocytes	1T75/cond.	Viabilité à décongélation	02/01/2015	10/07/2015	30/08/2016	
Changement de milieu pour les kératinocytes en cours d'amplification		Changement de milieu 1 Changement de milieu 2	05/01/2015 07/01/2015	13/07/2015 15/07/2015	02/09/2016 05/09/2016	
Trypsination- ensemencement kératinocytes	A	6T25 3TPP 1T75	Viabilité cellulaire	08/01/2015	17/07/2015	07/09/2016
	B	6T25 3TPP 1T75				
	C	6T25 1TPP 1T75				
Changement de milieu pour les kératinocytes ensemencés en FE ou pour les contrôles qualités		Changement de milieu 1 Changement de milieu 2 Changement de milieu 3 Changement de milieu 4 Changement de milieu 5	12/01/2015 14/01/2015 16/01/2015 19/01/2015	20/07/2015 22/07/2015 24/07/2015 27/07/2015	09/09/2016 12/09/2016 14/09/2016 16/09/2016 19/09/2016	
Coloration des CFU et trypsination- numération CFE	CFU : 3T25/cond. CFE : 3T25/cond.	/	20/01/2015	29/07/2015	19/09/2016	
Cytométrie en flux et marquage immunocytologique	1T75/cond.	/	15/01/2015	23/07/2015	21/09/2016	
Découlement des FE		Intégrité à 6h et à 24h	21/01/2015	30/07/2015	20/09/2016	

Résultats

A. Viabilité des CNI au bleu trypan



Figure 14 : Aspect microscopique des CNIensemencées

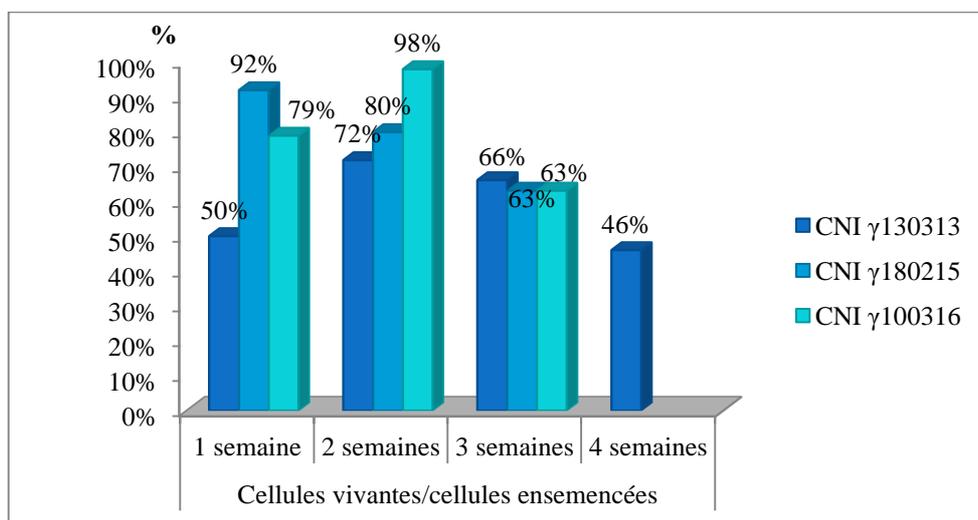


Figure 15 : Viabilité des souches de fibroblastes irradiées utilisées pour les 3 études.

La **Figure 14** montre l'aspect fusiforme et non jointif des fibroblastes constituant les CNI en culture. La viabilité des CNI des 3 études est représentée dans la **Figure 15**. Les viabilités ont été réalisées toutes les semaines après ensemencement. Les résultats sont présentés sous forme de rapport entre les cellules vivantes et les cellules ensemencées (CV/CE). Pour la première étude, la viabilité des CNI a été testée sur 4 semaines. Le nombre de cellules vivantes retrouvées au bout de 4 semaines était inférieur à la moitié des cellules ensemencées. Nous avons donc décidé d'utiliser les CNI à 3 semaines pour les 2 études suivantes. Les résultats montrent que pour les 3 études, le rapport entre les cellules vivantes et les cellules ensemencées est supérieur à 60% et cela jusqu'à 3 semaines après ensemencement.

B. Contrôle de stérilité du MCK

Tableau 6 : Résultats des contrôles de stérilité par Bact'Alert® à J0 et J30

	K5045	K185	K233
MCK1 à J0	Négatif	Négatif	Négatif
MCK1 à J30	Négatif	Négatif	Négatif
MCK2 à J0	Négatif	Négatif	Négatif
MCK2 à J30	Négatif	Négatif	Négatif
MCK3 à J0	Négatif	Négatif	Négatif
MCK3 à J30	Négatif	NR	Négatif
MCK4 à J0	Douteux	Négatif	Négatif
MCK5 à J0	Négatif	Négatif	Négatif
MCK5 à J30	NR	Négatif	Négatif
MCK6 à J0	Négatif	Négatif	Négatif
MCK7 à J0	Négatif	Négatif	Négatif
MCK8 à J0	Négatif	Négatif	Négatif
MCK9 à J0	Négatif	Négatif	Négatif
MCK10 à J0	Négatif	Négatif	NR
MCK11 à J0	Négatif	NR	NR
MCK12 à J0	Négatif	NR	NR

NR : Non réalisé

La stérilité de tous les lots de MCK produits au cours des 3 études a été contrôlée à J0. Trois lots de MCK par étude ont également été contrôlés à péremption (J30). Les contrôles de stérilité à J0 et J30 sont revenus négatifs pour 30 lots testés (**Tableau 6**). Un seul milieu, le MCK4 de la première étude, a eu un résultat douteux deux jours après l'ensemencement du flacon d'hémoculture aérobie. Ce milieu a été écarté de l'étude après avoir envoyé un échantillon au laboratoire de microbiologie des HCL pour une identification microbienne. Le résultat de cette recherche est revenu négatif. Par principe de précaution, le MCK4 n'a pas été utilisé dans l'étude. Afin de remplacer le MCK4, le MCK5 de l'étude 1 a été préparé en double volume.

La modification du nombre de milieux préparés d'une étude à une autre est due à une optimisation des volumes et des dates de production des milieux.

C. Contrôles d'apyrogénicité du MCK

Tableau 7 : Résultats des dosages d'endotoxines de 3 lots de MCK par étude

	Étude 1			Étude 2			Étude 3		
	MCK1	MCK2	MCK3	MCK1	MCK2	MCK3	MCK1	MCK2	MCK3
Essai d'endotoxines bactériennes (UI/mL)	0.058	0.059	0.057	0.101	0.098	0.094	0.078	0.092	0.087
Spécification < 1UI/mL	C	C	C	C	C	C	C	C	C

C : Conforme

Pour chaque étude, l'apyrogénicité de trois lots de MCK a été testée à J30 sur du milieu complet (après ajout d'EGF). Pour les 3 études, les dosages d'endotoxines variaient de 0.058 UI/mL à 0.101 UI/mL, ils étaient donc très inférieurs aux spécifications en vigueur au sein de la BTC (<1UI/mL).

D. Potentiel clonogénique

Tableau 8 : Potentiel clonogénique, dédoublement de population et taux de croissance des trois souches testées.

		K5045			K185			K233		
Nbre de jours de culture		12			12			12		
Flasque		1	2	3	1	2	3	1	2	3
Nombre de cellules ensemencées		250	250	250	250	250	250	250	250	250
CFU	A	7	17	19	17	18	17	26	26	29
	B	5	19	14	19	17	21	20	29	25
	C	NR	NR	NR	18	22	22	31	34	32
Moy. CFU	A	14.3			17.3			27		
	B	12.7			19			24.7		
	C	NR			20.7			32.3		
%CFU / cond.C	A	NR			83.6%			83.6%		
	B	NR			91.8%			76.5%		
CFE (%)	A	5.7			6.9			10.8		
	B	5.1			7.6			9.9		
	C	NR			8.3			12.9		
PD	A	NR			15.5			16.3		
	B	14.5			15.4			15.9		
	C	NR			15.1			16.2		
TC	A	NR			1.29			1.36		
	B	1.21			1.28			1.33		
	C	NR			1.26			1.35		

NR : Non réalisé

Pour la souche K5045, les résultats sont partiels suite à une erreur de manipulation. Les résultats présentés dans le **Tableau 8** montrent une grande variabilité dans le nombre de clones entre les différentes souches de kératinocytes et les différentes conditions testées. Nous retrouvons, par exemple, une moyenne de CFU de 12.7 pour la condition B des K5045 contre une moyenne de CFU de 32.3 pour la condition C des K233. On retrouve cette variabilité interindividuelle dans les résultats de CFE. Ces derniers sont conformes à nos spécifications pour toutes les conditions et toutes les souches testées (> 2%). Le rapport CFU de la condition A sur les CFU de la condition C pour les souches K185 et

K233 sont de 83.6% et donc inférieur à nos spécifications. Il en est de même pour les CFU de la condition B sur les CFU de la condition contrôle pour la souche K233 (76.5%).

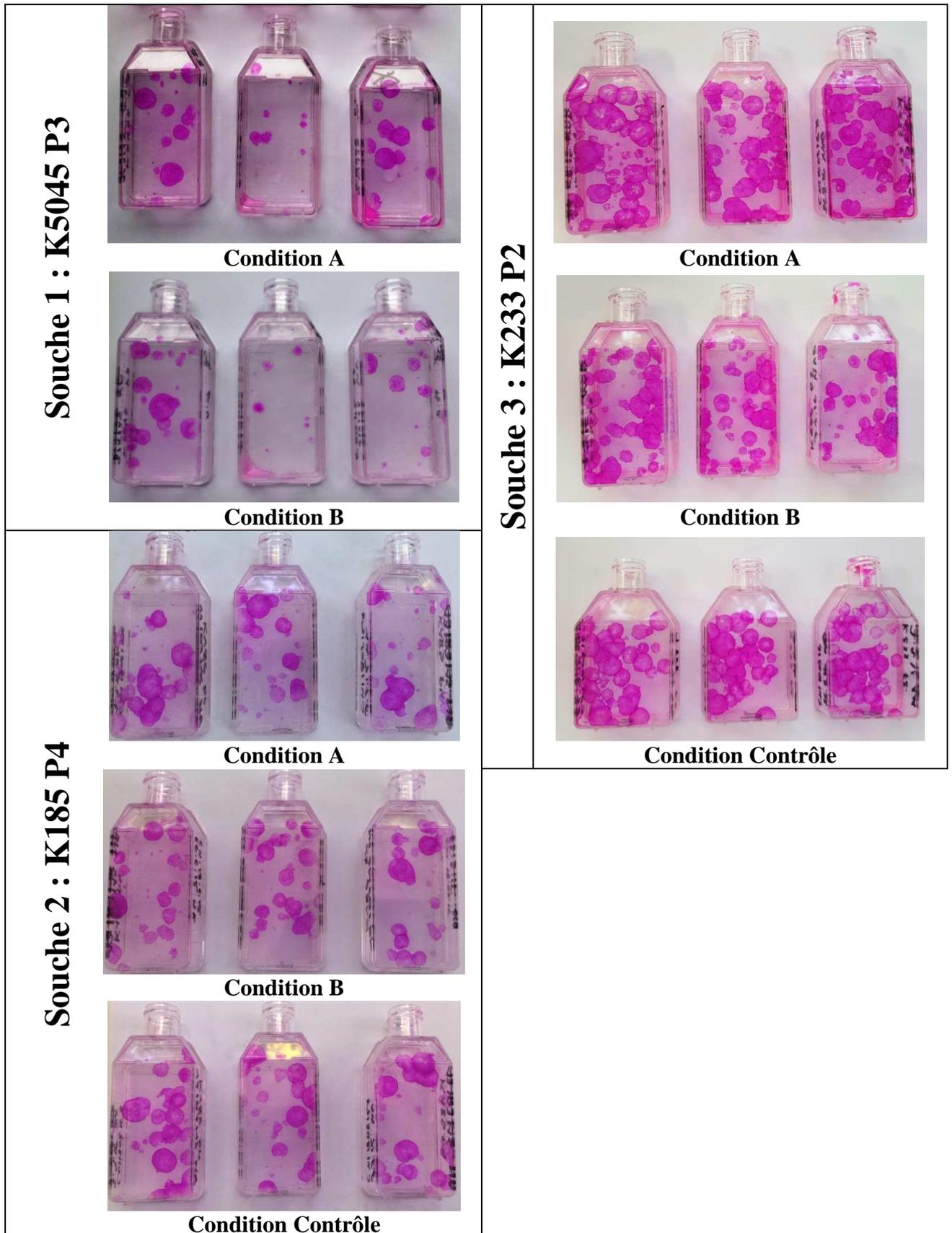


Figure 16 : Clones des trois souches testées

E. Contrôles de pureté cellulaire

1. Contrôle d'identité, de pureté et de fonctionnalité cellulaire : kératinocytes-CD49f

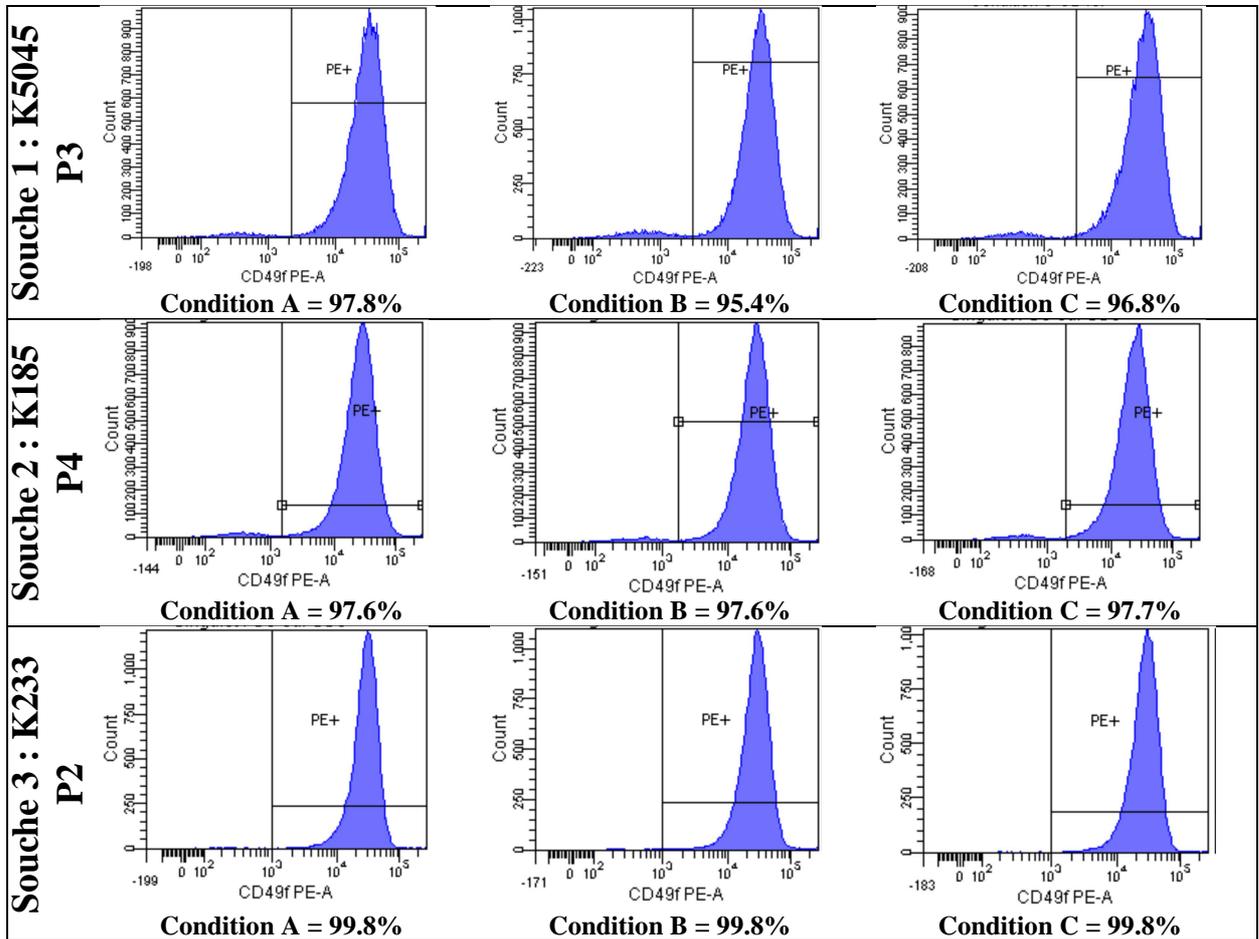


Figure 17 : Recherche de kératinocytes CD49f par cytométrie en flux

La **Figure 17** représente la recherche de kératinocytes prolifératifs par la mise en évidence du marqueur CD49f par cytométrie en flux. Les résultats montrent que les kératinocytes représentent plus de 90 % de la population cellulaire au stade FE, et cela, quelle que soit la souche ou la condition testée. Ces pourcentages, variants de 95.4% à 99.8 % sont en conformité avec nos spécifications.

2. Recherche de mélanocytes contaminants – HMB45

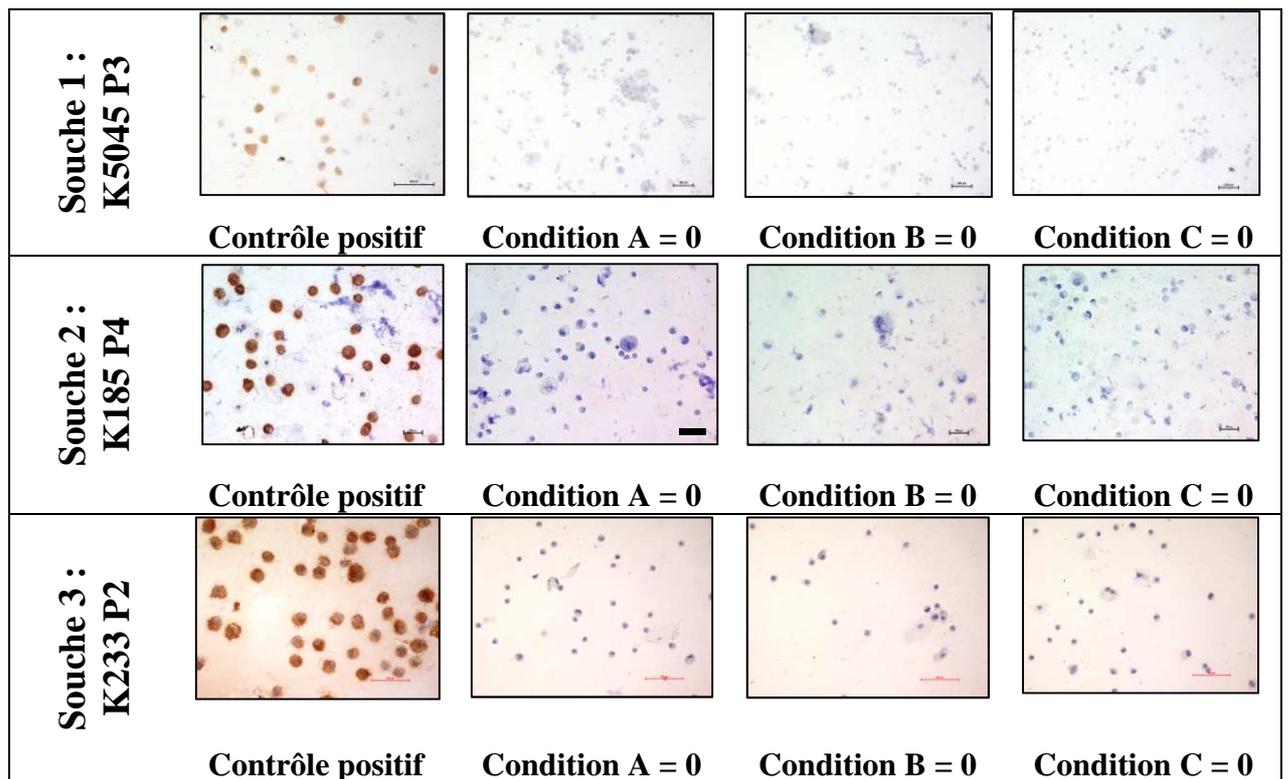


Figure 18 : Recherche de mélanocytes contaminants par Immunocytologie

La **Figure 18** représente la recherche de mélanocytes contaminants par la mise en évidence du marqueur HMB45 par Immunocytologie. Pour les 3 études, aucun mélanocyte, dont on retrouve l'aspect très évocateur dans le contrôle positif, n'a été retrouvé dans les conditions testées. Les résultats étaient donc conformes aux spécifications (<5 cellules par spots).

3. Recherche de fibroblastes contaminants – CD90

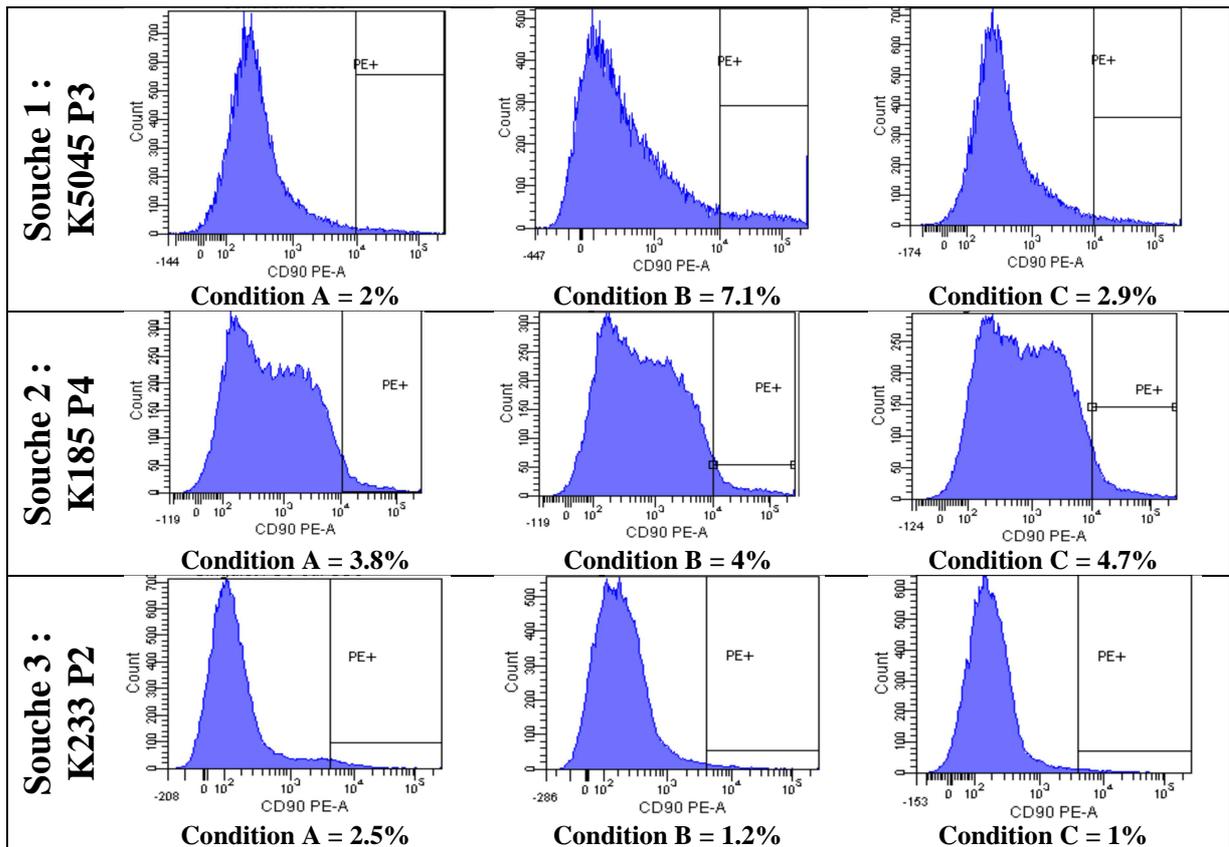


Figure 19 : Recherche de fibroblastes contaminants par cytométrie en flux

La **Figure 19** représente la recherche de fibroblastes contaminants par la mise en évidence du marqueur CD90 par cytométrie en flux. Les résultats montrent une contamination fibroblastique allant de 1% à 7.1%. Les pourcentages des populations de fibroblastes retrouvées en cytométrie en flux sont donc conformes aux spécifications (<10 %).

F. Contrôle d'aspect et d'intégrité des FE

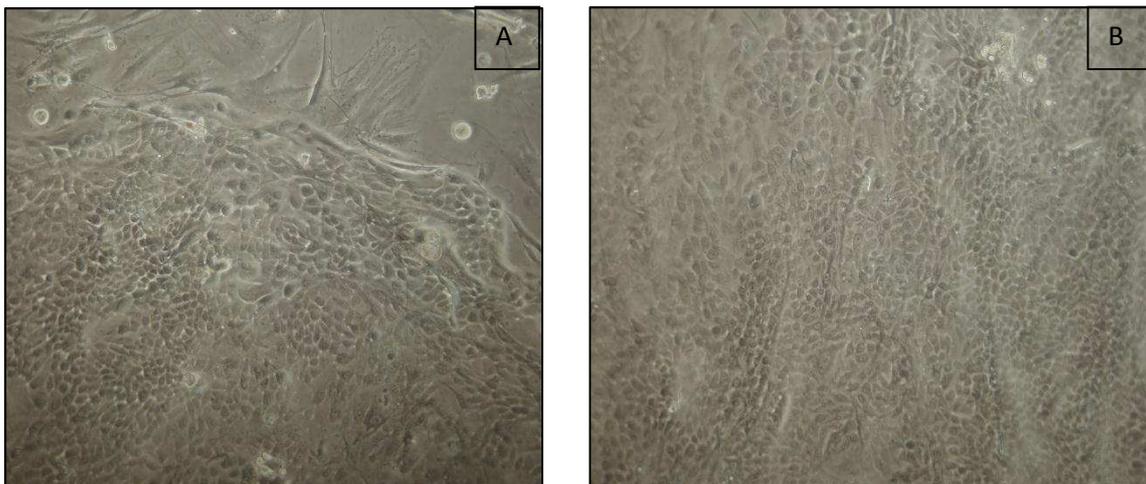


Figure 20 : aspect des kératinocytes en culture

(A) culture de kératinocytes sur CNI, (B) kératinocytes à confluence avant décollement du FE

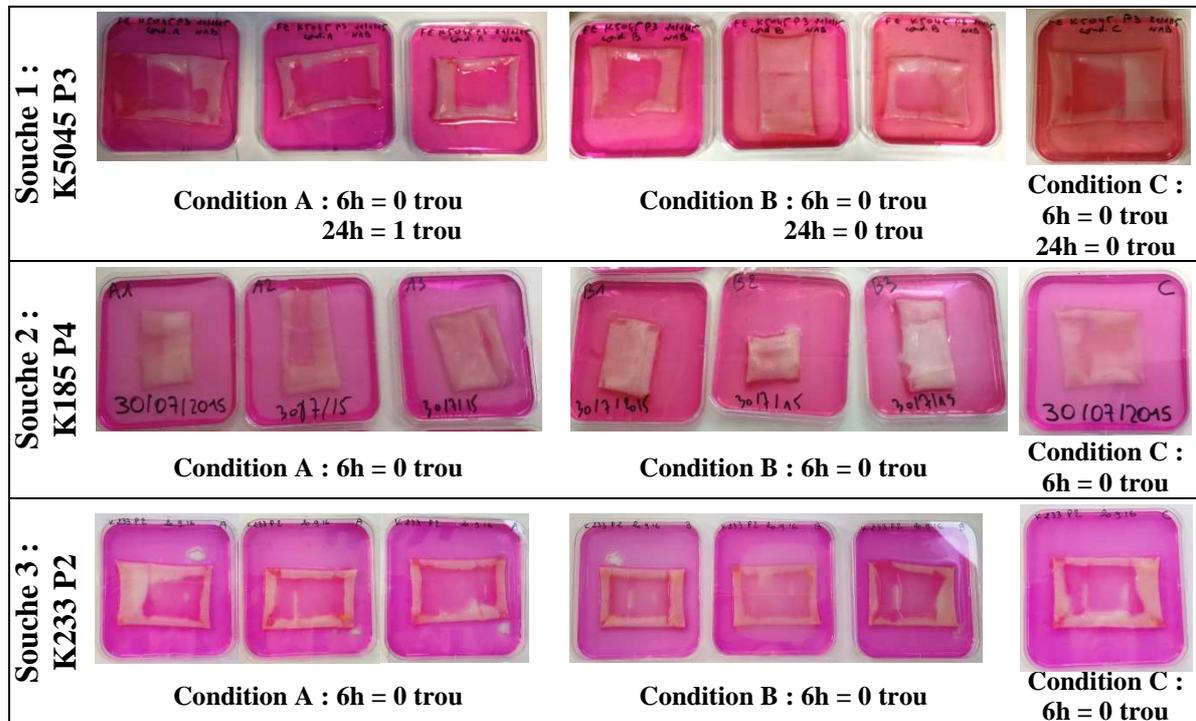


Figure 21 : intégrité physique des FE

Dans les 3 études, les FE ont été décollés 13 jours après ensemencement. Après leur conditionnement, ils ont été maintenus à $22 \pm 3^\circ\text{C}$ pendant 6h et 24h pour la première étude. Pour la condition A, un trou est apparu au bout de 24h, mais les FE sont restés intègres à 6h. Nous avons alors décidé de ramener la péremption des FE à 6h pour les deux études suivantes. Aucun trou n'est apparu dans les conditions testées pour les souches K185 et K233 au bout de 6h.

G. Récapitulatif des résultats

Dans le **Tableau 9** sont résumés les résultats obtenus pour les 3 souches de kératinocytes testées.

Tableau 9 : récapitulatif des résultats obtenus lors des 3 études de stabilité

	Stérilité	Endotoxines Bactériennes	Potentiel clonogénique (informatif)		Pureté cellulaire	Aspect cellulaire	Stabilité des FE	
	Bact'Alert négatifs en culture après 10 jours d'incubation.	Concentration en endotoxines bactériennes inférieure à 1UI/ml.	CFU tests supérieur à 90 % des CFU de la condition contrôle	CFE > 2%	-Kératinocytes CD49f > 90% -Fibroblastes CD90 < 10% -Mélanocytes < 5 cellules par spot	Aspect : -Pavimenteux à contour sombre -Absence de vacuole -Absence de germes -Croissance clonale	Intégrité des FE à 6h et 24h.	
K5045	Conforme pour tous les lots de MCK utilisés	Conforme pour les 3 lots de MCK testés	A =14.3		5.7	Conforme	Conforme	Conforme à 6h
			B= 12.7		5.1			
			Condition contrôle non réalisée					
K185	Conforme pour tous les lots de MCK utilisés	Conforme pour les 3 lots de MCK testés	A =17.3	%A/C = 83.6%	A= 6.9	Conforme	Conforme	Conforme à 6h
			B =19	%B/C = 91.8%	B= 7.6			
			C= 20.7		C= 8.3			
K233	Conforme pour tous les lots de MCK utilisés	Conforme pour les 3 lots de MCK testés	A =27	%A/C = 83.6%	A= 10.8	Conforme	Conforme	Conforme à 6h
			B =24.7	%B/C = 76.5%	B= 9.9			
			C= 32.3		C= 12.9			

Discussion

Les FE cultivés sont indiqués chez les grands brûlés de plus de 70% de la surface corporelle, lorsque les sites donneurs d'autogreffes sont insuffisants. Les FE ont grandement contribué à l'amélioration du pronostic vital des patients très grands brûlés.

L'entrée en vigueur en 2011 de l'adaptation française du règlement européen n° 1394 de 2007, par l'intermédiaire de la loi n° 2011-302, ont fait basculer le statut des FE de préparation de thérapie cellulaire à celui de MTI-PP. Des mises en conformité aux BPF pharmaceutiques ont donc été nécessaires au sein de la BTC, notamment par la mise en place d'études de stabilité des matières premières et des PTA.

Le MCK, utilisé dès les premières étapes du procédé et jusqu'au décollement des FE, est stable du point de vue physico-chimique pendant un mois à 5 ± 3 °C (selon une étude réalisée en 2009-2010). Nos résultats montrent que les 31 lots de MCK fabriqués au cours des trois études ne présentaient pas de contamination bactérienne à J0. Les 9 lots testés à J30 étaient également stériles. La concentration en endotoxines bactériennes réalisée à J30 sur 9 lots de MCK était inférieure à nos spécifications (1UI/mL). La concentration maximale obtenue dans le cadre de cette étude était dix fois moins élevée que nos spécifications, ce qui nous conforte dans notre choix de nous baser sur les données les plus drastiques des fournisseurs de milieux de conservation de cornées pour établir nos spécifications. Le procédé de fabrication du MCK utilise des matières premières stériles : les milieux de base sont produits aseptiquement avec une filtration stérilisante finale, les sérums de veau sont irradiés au minimum à 30 KGrays, L'EGF, la tri-iodo-thyronine et l'adénine sont stérilisés par filtration stérilisante à 0,22µm et enfin, tous les autres produits sont des médicaments injectables et donc stériles. De plus, la préparation et la répartition des différents composants du MCK se font d'une manière aseptique dans des zones de classe B et sous PSM de classe A. La stérilité et l'apyrogénicité des différents lots testés au cours de cette étude nous permettent de nous assurer de la stabilité microbiologique du MCK.

Les CNI décrites par Green, sont constituées d'une lignée de fibroblastes murins 3T3 irradiés (53). Les fibroblastes murins peuvent être remplacés par des fibroblastes d'origine humaine afin de se rapprocher des conditions physiologiques (54), c'est ce qui a été validé au sein de la BTC. L'irradiation des fibroblastes permet de stopper leur multiplication, sans altérer leur métabolisme ni leur potentiel sécrétoire indispensable à la

multiplication des kératinocytes. La stabilité des CNI pour la production de FE, en effet, en cas de perte d'efficacité des CNI, les fibroblastes du patient ne seront pas inhibés, entraînant ainsi une augmentation des impuretés cellulaires, avec un impact sur l'intégrité du FE. Afin d'évaluer la stabilité des CNI, nous avons décidé de tester leur viabilité. Après trypanisation-numération cellulaire au bleu trypan, le rapport CV/CE nous a permis d'étudier l'évolution dans le temps du nombre de fibroblastes irradiés en culture. La baisse du rapport CV/CE de moins de 50% lors de la première étude nous a amené à réduire la péremption des CNI à 3 semaines. Les résultats obtenus sur les deux dernières études étaient concordants avec ceux de la première étude, à savoir qu'à trois semaines, trois différentes souches de CNI présentaient un rapport CV/CE de 63% à 66%. Nos résultats montrent que dans ces conditions, le nombre de fibroblastes irradiés est suffisant pour stimuler la croissance des kératinocytes tout en inhibant celle des fibroblastes du patient. Ceci est confirmé par les contrôles d'identité cellulaire et la recherche d'impuretés.

L'étude de la stabilité des CNI et du MCK passe également par l'étude de l'impact des durées de conservation sur le procédé de fabrication. Ainsi, les CNI et MCK produits ont été utilisés pour fabriquer des FE. Les contrôles qualités libératoires des FE ont été réalisés. Au cours des amplifications des kératinocytes et des cultures de FE, la morphologie caractéristique des kératinocytes observée au contrôle microscopique a permis de déterminer, dans un premier temps, l'identité et la pureté cellulaire. En effet, leur morphologie pavimenteuse et jointive permet de distinguer les kératinocytes en culture des autres cellules cutanées, fusiformes pour les fibroblastes ou dendritiques pour les mélanocytes. Ce contrôle est également prédictif de la non-intégrité du FE après son détachement du fond de la flasque. En effet, les fibroblastes étant non jointifs, leur présence peut entraîner un défaut d'intégrité du feuillet. Une observation microscopique a été réalisée tout le long du procédé, et spécialement après confluence des FE, ce qui nous a permis de nous assurer de l'absence de fibroblastes et de mélanocytes contaminants. Pour valider l'identité, la pureté et la fonctionnalité cellulaire, la mise en évidence du marqueur de surface CD49f, spécifique aux kératinocytes prolifératifs a été réalisée par cytométrie en flux. Pour les trois souches, et sous toutes les conditions testées, la population cellulaire des kératinocytes CD49f était en moyenne de 98%, donc supérieure à 90% et conforme à nos spécifications. Ces résultats ont permis de confirmer que, quelle que soit la condition testée, les FE sont constitués de plus de 90% de kératinocytes prolifératifs. La présence d'impuretés cellulaires entraîne des risques de perte d'intégrité du FE et/ou d'effets secondaires. Dans les études réalisées, la recherche d'impuretés cellulaires montre que le

pourcentage de fibroblastes-CD90, qui est en moyenne de 3% dans toutes les études, ainsi que le nombre de mélanocytes-HMB45 marqués en immunocytochimie, étaient inférieurs à nos spécifications. Il apparaît donc que, l'utilisation de MCK et de CNI à péremption n'entraîne pas de contamination par des impuretés cellulaires. Le choix des différents marqueurs décrits ci-dessus a été fait sur la base de données bibliographiques. Ces marqueurs ont également été testés quant à leur sensibilité (intensité du marquage), leur spécificité (marqueur d'un seul type cellulaire).

Le potentiel clonogénique est la technique de référence pour la mise en évidence des cellules souches (11). Cependant, du fait de la grande variabilité individuelle des résultats, ce test n'est utilisé qu'à titre informatif. Il ne sert donc pas de contrôle libératoire. Les résultats obtenus dans le cadre de cette étude montrent que les conditions optimales de culture de kératinocytes nécessitent l'utilisation de CNI à 12 ± 2 jours et du MCK à 5 ± 2 jours. Il apparaît également une baisse du nombre de clones dans les conditions utilisant des CNI et/ou du MCK à péremption par rapport à la condition contrôle. Cependant, cette baisse reste mesurée, car le pourcentage de CFU le plus bas retrouvé dans la condition B, utilisant à la fois des CNI et du MCK à péremption, n'était que de 76.5% de la condition optimale. De plus, le potentiel clonogénique exprimé en pourcentage de cellules formant des colonies (CFE) reste conforme à nos spécifications (2%). Le test CFU/CFE n'ayant qu'une valeur informative, mais non bloquante pour la libération des FE, il n'y a aucun impact de ces résultats sur notre étude, cependant, ils sont à prendre en compte dans notre pratique clinique lors de l'utilisation de CNI et/ou de MCK à péremption.

Enfin, le dernier objectif de notre étude était d'étudier l'impact des durées de conservation du MCK et des CNI sur la stabilité du produit fini, le FE. Après décollement des FE sur une gaze vaselinée et leur conditionnement dans une boîte de pétri stérile contenant du DMEM, l'intégrité des FE a été vérifiée macroscopiquement à 6h et à 24h pour la première étude. Dans la condition A, un trou est apparu au bout de 24 heures sur un des 3 FE de la condition. Nous avons donc ramené pour la suite de l'étude la péremption des FE à 6 heures. Aucun trou n'a été retrouvé dans les conditions testées pour les K185 et les K233. Cette péremption de 6 heures pour les FE n'a aucun impact sur notre pratique clinique, car les FE sont toujours produits et utilisés par les chirurgiens dans un délai inférieur à 6 heures.

Conclusions

Les FE sont des MTI-PP indiqués dans le recouvrement des grands brûlés de plus 70% de surface corporelle, en complément de l'autogreffe cutanée. Les objectifs de ce travail étaient de valider la stabilité du MCK et des CNI, deux PTA indispensables et critiques dans le procédé de production des FE. L'impact de leur utilisation à péremption sur les contrôles qualités libératoires des FE et sur la stabilité du FE à 6 heures et 24 heures ont été étudiés. Ce travail a été réalisé sur 3 souches différentes de kératinocytes, conformément aux exigences des BPF.

Nos résultats montrent que le MCK est stable sur 1 mois à $5 \pm 3^\circ\text{C}$, et les CNI sur 3 semaines dans un incubateur à 37°C et en présence de 5% de CO_2 . L'utilisation de ces deux PTA à péremption n'a pas d'impact sur les contrôles qualités libératoires des FE : plus de 90% des cellules constituant le FE étaient des kératinocytes prolifératifs, moins de 10% étaient des fibroblastes et aucun mélanocyte n'a été détecté en immunocytologie. Les CFE des différentes souches, sous toutes les conditions testées étaient tous conformes. Enfin, les FE décollés et conditionnés étaient stables pendant 6 heures à $22 \pm 3^\circ\text{C}$. Un seul FE sur 21 fabriqués était non conforme à 24 heures.

Tous les lots de MCK produits étaient stériles et apyrogène. Concernant les CNI, le nombre de fibroblastes irradiés en culture est supérieur à 50% des fibroblastes ensemencés au bout de 3 semaines de culture. Dans les 3 conditions testées, les contrôles libératoires des FE sont conformes. Ainsi, au vue des résultats, la stabilité du MCK est validée à 1 mois avec une conservation à $+5 \pm 3^\circ\text{C}$. La stabilité des CNI est validée à 3 semaines lorsqu'elles sont conservées dans un incubateur à 37°C et en présence de 5% de CO_2 . La stabilité des FE a été ramenée à 6 heures à $+22 \pm 3^\circ\text{C}$. Ces validations permettent à la BTC de se mettre en conformité avec la réglementation en vigueur, tout en garantissant une utilisation optimale et sécurisée des FE chez les grands brûlés.

Le Président du Jury,
(Nom et Signature)

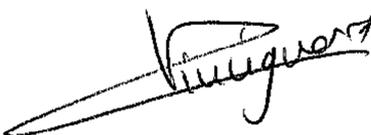


VU ET PERMIS D'IMPRIMER,
Lyon, le



Lyon

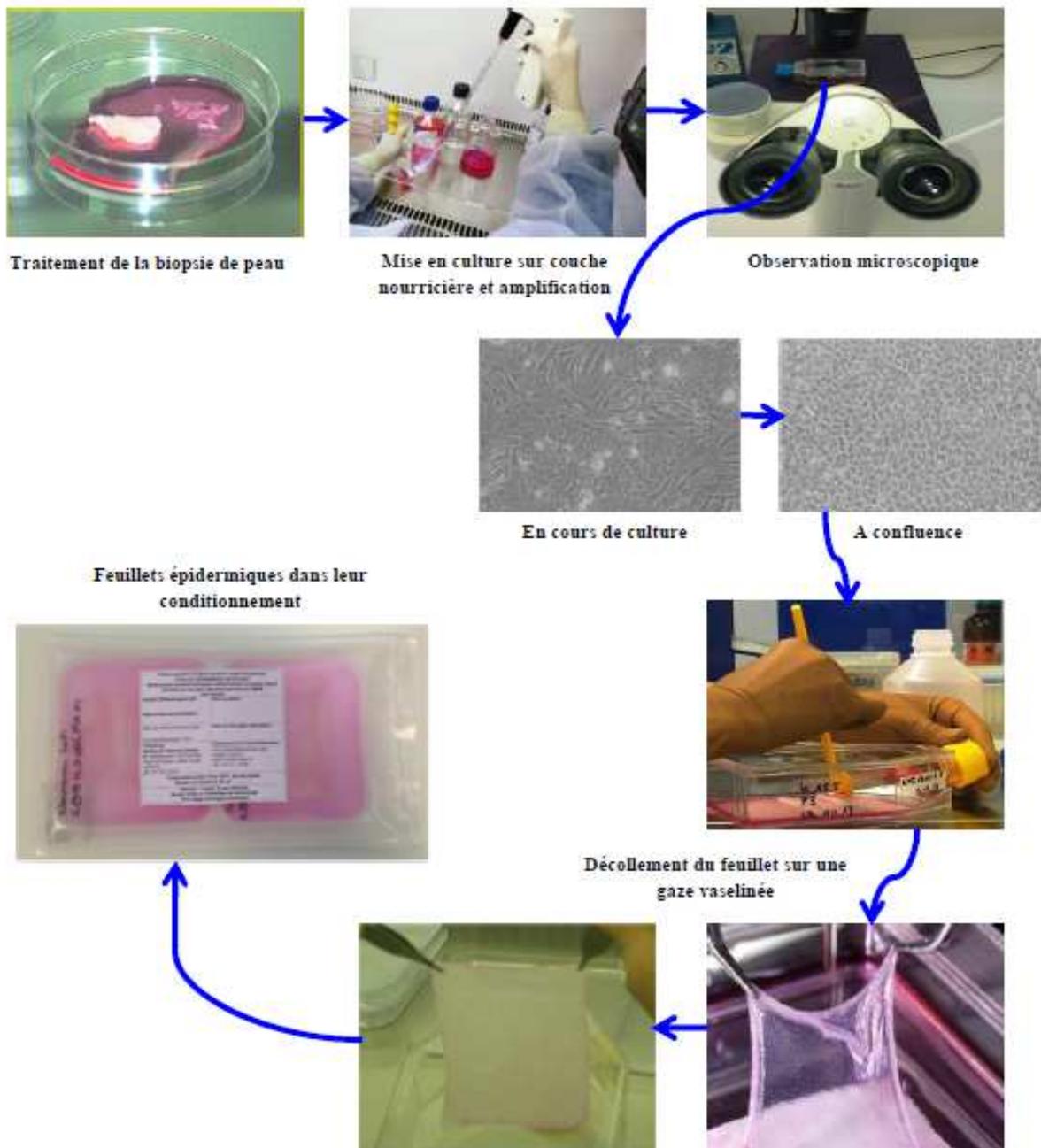
Vu, la Directrice de l'ISPB, Faculté de Pharmacie de
Pour le Président de l'Université Claude Bernard



Professeure C. VINCIGUERRA

ANNEXES

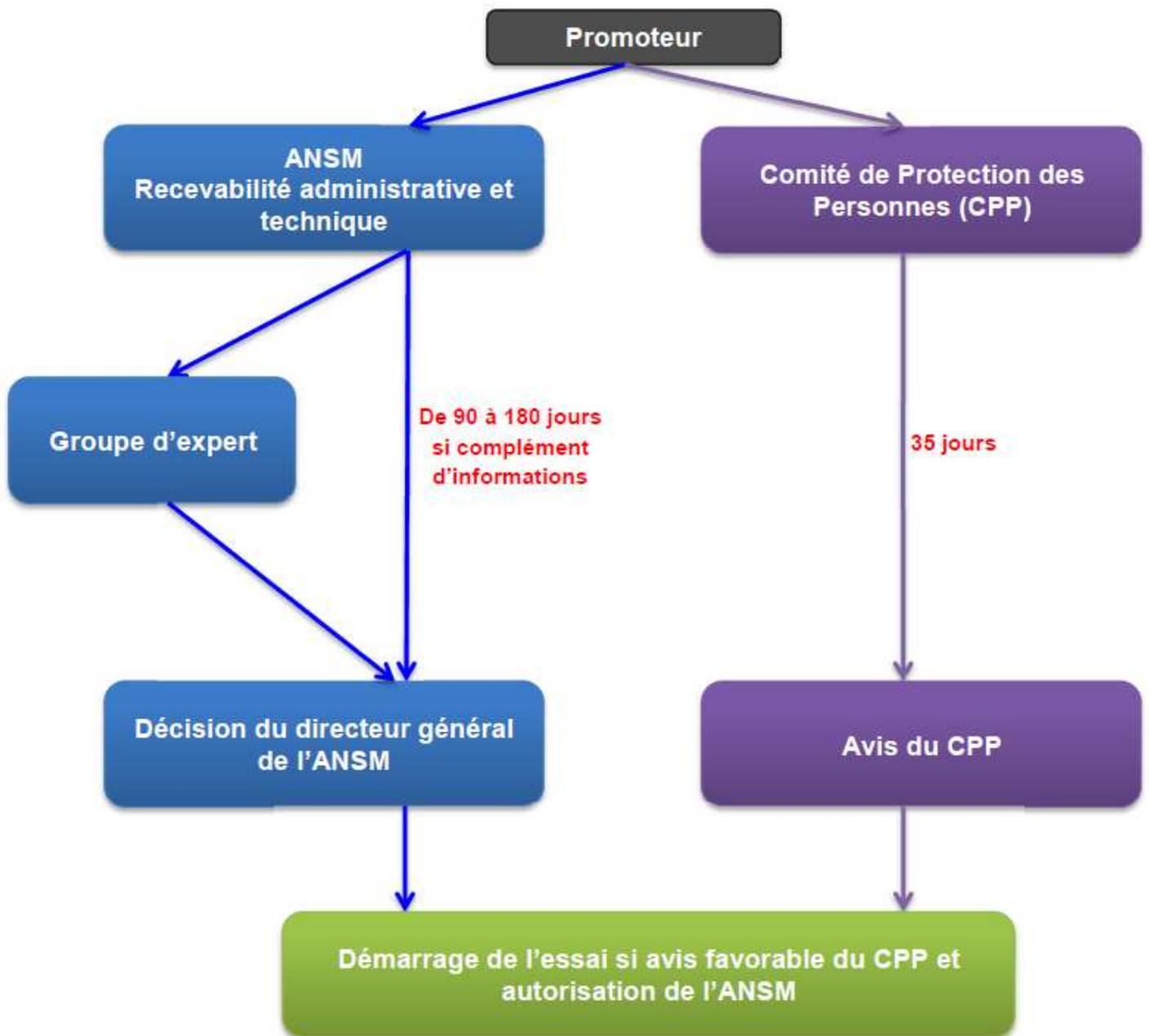
Annexe 1 : Procédé de fabrication des feuillets épidermiques



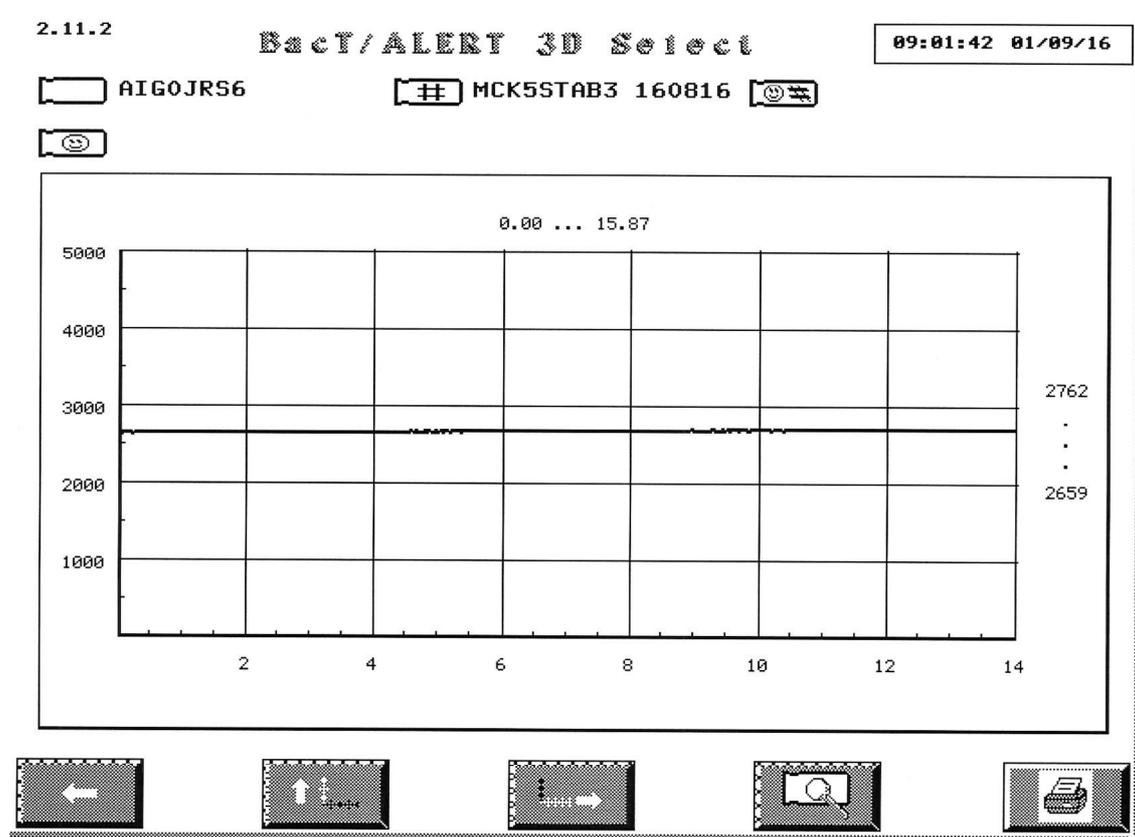
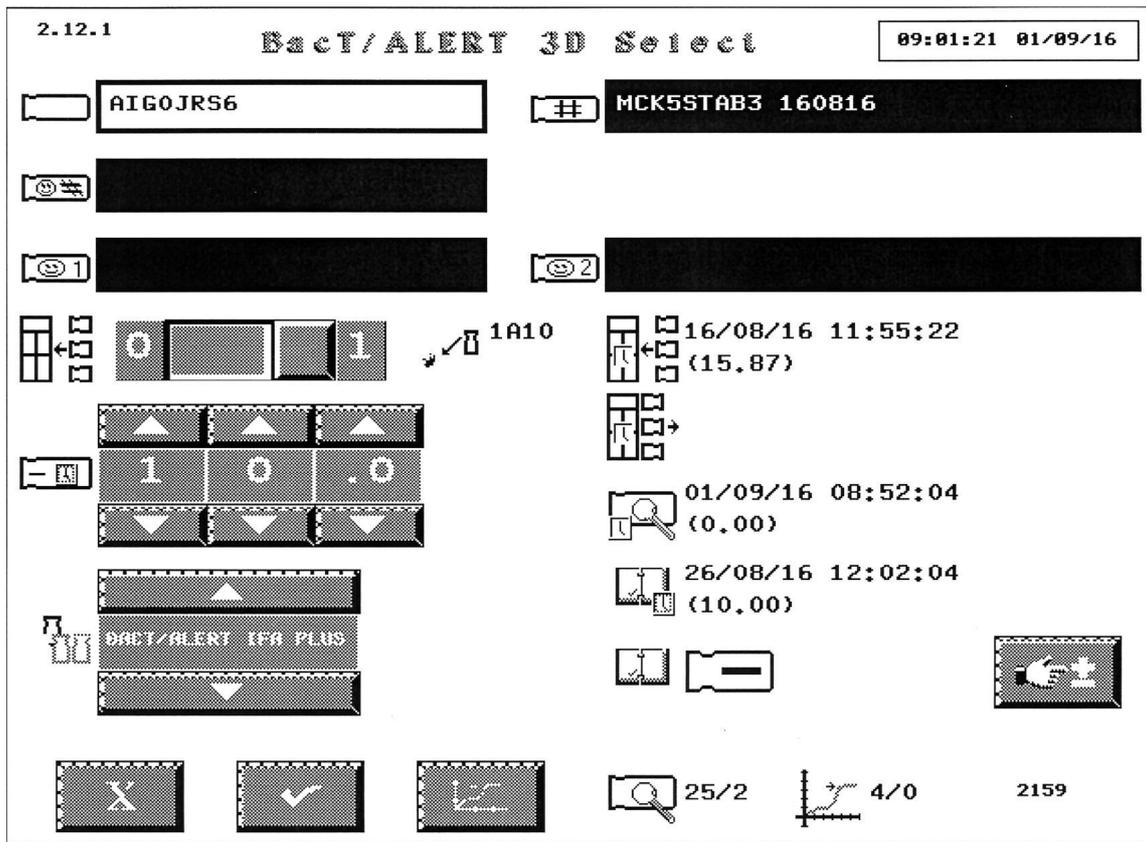
Annexe 2 : Liste des manipulations substantielles (45)

Préparation de thérapie cellulaire	Manipulations non substantielles	Découpage
		Broyage
		Façonnage
		Centrifugation
		Trempe dans des solutions antibiotiques
		Stérilisation
		Irradiation
		Séparation, concentration ou purification de cellules
		Filtration
		Lyophilisation
		Congélation
		Cryoconservation
Vitrification		
Médicament de thérapie innovante	Manipulations substantielles	Culture ex vivo
		Expansion/activation ex vivo
		Manipulation génétique (transfert de gènes, modification du génome)
		Altération du phénotype

Annexe 3 : Procédure de demande d'autorisation d'essai clinique de MTI



Annexe 4 : Exemple de feuille de résultat de Bact'Alert®



RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Auxenfans C, Menet V, Catherine Z, Shipkov H, Lacroix P, Bertin-Maghit M, et al. Cultured autologous keratinocytes in the treatment of large and deep burns: A retrospective study over 15 years. *Burns*. février 2015;41(1):71-9.
2. Auxenfans C, Shipkov H, Bach C, Catherine Z, Lacroix P, Bertin-Maghit M, et al. Cultured allogenic keratinocytes for extensive burns: a retrospective study over 15 years. *Burns J Int Soc Burn Inj*. févr 2014;40(1):82-8.
3. Geras AJ. *Dermatology: A Medical Artist's Interpretation*. Sandoz Medical Publications, Sandoz Pharma Limited; 1990. 139 p.
4. Dréno B. Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes. *Ann Dermatol Vénérologie*. oct 2009;136, Supplement 6:S247-51.
5. Szabo G, Hirobe T, Flynn EA, Garcia RI. The biology of the melanocyte. *Prog Clin Biol Res*. 1988;256:463-74.
6. Potten CS. Keratinocyte stem cells, label-retaining cells and possible genome protection mechanisms. *J Investig Dermatol Symp Proc Soc Investig Dermatol Inc Eur Soc Dermatol Res*. sept 2004;9(3):183-95.
7. Lavker RM, Sun TT. Epidermal stem cells: properties, markers, and location. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5 déc 2000;97(25):13473-5.
8. Gambardella L, Barrandon Y. The multifaceted adult epidermal stem cell. *Curr Opin Cell Biol*. déc 2003;15(6):771-7.
9. Alonso L, Fuchs E. Stem cells of the skin epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 30 sept 2003;100 Suppl 1:11830-5.
10. Liang L, Chinnathambi S, Stern M, Tomanek-Chalkley A, Manuel TD, Bickenbach JR. As epidermal stem cells age they do not substantially change their characteristics. *J Investig Dermatol Symp Proc Soc Investig Dermatol Inc Eur Soc Dermatol Res*. sept 2004;9(3):229-37.
11. Barrandon Y, Green H. Three clonal types of keratinocyte with different capacities for multiplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*. avr 1987;84(8):2302-6.
12. Boxman I, Löwik C, Aarden L, Ponc M. Modulation of IL-6 production and IL-1 activity by keratinocyte-fibroblast interaction. *J Invest Dermatol*. sept 1993;101(3):316-24.
13. Coulomb B, Lebreton C, Dubertret L. Influence of human dermal fibroblasts on epidermalization. *J Invest Dermatol*. janv 1989;92(1):122-5.
14. Mojallal A, Foyatier J-L. [Historical review of the use of adipose tissue transfer in plastic and reconstructive surgery]. *Ann Chir Plast Esthét*. oct 2004;49(5):419-25.
15. Heng BC, Cao T, Liu H, Phan TT. Directing stem cells into the keratinocyte lineage in vitro. *Exp Dermatol*. janv 2005;14(1):1-16.

16. Dupont A, Pasquereau A, Rigou A, Thélot B. Les victimes de brûlures : patients hospitalisés en France métropolitaine en 2011 et évolution depuis 2008. *Bull Epidemiol Hebd.* 2016;(5-6):71-9.
17. Pasquereau A, Thélot B. Hospitalisations pour brûlures à partir des données du Programme de médicalisation des systèmes d'information, France métropolitaine 2011 et évolution depuis 2008. [Internet]. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire; 2014 [cité 18 août 2016]. Disponible sur: <http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2011/Hospitalisations-pour-brulures-a-partir-des-donnees-du-Programme-de-medicalisation-des-systemes-d-information-France-metropolitaine-2009>
18. OMS. Brûlures [Internet]. [cité 9 juin 2016]. Disponible sur: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs365/fr/>
19. Latarjet J, Ravat F. [Epidemiology of burns in France]. *Soins Rev Réf Infirm.* août 2012;(767):20-2.
20. Keck M, Herndon DH, Kamolz LP, Frey M, Jeschke MG. Pathophysiology of burns. *Wien Med Wochenschr* 1946. 2009;159(13-14):327-36.
21. Gueugniaud P, Vilasco B, Pham E, Hirschauer C, Bouchard C, Fabreguette A, et al. Brûlés graves: état hémodynamique, transport et consommation d'oxygène, cytokines plasmatiques. *Ann Fr Anesth Réanimation.* 1 janv 1996;15(1):27-35.
22. SFETB - Société Française d'Etude et de Traitement des Brûlures. Estimation de la gravité de la brûlure: surface et profondeur de la brûlure (SFETB 1992 et 2006) [Internet]. 2013 [cité 9 juin 2016]. Disponible sur: http://www.sfetb.org/index.php?rub=textes-officiels&art=doc_ref_3
23. Lakhel A, Pradier J-P, Brachet M, Duhoux A, Duhamel P, Fossat S, et al. Chirurgie des brûlures graves au stade aigu. *EMC - Tech Chir - Chir Plast Reconstr Esthét.* janv 2008;3(3):1-36.
24. Soussi S, Blet A, Muzard A, Guibert M, Benyamina M, Legrand M. Prise en charge initiale du brûlé - Congrès SFAR - Société Française d'Anesthésie et de Réanimation. In 2014 [cité 23 août 2016]. Disponible sur: http://sofia.medicalistes.org/spip/IMG/pdf/Prise_en_charge_initiale_du_brule.pdf
25. Hautier-Krahn A. Le traitement chirurgical du grand brûlé en phase aiguë. *Soins.* juill 2012;57(767):30-2.
26. Revol M, Servant J. Les greffes cutanées [Internet]. *Cicatrisation.info : le livre.* 2006 [cité 25 août 2016]. Disponible sur: http://www.cicatrisation.info/livre/module_2/revol_greffe.htm
27. Grenier De Cardenal D, Bey E, Lambert F, Duhamel P, Chaine A, Giraud O, et al. Le procédé HUMECA chez le grand brûlé : difficultés. *Brûlures.* 2002;3(1):34-7.
28. Alexander JW, MacMillan BG, Law E, Kittur DS. Treatment of severe burns with widely meshed skin autograft and meshed skin allograft overlay. *J Trauma.* juin 1981;21(6):433-8.
29. Gaucher S, Jarraya M. Allogreffes cutanées dans la chirurgie du grand brûlé. *EMC - Tech Chir - Chir Plast Reconstr Esthét.* janv 2008;3(4):1-9.

30. Agence de la Biomédecine. Le rapport annuel médical et scientifique du prélèvement et de la greffe en France [Internet]. 2014 [cité 3 sept 2016]. Disponible sur: <http://www.agence-biomedecine.fr/annexes/bilan2014/donnees/prelevement/01-tissus/synthese.htm>
31. Webster JP. Refrigerated Skin Grafts. *Ann Surg.* oct 1944;120(4):431-48.
32. Zaroff LI, Mills W, Duckett JW, Switzer WE, Moncrief JA. Multiple uses of viable cutaneous homografts in the burned patient. *Surgery.* mars 1966;59(3):368-72.
33. DeBono R, Rao GS, Berry RB. The survival of human skin stored by refrigeration at 4 degrees C in McCoy's 5A medium: does oxygenation of the medium improve storage time? *Plast Reconstr Surg.* juill 1998;102(1):78-83.
34. Hautier A, Sabatier F, Stellmann P, Andrac L, Nouaille De Gorce Y, Dignat-George F, et al. Assessment of organ culture for the conservation of human skin allografts. *Cell Tissue Bank.* mars 2008;9(1):19-29.
35. de Backere AC. Euro Skin Bank: large scale skin-banking in Europe based on glycerol-preservation of donor skin. *Burns J Int Soc Burn Inj.* 1994;20 Suppl 1:S4-9.
36. Polge C, Smith AU, Parkes AS. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature.* 15 oct 1949;164(4172):666.
37. Lovelock JE, Bishop MW. Prevention of freezing damage to living cells by dimethyl sulphoxide. *Nature.* 16 mai 1959;183(4672):1394-5.
38. Robb EC, Bechmann N, Plessinger RT, Boyce ST, Warden GD, Kagan RJ. Storage media and temperature maintain normal anatomy of cadaveric human skin for transplantation to full-thickness skin wounds. *J Burn Care Rehabil.* déc 2001;22(6):393-6.
39. Chamblor K, Sachs A. The use of ETOX lyophilised skin in burns. *Br J Plast Surg.* juill 1969;22(3):210-5.
40. Rheinwald JG, Green H. Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell.* nov 1975;6(3):331-43.
41. Braye F, Dumortier R, Bertin-Maghit M, Girbon JP, Tissot E, Damour O. [Cultured epidermis for the treatment of severe burns. A 2-year study (18 patients)]. *Ann Chir Plast Esthét.* déc 2001;46(6):599-606.
42. Oie Y, Hayashi R, Takagi R, Yamato M, Takayanagi H, Tano Y, et al. A novel method of culturing human oral mucosal epithelial cell sheet using post-mitotic human dermal fibroblast feeder cells and modified keratinocyte culture medium for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol.* sept 2010;94(9):1244-50.
43. DIRECTIVE 2001/83/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain [Internet]. Disponible sur: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2001_83_consol_2012/dir_2001_83_cons_2012_fr.pdf
44. ANSM. Le contexte réglementaire des médicaments de thérapie innovante - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. 2012 [cité 14 juin 2016]. Disponible sur: <http://ansm.sante.fr/L-ANSM2/Medicaments-de-therapie-innovante-et->

45. RÈGLEMENT (CE) No 1394/2007 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 13 novembre 2007 concernant les médicaments de thérapie innovante et modifiant la directive 2001/83/CE ainsi que le règlement (CE) n° 726/2004 [Internet]. Disponible sur: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/reg_2007_1394/reg_2007_1394_fr.pdf
46. DIRECTIVE 2004/23/CE DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL du 31 mars 2004 relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules humains [Internet]. Disponible sur: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:102:0048:0058:fr:PDF>
47. Décret 2004-829 du 19 août 2004 relatif aux conditions d'autorisation de mise sur le marché des produits thérapeutiques annexes et modifiant le code de la santé publique (J.O.R.F du 21 août 2004) [Internet]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/jo_pdf.do?numJO=0&dateJO=20040821&numTexte=18&pageDebut=14963&pageFin=14964
48. Arrêté du 19 août 2004 fixant le contenu du dossier accompagnant la demande d'autorisation de mise sur le marché des produits thérapeutiques annexes. | Legifrance [Internet]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/jo_pdf.do?cidTexte=JORFTEXT000000624149
49. Arrêté du 19 août 2004 relatif aux bonnes pratiques de préparation, de transformation, de conditionnement, de conservation, d'importation, de transport et de distribution des produits thérapeutiques annexes. | Legifrance [Internet]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=LEGITEXT000005826145>
50. Commission Européenne. RAPPORT DE LA COMMISSION AU PARLEMENT EUROPÉEN ET AU CONSEIL [Internet]. Bruxelles; 2014 mars [cité 10 juin 2016]. Disponible sur: http://ec.europa.eu/health/files/advtherapies/2014_atmp/atmp_fr.pdf
51. LEEM. Etude de thérapie cellulaire - des cellules pour la santé [Internet]. [En ligne]; 2010 [cité 10 juin 2016]. Disponible sur: <http://www.leem.org/sites/default/files/1473.pdf>
52. Lirsac PN, Blin O, Magalon J, participants of round table N°5 of Giens XXX., Angot P, de Barbeyrac E, et al. Creating conditions for the success of the French industrial advanced therapy sector. *Thérapie*. févr 2015;70(1):69-94.
53. Green H, Kehinde O, Thomas J. Growth of cultured human epidermal cells into multiple epithelia suitable for grafting. *Proc Natl Acad Sci U S A*. nov 1979;76(11):5665-8.
54. Limat A, Hunziker T, Boillat C, Bayreuther K, Noser F. Post-mitotic human dermal fibroblasts efficiently support the growth of human follicular keratinocytes. *J Invest Dermatol*. mai 1989;92(5):758-62.

L'ISPB- Faculté de Pharmacie de Lyon et l'Université Claude Bernard Lyon 1 n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses : ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs

ABBASSI Nacira

Etude de la stabilité du milieu de culture et des couches nourricières utilisés pour la production de médicaments de thérapie innovante-préparés ponctuellement (feuilletts épidermiques)

Th. D. Pharm., Lyon 1, 2016, 77p.

RESUME

Le règlement européen n°1394/2007 publié en 2007 et son adaptation française (la loi n° 2011-302 du 22 mars 2011) ont introduit une nouvelle classe de médicaments, les médicaments de thérapie innovante (MTI). Les MTI-préparés ponctuellement (MTI-PP) en sont « l'exemption hospitalière ». La banque de tissus et cellules (BTC) des Hospices Civils de Lyon produit des feuilletts épidermiques (FE) depuis 1988. Il s'agit d'un tapis cohésif de kératinocytes humains cultivés indiqué dans le recouvrement des grands brûlés. La BTC a été autorisée par les autorités de santé à préparer et à distribuer des MTI-PP en 2014 (n° de l'autorisation en cours : ETI/16/M/001). Les FE autologues ont été autorisés sous la nouvelle réglementation en 2016, sous le n° MTI-PP08.

Le milieu de culture pour kératinocytes (MCK) et les couches nourricières de fibroblastes irradiés (CNI) sont indispensables à la culture des kératinocytes. Dans ce cadre, et conformément aux exigences des bonnes pratiques de fabrication pharmaceutique, nous avons étudié leur stabilité à 1 mois pour le MCK, et à 3 semaines pour les CNI. Dans ces conditions, notre étude montre que les contrôles qualité libératoires du produit fini (FE) sont conformes.

Au terme de cette étude, nous avons validé la péremption du MCK à 1 mois et des CNI à 3 semaines, en ramenant la péremption des FE à 6H. Ces validations permettent de valider la stabilité des FE pour une utilisation optimale et sécurisée chez les grands brûlés.

MOTS CLES

Médicament de thérapie innovante - préparé ponctuellement
Etude de stabilité
Grands brûlés

JURY

Président : Pr. Fabrice PIROT
Membres : Dr. Céline AUXENFANS
Dr. Pascale PASCAL
Dr. Adrien ROSSARY

DATE DE SOUTENANCE

21 Octobre 2016

ADRESSE DE L'AUTEUR

37, rue Bataille – 69008 Lyon