

# Production de kératinocytes autologues à buts thérapeutiques au sein d'un établissement pharmaceutique

par le Dr François L. Guillot

Département Biotechnologie, Laboratoires Génévrier, 280, rue de Goa, ZI Les Trois Moulins, Parc de Sophia-Antipolis, 06600 Antibes (France).

Reçu le 3 janvier 2001

## RÉSUMÉ

A cause de l'importance majeure des enjeux suscités par l'émergence des biotechnologies au sein des industries pharmaceutiques, les Laboratoires Génévrier ont inauguré en janvier 1998 un nouveau département spécialisé dans la production de cultures cellulaires à visées thérapeutiques. Son objectif est de répondre, dans un proche avenir, à un certain nombre de besoins thérapeutiques actuellement non

satisfaits en France, notamment dans le domaine des cellules autologues épidermiques et chondrocytaires. Des applications concrètes sont d'ores et déjà disponibles dans le traitement des brûlures et des plaies cutanées chroniques grâce à l'utilisation de greffons EPIBASE®, feuillets épidermiques composés de kératinocytes autologues cultivés.

## SUMMARY Autologous keratinocyte production for cellular therapy within a pharmaceutical company

Because biotechnologies are growing and are becoming key players in the pharmaceutical industry scene, Génévrier Laboratories inaugurated in January 1998, a new department especially designed for the production of cultured cells as therapeutic agents.

Meeting clinician therapeutic needs by providing autologous keratinocytes and chondrocytes in the

near future, represents the primary aim of the Biotechnology department.

Concrete cell-based products are already being used for the treatment of burns and cutaneous chronic wounds such as the EPIBASE® graft, which corresponds to an epidermis sheet composed of cultured autologous keratinocytes.

## INTRODUCTION

Réparer l'intégrité du corps par l'amplification de ses propres cellules devient une réalité simple et conviviale pour le praticien et le malade. Tel est l'objectif, devenu aujourd'hui réalité, que s'est fixé notre laboratoire en proposant le système EPIBASE®, feuillet épidermique composé de kératinocytes autologues cultivés.

Ce département Biotechnologie a comme objectifs de :

- satisfaire aux besoins des services spécialisés en épiderme autologue de culture (traitement des brûlures et des plaies chroniques) dans les meilleurs délais, quel que soit leur éloignement du centre de production ;

- garantir la qualité des greffes et un coût raisonnable grâce à une méthodologie normalisée mise en œuvre par une équipe spécialisée compétente et entraînée ;

- développer d'autres procédés de culture à partir de biomatériaux innovants (dans les domaines de la réparation de l'épiderme, du derme et du cartilage).

## TECHNIQUES DE CULTURE DE KÉRATINOCYTES AUTOLOGUES

Les cultures de kératinocytes autologues ont été développées aux États-Unis à partir de 1975 par Rheinwald et Green (1975, 1977). Ces auteurs ont en effet mis au point une technique qui permet d'obtenir un feuillet épithélial multicouches présentant les caractéristiques de l'épiderme naturel (cellules basales profondes et kératinocytes en voie de différenciation dans les couches supérieures). Leur succès tient à une optimisation des conditions de culture :

- utilisation d'une couche nourricière de fibroblastes murins 3T3 irradiés offrant aux kératinocytes les éléments nécessaires à leur adhérence dans la boîte de culture et à leur croissance ;

- définition d'un milieu de culture capable de maintenir les kératinocytes en cultures secondaires et subcultures suivantes.



C'est cette technique qui est encore utilisée aujourd'hui sous une forme légèrement modifiée. A partir d'une biopsie cutanée de quelques cm<sup>2</sup>, les kératinocytes du patient sont isolés par séparation mécanique et enzymatique, puis mis en culture primaire. Vers le 9<sup>ème</sup> jour (confluence de la primoculture), ils sont réensemencés en cultures secondaires. Après trois semaines seulement, le rapport de multiplication est de 1 pour 10 000.

Les premières applications cliniques ont été effectuées avec succès dès 1981 par Gallico et O' Connor (O' Connor *et al.*, 1981; Gallico *et al.*, 1984), notamment dans le domaine des brûlures étendues du 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> degré.

En pratique, le praticien contacte le département Biotechnologie des Laboratoires Génévrier. Le jour même, un kit à biopsie comprenant un flacon contenant le milieu de conservation/transport est envoyé au centre demandeur. Le prélèvement cutané effectué le lendemain est placé dans le flacon de transport et réexpédié dans la journée vers le département Biotechnologie. Dès réception (soit 48 heures après demande du kit à biopsie), les kératinocytes isolés à partir de la biopsie sont mis en culture. Le 9<sup>ème</sup> jour, après avoir été informé de la surface exacte à couvrir, intervient l'amplification des kératinocytes. Au 21<sup>ème</sup> jour, l'ensemble des greffons, conditionnés en double-barquettes individuelles stériles, est adressé au médecin demandeur.

Le transport des greffons est réalisé à une température située entre 18 et 28 °C sous atmosphère enrichie en CO<sub>2</sub> et en contact avec un milieu nutritif semi-solide maintenant l'intégrité des greffons et la viabilité des cellules. Lors de la pose, EPIBASE® est constitué de 3 à 6 couches de kératinocytes. Chaque greffon EPIBASE® a une surface d'environ 90 cm<sup>2</sup>.

Ces greffons se caractérisent par une grande maniabilité et une grande simplicité de pose. Le support de transfert (gaze paraffinée ou vaselinée) permet d'améliorer la résistance mécanique des feuillets épidermiques et offre une adhérence directe de ces derniers sur la plaie.

## RÉALISATION DU PLATEAU TECHNIQUE

L'activité de culture cellulaire à buts thérapeutiques nécessite un dispositif draconien de maîtrise draconienne des contaminations. En effet, afin de garantir une sécurité irréprochable et une qualité optimale des produits délivrés, le plateau technique (salles blanches) de production cellulaire a été conçu et construit selon les recommandations de l'Établissement français des Greffes. En 1998, la commission *ad hoc* de la Direction Générale de la Santé a homologué les procédures de production et de contrôle des cultures cellulaires en termes de sécurité virale et microbiologique.

Le centre comprend un laboratoire de recherche et développement et six salles blanches en atmosphère contrôlée qui correspondent chacune à une étape précise de la culture cellulaire.

La conception architecturale, originale (brevet européen), empêche tout passage direct du personnel d'un

laboratoire à l'autre. Toutes les salles blanches sont munies d'un circuit d'air comportant un système de microfiltration HEPA qui assure un renouvellement complet de l'air une fois par minute. Des sas de sécurité et des gradients de pression d'air garantissent un degré d'empoussièrement réduit, répondant aux normes de la classe 10 000, ainsi que l'absence de passage d'aérocontaminants d'une pièce à l'autre; de même, les personnes et les produits entrant dans chaque laboratoire sont soumis à des procédures strictes d'habillage/désinfection.

A noter que, grâce à deux régimes de filtration d'air séparés, la salle blanche de réception des biopsies et des cultures primaires – celle dont le risque de contamination exogène est *a priori* maximal – fonctionne en dépression, alors que les autres laboratoires sont en surpression.

Dans le cadre d'une démarche d'assurance-qualité, toutes les procédures et tous les modes opératoires (techniques, contrôles, entretien, maintenance des appareils ...) sont rédigés selon la norme ISO 9002.

La sécurité du département Biotechnologie se résume en 10 points clés :

- 1) Salles blanches en atmosphère contrôlée (classe 10 000).
- 2) Cascades de pressions entre salles blanches et environnement (cultures primaires en dépression).
- 3) Sas séparés et ventilés pour chaque salle blanche (entrée du personnel, entrée du matériel et sortie des déchets); passe-plats ventilés entre les salles (pour le matériel).
- 4) Postes de sécurité microbiologique de classe II (hottes à flux laminaire en classe 100) où sont effectués tous les travaux de culture cellulaire.
- 5) Contrôles microbiologiques des cultures et de l'environnement.
- 6) Centrale de surveillance permettant la gestion contrôlée des paramètres critiques des appareils (températures, CO<sub>2</sub>, humidité).
- 7) Traçabilité de tous les réactifs utilisés.
- 8) Fiches-patients individualisées regroupant l'historique complet des cultures.
- 9) Respect total de la sécurité de l'environnement pour l'évacuation des déchets.
- 10) Mise par écrit de toutes les procédures de production et des modes opératoires (manuel qualité ISO 9002).

## VALIDATION DE L'INTÉGRITÉ DES GREFFONS APRÈS TRANSPORT

Lorsque l'activité de production cellulaire est effectuée au sein d'un centre hospitalier, le transport et la conservation des greffons sont en général des opérations relativement simples. Par opposition, les greffons EPIBASE® produits par le département Biotechnologie des Laboratoires Génévrier sont susceptibles d'être utilisés dans toute la France et également hors des frontières de notre territoire. Un dispositif de double emballage stérile (double barquettes) a été conçu spécifiquement pour

répondre à la demande. L'ensemble du procédé de transport fait l'objet d'un brevet européen.

Des marqueurs cellulaires précis (index de prolifération estimé par la mesure du Ki-67, qui est un marqueur du cycle cellulaire; mesure du pouvoir clonogénique des kératinocytes; étude de la présence des protéines d'adhérence comme les intégrines  $\alpha 6\beta 3$  et  $\alpha 3\beta 1$ ) ont été mesurés à partir de kératinocytes issus d'EPIBASE® transportés et d'EPIBASE® détachés extemporanément de la boîte de culture. Ces travaux ont permis de valider les protocoles choisis et la technologie mise en œuvre vis-à-vis du transport des greffons EPIBASE® (Biehlmann *et al.*, 1999).

## CONTROLE QUALITÉ DES GREFFONS

Des contrôles microbiologiques sont réalisés à chaque étape de la culture cellulaire et dès la réception de la biopsie cutanée. Les cultures cellulaires sont observées au microscope optique tous les jours. Des coupes histologiques sont également effectuées afin de visualiser les différentes couches qui constituent le feuillet épidermique. De plus, des tests clonogéniques sont effectués pour chaque culture primaire à partir des kératinocytes directement isolés de la biopsie.

## INDICATIONS THÉRAPEUTIQUES

– Brûlures du 2<sup>ème</sup> degré profond et du 3<sup>ème</sup> degré.  
– Plaies cutanées chroniques : ulcères veineux et/ou artériels.

- Chirurgie réparatrice.
- Autres indications en dermatologie :
  - angiodermes nécrotiques;
  - épidermolyses bulleuses;
  - sites donneurs;
  - nævus.

EPIBASE® permet une couverture des plaies aiguës, chroniques ou traumatiques. Dans le cas de plaies chroniques, EPIBASE, joue tout d'abord le rôle d'un pansement biologique actif en apportant des facteurs de croissance qui vont relancer la capacité de cicatrisation tout en agissant au niveau de la déterision. Après une ou deux poses, la plaie devient bourgeonnante, réactive et une couverture définitive par un (des) nouveau(x) greffon(s) EPIBASE® est possible. EPIBASE® a déjà été utilisé avec succès pour le traitement d'ulcères veineux particulièrement récalcitrants aux traitements conventionnels comme les autogreffes en filets ou en pastilles. La dimension moyenne de ce type de plaies chroniques est d'environ 80 à 100 cm<sup>2</sup> (soit la surface d'un EPIBASE®).

Ces greffons cultivés semblent également appropriés pour le traitement des angiodermes nécrotiques (AN, ou ulcères artériolaires), plaies chroniques particulièrement douloureuses. Une étude de cas sur cinq AN a été réalisée. Brièvement, l'efficacité d'EPIBASE® sur les dou-

leurs était très rapide et importante dans 4 cas. La déterision et la cicatrisation ont été acquises avec 5 greffes en moyenne dans 2/3 des AN (Martin *et al.*, 2001).

## PERSPECTIVES ET DÉVELOPPEMENT

Le département Biotechnologie possède une stratégie de développement basée sur 3 axes :

— Au niveau de l'épiderme, des travaux de développement sur de nouveaux véhicules (supports) pour la culture et la transplantation de kératinocytes sont en cours.

— Le derme fait l'objet d'un intérêt majeur car il constitue la deuxième composante fondamentale de la peau conférant à celle-ci sa fonctionnalité (souplesse, par exemple). Dans ce domaine, un substrat dermique type éponge lyophilisée à base de collagène, de chitosane et de chondroïtines sulfates est en cours d'industrialisation. Ce dernier peut également être colonisé par des fibroblastes autologues, constituant ainsi un « derme équivalent ».

— Le cartilage représente aussi un pôle d'intérêt majeur pour la thérapie cellulaire puisque ce tissu ne se régénère pas. Le département Biotechnologie a donc entrepris depuis une année un travail de recherche sur un *biogel* dans le but de transplanter par « simple arthroscopie » des chondrocytes autologues au sein du cartilage endommagé.

## BIBLIOGRAPHIE

- Rheinwald J.G. & Green H., Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinising colonies from single cells. *Cell*, 1975, 6, 331-344.
- Rheinwald J.G. & Green H., Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes. *Nature*, 1977, 265, 421-424.
- O' Connor N.E., Mulliken J.B., Banks-Schlegel S., Kehinde O. & Green H., Grafting of burns with cultured epithelium prepared from autologous epidermal cells. *Lancet*, 1981, 1, 75-78.
- Gallico G.G., O' Connor N.E., Compton C.C., Kehinde O. & Green H., Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N. Engl. J. Med.*, 1984, 331, 448-451.
- Brevet Européen 98400911.8 : « Nouveau plateau technique, notamment pour cultures cellulaires et les laboratoires ainsi réalisés ».
- Brevet Européen 9911632 : « Nouveau procédé pour le transport des cellules et les greffes ainsi réalisées ».
- Biehlmann F., Sales-Garcia V., Luque N., Spadafora A. & Guillot F., Characteristics of Autologous Cultured Epithelium (EPIBASE®) after Transportation when the Grafts enter the Operating Room. Third Joint Meeting European Tissue Repair Society & Wound Healing Society, Bordeaux, France, 1999, C 016.
- Martin L., Biehlmann F., Sales-Garcia V., Catala C., Guillot F. & Vaillant L., Traitement des ulcères artériolaires à type d'angiodermite nécrotique (AN) par thérapie cellulaire EPIBASE®. Communication orale à la 5<sup>ème</sup> Conférence Nationale des Plaies et Cicatrisations, Paris, France, 2001 et manuscrit en cours de rédaction.