

Numero unique de document : CP042014013
Date document 14 avril 2014
Direction : Direction des Contrôles
Pôle : Standardisation Pharmacopée Normalisation
Personne en charge : Marie-Lise MIGUERES

**Comité Français de la Pharmacopée « Produits Biologiques et
Thérapies Innovantes » – CP042014013**

CP04 Séance du 17 janvier 2014 en salle 1-2

Nom des participants		Statut	Présent	Absent /excusé
Pascal	ANGER	Partie-prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Danièle	BENSOUSSAN	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Brigitte	BIREBENT	Partie-prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nathalie	BOIRET-DUPRÉ	Membre	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Luc	CAMOIN	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Stéphane	CORNEN	Partie-prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sandy	DOUTHE DARMON	Partie-prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nathalie	DUBOIS	Partie-prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dominique	FACCENDA	Partie-prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Emma	FOURNIALS	Partie-prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Céline	GUIGUE	Partie-prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sylvie	GUYOMARD- DEVANLAY	Partie-prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Stéphanie	LAURENT-BUCHER	Partie-prenante	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Jacques	LECHENET	Partie-prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Virginie	LEDUC	Partie-prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Céline	LORTEAU	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Laurent	MALLET	Partie-prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Isabelle	MARTINACHE	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Catherine	MICHALSKI	Partie-prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Christine	MIRAS	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Christopher	PAYAN	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gabriel	PELTRE	Partie-prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jean-Marc	PERSON	Membre	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Thierry	PRONCE	Partie-prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Benoit	RAMOND	Partie-prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sylvie	UHLRICH	Partie-prenante	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Murielle	ANDRE	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Marie-Christine	ANNEQUIN	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Frédérique	BARBOSA	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Agnès	BERTOCCHI	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nicole	BORNSTEIN	Représentant de l'Ansm	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Patrice	CHAGNAUD	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Nom des participants		Statut	Présent	Absent /excusé
Natacha	CHARLIER-BRET	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Xavier	CHENIVESSE	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Yves	CORTEZ	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jacqueline	DAYAN	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Nathalie	DELESALLE	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Laure	DELIGNIVILLE	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Marie-Thérèse	DUFFOUR	Représentant de l'Ansm	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Muriel	DURAN CORDOBES	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jacques Olivier	GALDBART	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Dominique	GARCIA	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Gérard	HUYGHE	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Stéphanie	JAMBON	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jehanara	KORIMBOCUS	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Valérie	LIEVRE	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Stéphane	MAISONNEUVE	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Karine	MEUNIER	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Marie-Lise	MIGUERES	Représentant de l'Ansm Secrétaire de séance	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sylvie	MORGEAUX	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Wahiba	OUALIKENE	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Jean-Claude	OURLIN	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Béatrice	PANTERNE	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Christian	PITOT-BELIN	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Michèle	PLANA	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Sonia	PRIEUR	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Valérie	RIDOUX	Représentant de l'Ansm	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Brigitte	ROGEAU	Représentant de l'Ansm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Points	Sujets abordés
10 h10	Adoption de l'ordre du jour
1	Présentations générales
1.1	Tour de table
1.2	Présentation de l'Agence et des nouvelles instances.
1.3	Présentation des activités de la Pharmacopée.
1.4	Présentation du Règlement intérieur des comités Français de la Pharmacopée (CFP)
1.5	Présentation des procédures de travail pour les comités
	Liste des groupes DEQM rattachés au CFP « Produits biologiques et thérapies innovantes » Experts français dans les groupes DEQM
1.6	Dates prévisionnelles pour 2014
2	Les outils
2.1	Ansm site internet : informations Pharmacopée
2.2	DEQM site internet : informations
3	Programme de travail
	Présentation des travaux des différents groupes rattachés au comité Français de la Pharmacopée « Produits Biologiques et Thérapies Innovantes »
13h00	Pause déjeuner
14h	Reprise de la séance
4.	Dossiers examinés en séance
	Gestion des conflits d'intérêts
4.1	Révisions de monographies à la Pharmacopée européenne (Enquête Pharmeduropa 25.4)
4.1.1 (ancien 5.2.1)	Contrôle microbiologique des produits cellulaires (2.6.27) [PA/PH/EXP.CTP/T(11)4 ANP]
4.1.2 (ancien 5.2.2)	Cultures cellulaires utilisées pour la préparation de vaccins pour usage vétérinaire (5.2.4) [PA/PH/EXP.15V/T(12)27 ANP]
4.2	Révisions de monographies à la Pharmacopée française
4.2.1 (ancien 5.1.1)	Recommandations pour le test clonogénique des progéniteurs CFUGM
17h15	Fin de la séance

La séance est ouverte à 10H10.

L'ordre du jour est validé après modification : les dossiers examinés en deuxième partie de journée seront traités dans l'ordre suivant :

- « Contrôle microbiologique des produits cellulaires (2.6.27) »
- « Cultures cellulaires utilisées pour la préparation des vaccins »
- « Recommandations pour le test clonogénique des progéniteurs CFUGM »

1 - Présentation générale

1.1 - Tour de table

Après avoir vérifié que le quorum est atteint, la secrétaire de séance ouvre le travail du comité Français de la Pharmacopée (CFP) «Produits Biologiques et Thérapies Innovantes» en accueillant l'ensemble des participants. Un tour de table a permis à ceux-ci de se présenter pour cette première réunion du CFP.

La secrétaire de séance informe les participants que les séances du CFP sont enregistrées (enregistrement audio) conformément à la réglementation.

1.2 Présentation de l'Agence et des nouvelles instances.

Un représentant de l'Ansm :

- présente les missions, les champs de compétence et la gouvernance de l'Ansm,
- présente le nouveau cadre législatif et réglementaire sur l'expertise,
- rappelle les exigences de l'expertise à l'Ansm, dont notamment l'indépendance, la transparence et la compétence,
- présente les différentes commissions, comités et groupe de travail.

1.3 - Présentation des activités de la Pharmacopée.

Un représentant de l'Ansm présente les activités de la Pharmacopée en précisant ce qu'est la Pharmacopée, son rôle, son utilisation et sa gestion.

Un participant pose une question sur les demandes de révision d'un texte de la Pharmacopée européenne : Il lui est précisé que toute demande issue d'un industriel français doit être envoyée au pôle NORSTA de l'Ansm, seuls les industriels non européens peuvent envoyer leurs commentaires directement à la Direction Européenne de la Qualité du Médicament (DEQM).

1.4 - Présentation du Règlement intérieur des comités Français de la Pharmacopée (CFP)

Le règlement intérieur du CFP avait été communiqué avant le CFP à l'ensemble des membres.

Un représentant de l'Ansm présente ce règlement intérieur notamment le fonctionnement du comité et les obligations en matière de déontologie et de transparence.

Il est précisé que les CFP sont composés :

- de membres nommés (spécialistes sans liens d'intérêts, sélectionnés par un jury et nommés par décision de l'Ansm),
- de parties prenantes (spécialistes avec lien d'intérêts et sélectionnés par un jury),
- de représentants de l'Ansm.

Le représentant de l'Ansm insiste sur le fait que le quorum doit être atteint pour que le CFP puisse avoir lieu (un tiers des membres).

Tout participant peut demander l'inscription d'un sujet à l'ordre du jour, au minimum 15 jours avant la tenue du comité.

Le représentant de l'Ansm insiste sur le fait que les membres ne pourront prendre part aux travaux du comité si leur DPI date de plus d'un an ou n'est pas à jour. Il est de la responsabilité des participants de déclarer spontanément à tout moment tout conflit d'intérêts les concernant.

Le représentant de l'Ansm rappelle le caractère confidentiel des données et documents examinés en séance.

Le représentant de l'Ansm précise que pour tout sujet nécessitant un vote, il sera formulé des questions et propositions sur lesquelles il faudra délibérer et les membres devront se positionner par rapport à ces questions. Sauf exception, le vote concernera les documents destinés à être publiés dans la Pharmacopée Française. Les documents de la Pharmacopée Européenne seront discutés mais non soumis à un vote sauf cas particulier.

Les participants ont posé des questions :

- Sur le déroulement d'un vote : il est précisé que seuls les membres votent et que les parties prenantes doivent quitter la salle lors de ce vote. Le résultat du vote est mentionné dans le compte-rendu de la réunion. Le résultat des votes sera acquis aux majorités des votes des membres présents. Toutefois, lorsqu'il y a égalité du nombre de voix « pour » et du nombre de voix « contre », il n'y a pas de nouveau vote. Dans tous les cas, la décision finale prise reviendra à l'Ansm.

Si la thématique abordée n'est pas dans le champ de compétence direct du membre votant, c'est de son libre arbitre, après avoir suivi les débats de voter en phase finale « pour » « contre » ou « abstention ».

- Sur le fait que les évaluateurs de l'agence, experts à l'Europe ne puissent pas participer au vote.

Le vote en vue d'adopter le règlement intérieur du CFP «Produits Biologiques et Thérapies Innovantes» a eu lieu en fin de matinée.

Question posée par le secrétaire de séance sur laquelle les membres doivent voter : le règlement intérieur peut-il être adopté ?

Vote : Le règlement intérieur est adopté à l'unanimité par les 7 membres présents sur les 9 membres nommés

1.5 - Présentation des procédures de travail pour les comités

Un représentant de l'Ansm présente :

- les modalités d'organisation des réunions,
- les critères de présentation des dossiers devant le CFP
- la coordination des activités entre la Pharmacopée française et la Pharmacopée européenne.

Cette présentation a soulevé quelques commentaires qui nécessitent les précisions suivantes :

- À propos de la liste des participants : celle-ci est précisée en première page de ce compte rendu.
- À propos de la confidentialité :

Le caractère confidentiel des documents issus de l'industrie pharmaceutique a été évoqué.

Un participant mentionne qu'il existe parfois également des documents à caractère confidentiel issus des banques de tissus / cellules au sein des hôpitaux.

Les documents présentés en séance ne doivent pas être diffusés.

- À propos d'un format particulier pour faire une demande de révision : il n'y a pas de formulaire particulier pour le moment comme il existe au comité pour les Plantes et Huiles Essentielles. Une demande par e-mail avec argumentaire est recevable.

- Un participant demande à quel comité est rattaché le groupe MQH (microbiologie des plantes) : Ce groupe dépend du comité pour les Plantes et Huiles Essentielles mais l'interaction avec le comité pour les Produits Biologiques et Thérapies Innovantes est important, le point commun traité étant la microbiologie.

- Un participant a attiré l'attention sur les spécificités des médicaments vétérinaires et sur l'existence d'un vocabulaire dédié.

- La validation du compte rendu doit faire l'objet d'une réponse par chacun des membres. La proposition d'adoption du compte rendu automatique en l'absence de réponse dans le temps imparti n'est pas envisageable.

- A propos de leur remplacement en cas d'impossibilité d'assister à une séance d'un CFP : il est rappelé que les participants à ce CFP ont été choisis par un jury de sélection selon des critères définis (examen notamment de leur CV) ; leur remplacement par un de leur collaborateur pour une réunion n'est donc pas possible.

1.6 - Dates prévisionnelles pour 2014

Le secrétaire de séance informe les participants des dates retenues pour les prochains CFP. Ces dates ne convenant pas de nouvelles dates sont proposées ci-dessous :

Mardi 1er avril

Vendredi 27 juin

Vendredi 24 octobre

2 - Les outils : Ansm site internet : informations et Pharmacopée DEQM site internet : informations

Un représentant de l'Ansm présente les informations concernant la Pharmacopée qui sont publiées sur le site de l'Ansm et sur le site de la DEQM.

3 - Programme de travail

Le programme de travail concernant les produits biologiques est présenté.

Il s'agit d'un état des lieux non exhaustif mentionnant les sujets récents et en cours de tous les groupes reliés au comité Produits biologiques et Thérapies innovantes. Au niveau de la Pharmacopée européenne, 15 groupes sont répertoriés.

Concernant le **groupe CTP** (produits de thérapie cellulaire), il est précisé qu'un sujet est publié dans la Pharmacopée française depuis janvier 2013 : « [Contrôle bactériologique et fongique des greffons cornéens conservés en organoculture](#) ». Ce sujet a déjà été proposé à la commission européenne de Pharmacopée en novembre 2011 (COM 141). Compte tenu qu'une extension de ce sujet à tous les tissus a été retenue par la Ph Eur, la décision de publication à la Pharmacopée française en attendant la finalisation du sujet au niveau européen a été prise par l'Ansm.

Le sujet tissu est toutefois revenu à l'expert français du groupe CTP, qui est chargé de proposer un draft Tissue.

Les 2 autres sujets « CFUGM » et « chapitre 2.6.27 » seront détaillés dans la 2^{ème} partie de ce compte rendu.

Concernant le **groupe 1**, il est mentionné la fusion en janvier 2014 de 2 groupes (1 et MMM Méthodes modernes en microbiologie) et l'attention est attirée sur le fait que ce groupe traite essentiellement de microbiologie malgré le titre retenu.

Concernant le nouveau sujet, [chapitre 5.1.11 « Test de détermination des activités bactéricides et fongicides »](#), il est précisé que ce sujet concerne les antiseptiques et non les désinfectants. En effet, ces derniers, non médicaments, suivent la réglementation des biocides et le marquage CE.

Le [chapitre 5.1.2 « indicateurs biologique de stérilisation »](#) est un sujet de grande ampleur puisqu'il y a eu une première mise en enquête publique avec un nombre de commentaires très important. En 2013, une enquête a été réalisée auprès de tous les pays pour connaître l'état des pratiques des industries pharmaceutiques utilisatrices d'indicateurs biologiques de stérilisation dans leur procédure. Les fabricants d'indicateurs biologiques de stérilisation ont également été contactés. Le chapitre est en cours de modification et devra alors faire l'objet d'une seconde mise en enquête publique. Il fera alors l'objet d'une présentation au comité.

Le [chapitre 5.1.6 « Méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique »](#) est un chapitre de 2008 qui est en révision depuis un certain temps. Il devrait être mis en enquête dans l'année.

Un nouveau groupe européen va être créé : « **Live biotherapeutic products** ». Il traitera de microorganismes vivants utilisés comme médicament. Les vaccins en sont exclus.

Suite à une question d'un participant, il est précisé que cela concerne par exemple des bactéries type Lactobacillus, Bifidobacterium, des levures type Saccharomyces. Une enquête a été réalisée en 2013 afin de faire un état des lieux du marché européen. La France est le pays qui a le plus de spécialités (environ 60).

Des sujets concernant des sujets transversaux seront mis au programme de ce comité à un moment donné de leur processus. En nouveau sujet, on peut citer en exemple le chapitre [« Produits obtenus par la méthode de l'ADN recombinant \[0784\] »](#) qui vient d'être mis en révision, et le chapitre en cours d'élaboration par les experts français du groupe 15 (vaccins à usage humains) [« Méthodes utilisées pour la recherche d'ADN résiduel »](#)

Concernant les **groupes HCP** (Host Cell Protein / recherche des protéines de l'hôte) [Méthodes générales 2.6.34] et **RCG** (Raw material Cell end Gene Therapy / matières premières utilisées dans le cadre de la thérapie cellulaire et thérapie génique) [chapitre général 5.1.2], il est précisé que ces groupes sont récents (créés en 2012) et que les travaux menés devraient être mis en enquête publique dans l'année 2014.

Concernant le **groupe 15**, il est mentionné la fusion de ce groupe avec un ancien groupe BOT traitant de la (les) toxine(s) botulique(s).

Beaucoup de thématiques sont à l'initiative de la France dans ce groupe. On citera pour les sujets récents « Protéines vectrices pour la production de vaccins polysaccharidiques conjugués pour usage humain [5.2.11] », « Titration de l'activité du vaccin de l'hépatite A [2.7.14] » « Vaccin grippal vivant atténué intranasal [2772], « Immunonéphélométrie pour le contrôle des vaccins »

Concernant le **groupe 15 V** (vaccins à usage vétérinaire), on peut citer deux nouveaux sujets qui ont été ajoutés au programme de travail : le « Borreliosis vaccine (inactivated) for dogs » et un nouveau chapitre général sur les élevages sains de poulet pour la production de vaccins aviaires inactivés.

Le **groupe BET** est issu de la fusion de l'ancien groupe BET et du groupe MAT (Test d'activation des monocytes). L'attention est attirée sur ce titre non optimal puisqu'il traitera également de la thématique « Essai d'activation des monocytes [2.6.30] ». L'essai d'activation des monocytes permet de détecter ou quantifier des substances ayant la propriété d'activer les monocytes humains ou les cellules monocytaires. Il permet de détecter la présence de pyrogènes dans l'échantillon à examiner et ainsi de se substituer selon les cas au test de pyrogènes effectué sur des lapins.

Une enquête a été réalisée en 2013 sur l'utilisation de ce test MAT et les résultats de cette enquête nous sont parvenus en octobre 2013.

Il est mentionné la particularité du groupe **P4bio** qui concerne les produits biologiques fabriqués par un seul fabricant et dont les monographies rejoignent ensuite les groupes **6** (substances biologiques) ou parfois **6B** (produits sanguins).

Les travaux en cours pour le groupe **Allergènes** ont été initiés par la France et concernent des monographies déjà publiées ou étudiées en France. Elles devraient être mises prochainement en enquête publique.

Fin de la séance du matin à 12H40

Reprise de la séance à 14h00.

4 - Dossiers examinés en séance

Le secrétaire de séance procède à la vérification des conflits d'intérêt : aucun conflit n'est à déclarer.

4.1 Révisions de monographies à la Pharmacopée européenne (Enquête pharমেuropa 25.4)

4.1.1 Contrôle microbiologique des produits cellulaires (2.6.27) [PA/PH/EXP.CTP/T(11)4 ANP]

Un des membres a dû quitter le comité vers 14h45. Il a pu faire état de ses remarques sur le bien fondé des méthodes alternatives, la problématique relative aux recherches mycologiques, le fait qu'en 3.2.4, la lecture visuelle est mentionnée. Ces différents points sont développés tout au long du compte rendu. Le quorum est maintenu (6 membres sur 9).

Ce point de l'ordre du jour concerne un chapitre de la Pharmacopée européenne (Ph Eur) dont la fin de mise en enquête publique date du 31 décembre 2013.

Nous avons reçu de nombreux commentaires (environ 50) dont certains la veille du comité.

Les commentaires retenus seront à transmettre à la Ph Eur avant le 28 février 2014.

Le comité est sollicité pour échanger et permettre à l'Ansm de préparer la transmission ou non d'éventuels commentaires à la DEQM.

Ils ont été transmis dans leur totalité aux participants. Dans ce cas précis, ils apparaissent sous la forme d'un tableau récapitulatif. La numérotation des commentaires va de 1 à 56 et les formulations de type bis ou ter sont liés à des commentaires additionnels arrivés en cours d'étude afin d'éviter une modification de toute la numérotation (à noter, ces commentaires sont indépendants les uns des autres).

Une réunion en interne a permis d'analyser les commentaires reçus et un encadré horizontal en vert mentionne si le commentaire est retenu (donc transmissible à l'Europe) ou donne les réponses qui seront apportées aux initiateurs du/des commentaire (s).

Cette analyse était nécessaire car il n'était pas envisageable en une heure dédiée de passer en revue chacun de ceux-ci.

Il est demandé aux participants du comité s'ils ont des observations, remarques, désaccords avec les commentaires retenus et les réponses aux questions, mentionnées dans le tableau récapitulatif en leur possession.

Aucune objection majeure n'a été formulée par les participants du comité.

Au final, le comité est sollicité sur différents points identifiés par l'Ansm, correspondant à des thématiques pouvant regrouper plusieurs commentaires.

1 er point : Le titre

Voir commentaires du tableau 1, 2 et 2bis

À la proposition formulée sous les commentaires 2 et 2 bis (violet), une dernière proposition faite en séance est de remplacer par « **Cell based product** » et d'argumenter en complément de l'argumentaire de spécificité française, que le chapitre 5.2.2 en cours d'élaboration au groupe RCG a pour titre « Raw material for the production of cell based and gene therapy product ».

Au vu des discussions, les propositions suivantes seront formulées à la DEQM :

- ▶ en français « Contrôle bactériologique et fongique des produits cellulaires »
- ▶ en anglais « Bacteriological and fungal control of cell based products »

2 ème point : Essai de stérilité 2.6.1 et sa place dans le chapitre

Voir les commentaires du tableau 9bis, 13, 15, 21, 22, 22 bis.

Le chapitre 2.6.1 « Stérilité » est un chapitre de la Pharmacopée européenne au même titre que le chapitre 2.6.27. La délégation allemande est à l'initiative de l'intégration de la référence au 2.6.1 dans le 2.6.27. Toutefois, le 2.6.27 a justement été créé pour les produits cellulaires car le 2.6.1 n'était pas optimal dans toutes les circonstances liées aux produits cellulaires.

Au vu des discussions, les propositions suivantes seront formulées à la DEQM :

- ▶ Modifier l'ordre des paragraphes en faisant référence en dernier au chapitre 2.6.1 comme suit,
 - 3-1 Méthode automatisée fondée sur la croissance
 - 3-2 Combinaison d'une préculture et d'une détection par des méthodes alternatives (5.1.6)
 - 3-3 Détection directe par des méthodes alternatives (5.1.6)
 - 3-4 Essai de stérilité (2.6.1)

- ▶ La proposition de reformulation comme proposé dans le commentaire 15 est retenue :

« Contrôler la stérilité de chaque lot de milieu par incubation des milieux choisis à la température définie pour l'essai pendant au moins 7 jours »

« Un essai de fertilité doit être effectué sur chaque lot de milieu par le producteur de milieu et/ou l'utilisateur en ensemençant en duplicate chaque milieu avec 10 -100 microorganismes de chacune des souches citées dans le tableau 2.6.27-1 puis en incubant à la température définie pour l'essai pendant 7 jours au maximum pour les méthodes de détection automatisée ».

- ▶ Le titre 3-2-1 Essai de fertilité des milieux est conservé. On parle de contrôler la stérilité mais plus d'essai de stérilité.

Le terme « conformité des milieux » n'est pas retenu (commentaire 22 bis).

3 ème point : Les germes au niveau de la validation de méthode

Voir commentaires du tableau 20, 23, 24, 25, 28, 29, 30.

Divers commentaires ont été formulés sur les souches mentionnées dans le tableau 2.6.27-2.

Au vu des discussions, les propositions suivantes seront formulées à la DEQM :

► Remplacer *S pyogenes* (Strepto A) par *S agalactiae* (Strepto B) en liaison avec le risque de contamination des sangs placentaires.

► Rajouter une entérobactérie car *yersinia* a été retirée de la liste à la demande de l'Allemagne. La proposition d'*Escherichia coli* ou bien d'un enterobacter sera laissé au choix du groupe CTP de la Ph EU. L' *E. coli* pourrait être l'atcc 25922-CIP7624

► Certains commentaires étaient en faveur du retrait de *micrococcus luteus* car délicat à mettre en évidence avec certains milieux avec résine. Il apparait toutefois un intérêt d'être informé que le milieu utilisé manque de sensibilité pour un tel germe (de la peau, aérobic). Plutôt que de l'intégrer dans ce tableau afin de ne pas impacter sur la validation de méthode, une phrase mentionnant qu'il est conseillé de tester *micrococcus luteus* car ce germe a parfois des difficultés à pousser sur des milieux avec résine pourrait être rajoutée et proposée à l'Europe.

Une étude effectuée sur le bactalert à l'Ansm n'a pas mis en évidence une telle difficulté mais les résines sont de compositions différentes selon les fabricants.

Des discussions sur l'ajout d'un autre germe de la peau ont eu lieu telle la proposition de *Staphylococcus epidermidis*. Cependant un *Staphylococcus aureus* fait déjà partie de la liste et le profil respiratoire de micrococcus est aérobic strict, infectant possiblement l'immunodéprimé. Il est précisé que le choix des types de souches mentionnés dans le tableau s'est basé initialement sur la variété métabolique des différentes souches bactériennes.

Le *propionibacterium acnes* est présent dans la liste.

Il est à noter qu'une phrase sous le tableau mentionne qu'il peut être nécessaire de modifier cette liste de microorganisme en fonction de l'origine des cellules et de tout microorganisme détecté précédemment ou associé au type de cellules considéré.

► Concernant divers commentaires relatifs à la recherche spécifique des champignons, il est précisé qu'il n'a pas été envisagé de milieu ou de tube supplémentaire car le volume d'échantillon reçu par les laboratoires de microbiologie est souvent limité, que ces produits ne sont pas ou peu soumis au risque de contamination environnementale et que dans le cadre de l'immunodépression, *Aspergillus* et *Candida* sont très bien mis en évidence via les bouillons usuels.

Le point limitant est le volume souvent insuffisant pour réaliser un tube supplémentaire.

Le chapitre « contrôle bactériologique et fongique des greffons cornéens » récemment publié propose lui un tube supplémentaire pour la recherche mycologique car le risque de moisissure existe dans ce cas, les cornées étant souvent prélevées après tous les autres organes dans les morgues. Les produits cellulaires ne sont pas dans ce cas.

4 ème point : Durée d'incubation

Voir commentaires du tableau 15, 37bis, 40 et biblio 46

Divers commentaires relatifs au manque d'information sur la durée d'incubation ont été formulés.

L'article de D Hocquet et col en cours de publication 2013 «validation of an automates blood culture system for sterility testing of cell therapy products » utilise une incubation de 7 à 10 jours, et démontre que 7 jours sont suffisants. Les diverses études de l'Ansm vont également dans ce sens.

[Au vu des discussions, la proposition de durée d'incubation de 7 jours sera formulée à la DEQM.](#)

Avec les méthodes automatisées, 5 jours sont souvent suffisants mais préciser une durée un peu supérieure permet d'éviter les dérives.

Il est précisé que le rendu négatif à date est toujours possible : il est écrit page 6 du document 4 ANP « Le temps d'incubation est adapté aux besoins spécifiques liés aux caractéristiques et à l'utilisation prévue du produit cellulaire. Comme décrit précédemment, une libération selon la notion « négatif à date » peut être choisie dans les cas justifiés et autorisés, sous réserve que, après cette lecture intermédiaire, tous les essais se poursuivent jusqu'à la fin de période d'incubation ».

5 ème point : Le volume d'ensemencement

Voir commentaires du tableau 37

Il est précisé dans la version mise en enquête : 1 % du produit si le volume est >10 ml
Après discussion, il apparaît que la précision d'un volume équivalent à 1 % était utile à préciser pour des échantillons de 10 à 100 ml.

Il est proposé de remplacer la phrase existante par :

« Si le volume de la préparation cellulaire est de 10 à 100 ml, examinez au moins 1 pour cent du volume total. En cas de volume plus petit, l'utilisation d'autres approches doit être justifiée ».

Un participant est gêné par l'expression en pourcentage qui fait que selon le type d'échantillon et/ou de produit cellulaire reçu le volume d'ensemencement est différent.

6ème point : La température d'incubation

Voir commentaires du tableau 38, 39, 41, 42, 43, 44.

Il est expliqué que les options du tableau 2.6.27-3 sont liées aux pratiques des différents pays participant au groupe CTP. L'option 2 qui définit l'utilisation d'une incubation à 35 °C a été proposée et défendue par l'expert français. Cette option a été difficilement acceptée lors des discussions du groupe européen CTP. La proposition initiale du Paul Ehrlich Institut était de n'avoir qu'une seule température unique à 30°C.

La température d'incubation utilisée par les laboratoires varie entre 35 °C et 37 °C.

Exemples : Commentaires 42,43 : incubation à 35°C

Commentaires 41,44 : incubation à 37°C

Les laboratoires de microbiologie soumis, dans le cadre du contrôle des produits sanguins labiles, à la Circulaire DGS/DHOS/AFSSAPS n° 2003-581 du 15 décembre 2003 relative aux recommandations concernant la conduite à tenir en cas de suspicion d'incident transfusionnel par contamination bactérienne, ont de ce fait une température imposée à 37 °C. Il apparaît donc nécessaire de faire modifier le libellé en précisant 35-37 °C en lieu et place de 35 °C.

Il est précisé via un commentaire la quasi impossibilité pour l'automate Bactec de modifier la température d'incubation, le Bactalert semblant plus souple de fonctionnement.

Au vu des discussions, la proposition de température d'incubation « 35°C-37°C » sera formulée à la DEQM.

La question suivante est posée au comité : dans les cas où la Ph Eur via le groupe CTP refuserait de retenir cette demande (37 °C), doit-on considérer ce point comme une question bloquante ?

En raison de l'absence de réponse, cette question sera reposée lors d'un prochain comité. Il est expliqué que le mode de fonctionnement de la Ph Eur concernant une adoption de monographie ou chapitre général nécessite un vote à l'unanimité des 38 membres de la commission européenne de pharmacopée. Ainsi l'opposition d'un seul pays suffit à la non-adoption d'un sujet.

Autres remarques discutées en séance :

► Il est fait remarquer par un participant qu'en 3-2-4, est mentionnée la lecture visuelle alors que les systèmes automatisés sont fortement conseillés dans ce chapitre et que les lectures manuelles sur boîte ne semblent pas retenues. Le maintien de ce terme est toutefois conservé pour certains systèmes d'hémocultures manuelles qui persistent encore dans certains laboratoires (ex Hémoline).

► Les méthodes alternatives font l'objet d'un chapitre entier en cours de révision actuellement : chapitre 5.1.6 de la Ph Eur. Elles sont citées ici plutôt pour favoriser et permettre leur adaptation aux produits cellulaires de centres qui souhaiteraient développer ce type de méthodes. Il y aura nécessité de les valider bien évidemment. La révision actuelle porte sur des exemples de validation de méthodes mais il ne s'agit pas d'exemples de produits cellulaires.

Il est précisé par un participant que l'ATP métrée sur membrane se pratique sur le surnageant de culture. Les microcolonies qui se font aussi après filtration ne sont pas facilement adaptables aux produits cellulaires.

La cytométrie de flux est une méthode qui pourrait être intéressante.

4.1.2 Cultures cellulaires utilisées pour la préparation de vaccins pour usage vétérinaire (5.2.4) [PA/PH/EXP.15V/T(12)27 ANP]

Ce chapitre général a été révisé pour inclure le contrôle des rétrovirus sur les lignées cellulaires et sur les cellules primaires pour la production des vaccins vétérinaires. Le résultat final doit démontrer d'une part que le risque associé à la présence de rétrovirus endogène est négligeable dans le produit final et d'autre part l'absence de rétrovirus exogène.

Ces exigences sont le fruit d'une collaboration entre le groupe d'experts de la Pharmacopée européenne traitant des vaccins pour usage vétérinaire et le Comité des Médicaments à usage vétérinaire (CVMP) de l'Agence européenne du Médicament. L'introduction et la description de cet essai « Rétrovirus » font suite à une contamination de vaccins vétérinaires par le virus RD114.

A noter qu'un essai de recherche des rétrovirus est déjà présent dans le chapitre 5.2.3 substrats cellulaires utilisées pour la production de vaccins pour usage humain.

Un participant précise que le chapitre 5.2.3 est actuellement en cours de révision dans le groupe « Vaccins humains » de la Direction Européenne de la Qualité du Médicament afin d'inclure de manière plus détaillée les stratégies de test spécifique pour la recherche des rétrovirus sur cellules aviaires et de rongeurs.

Un participant s'interroge sur l'interprétation qui peut être donnée aux essais au vu de la rédaction du texte. En effet, pour les vaccins humains, la présence éventuelle de rétrovirus est recherchée par une recherche de transcriptase inverse (essai PERT product-enhanced reverse transcriptase) et/ou par microscopie électronique de transmission puis si au moins l'un des deux essais donne un résultat positif, des essais d'infectivité sont réalisés. Pour les vaccins vétérinaires, étant donné l'exemple fourni, cela pourrait être interprété par les utilisateurs comme la mise en œuvre d'un essai systématique d'infectivité. Cependant, la rédaction du texte laisse la possibilité d'effectuer ou non des essais d'infectivité sur des cellules permissives avec un essai PERT : ce n'est qu'un exemple d'essai qui peut être réalisé. Tout autre protocole est possible.

En l'absence de proposition rédactionnelle alternative, ce commentaire ne sera pas envoyé à la DEQM.

4.2 Monographies à la Pharmacopée française

4.2.1 Recommandations pour le test clonogénique des progéniteurs CFUGM

Ce chapitre « recommandations pour le test clonogénique des progéniteurs CFUGM » est destiné à être publié à la Pharmacopée française dans un premier temps puis il sera proposé à la Pharmacopée européenne comme ajout au programme de travail lors d'une commission européenne de Pharmacopée (a priori juin 2014).

Les documents envoyés dernièrement aux membres du comité contiennent :

- la totalité des commentaires reçus présents sous la forme d'encadrés intégrés au texte mis en enquête publique. Les décisions et/ou réponses relatives à chacun des commentaires ou groupe de commentaires ont été formalisées sous forme d'une case horizontale en dessous de chaque commentaire. Les parties surlignées permettent de différencier les versions V2 et V3.
- le texte à visée finale V3 qui est surligné pour visualiser les dernières modifications apportées au texte entre les versions V2 et V3.

Rappel du principe : Ce test permet d'évaluer le potentiel hématopoïétique d'un greffon, c'est-à-dire son contenu en progéniteurs clonogéniques proportionnel à la qualité du greffon. Il repose sur la mise en évidence indirecte des progéniteurs hématopoïétiques présents dans l'échantillon par leur capacité à former des colonies sur milieu semi solide contenant différents facteurs de croissance.

Ce test est important pour des décisions cliniques. La mesure des CD34+ et la capacité clonogénique des progéniteurs permettent de donner une bonne idée de la qualité du greffon. Elle permet, dans le cas d'une greffe de cellules souches hématopoïétique, de connaître la dose à injecter pour un maximum d'efficacité de prise de greffe.

Pour information, il est précisé qu'une enquête collaborative a été menée en 2013 et a fait l'objet d'un mémoire de Master 2 /Paris V-VII/ Pharmacologie /parcours biotechnologies pharmaceutiques et thérapies innovante. Ce mémoire est intitulé : « Réalisation d'une étude nationale de performances dans le cadre de la standardisation du test clonogénique des progéniteurs CFU-GM ».

Il est demandé aux participants du comité s'ils ont des observations, remarques, désaccords avec les décisions concernant les commentaires retenus et les réponses aux questions, mentionnées dans le tableau récapitulatif en leur possession.

Aucune objection majeure n'a été formulée par les participants du comité.

Une revue des derniers commentaires surlignés est réalisée en séance:

▶ Page 2/ Détermination de la concentration d'ensemencement / En fonction du pourcentage de CD 34 + dans l'échantillon, la phrase surlignée est modifiée comme suit : « La détermination de la concentration d'ensemencement, décrite dans une procédure, doit être effectuée sur la base de la numération des CD34+ sauf justification contraire. Lorsque l'on dispose du pourcentage de CD34+, elle peut être calculée de la façon suivante..... »

▶ Page 3/ Lecture des colonies et validation analytique, premier point, en fin de paragraphe, la phrase est modifiée comme suit « en distinguant les colonies macrophagiques « en lieu et place de « ...en excluant les colonies macrophagiques ».

Les colonies macrophagiques ne sont pas comptées par tous les centres et ne sont pas considérées par tous les centres dans les calculs. Il s'agit de colonies en nombre restreint avec un impact final modéré de leur comptage. Ces colonies sont facilement reconnaissables.

▶ Page 4 /Interprétation des résultats, la dernière phrase est modifiée comme suit : « À titre indicatif, le taux de clonogénicité attendu »

▶ Page 4 / Validation de la technique. Les modifications ci-dessous ont été apportées :

Point 1, « Répétabilité intra-essai» en lieu et place de « Reproductibilité... »

Point 4, « Étude de la clonogénicité inter-essais » en lieu et place de « Étude de corrélation CD34+/CFUGM (reproductibilité inter-essai) »

Point 6, « Vérification inter-lots ... » en lieu et place de « Validation »

Le vote a eu lieu en fin de séance

Question posée par le secrétaire de séance sur laquelle les membres doivent voter :

Les membres du comité sont ils favorables à la publication à la pharmacopée française de la version finale dénommée V4 « Recommandations pour le test clonogénique des progéniteurs CFUGM »?

Vote : Le texte est adopté à l'unanimité par les 6 membres présents sur les 9 membres nommés

Le texte modifié est joint au compte rendu. Les parties surlignées permettent d'identifier les modifications intervenues entre V3 et V4.

Clôture de la séance à 17h15.

NOTE TECHNIQUE PRO PHARMACOPOIEA N° 1245

NOTE RELATIVE AU CHAPITRE GÉNÉRAL PROPOSÉ :

Le contrôle de qualité externe des préparations de thérapie cellulaire organisé par l'Agence Nationale de Sécurité du médicament (Ansm) a pour fondement les articles L.5311-1 et L.5311-2 du Code de la Santé Publique. L'Ansm procède ou fait procéder à toute expertise et à tout contrôle technique relatif aux produits de santé. Du fait de la prépondérance des produits hématopoïétiques et de leur utilisation thérapeutique, ce contrôle concerne les cellules souches hématopoïétiques (CSH) issues du sang périphérique en situation autologue ou allogénique, de la moelle osseuse, du sang placentaire et les CSH décongelées produites dans des établissements autorisés au nombre de 34 en 2012. Les contrôles suivants : numération et viabilité des cellules nucléées et des cellules CD34+, test CFU-GM et contrôle bactériologique et fongique sont réalisés. Dans ce cadre, les efforts de standardisation ont principalement porté sur la numération des cellules CD34+ et sur le contrôle bactériologique avec notamment la publication de recommandations et l'organisation d'études collaboratives ayant permis d'évaluer la sensibilité des méthodes utilisées. Concernant le test clonogénique, bien qu'une corrélation significative soit observée entre producteurs et Ansm, l'écart moyen entre les résultats CFU-GM des producteurs et ceux de l'Agence reste d'environ 30% (± 20). Pour réduire cette différence, plusieurs éléments ont été analysés tels que le milieu de culture (avec ou sans Erythropoïétine (EPO)), le nombre de cellules CD34+ensemencées, la reproductibilité intra et inter-laboratoires ainsi que la corrélation CFU-GM/CD34 pour les producteurs et l'Ansm. Ces résultats montrent que le Coefficient de variation (CV(%)) pour le nombre de CFU-GM est inférieur à 15% si un nombre ciblé de CD34 est ensemencé et que l'écart moyen producteur - Ansm s'affine à environ 20% entre les 2 résultats CFU-GM en milieux sans Epo alors qu'il est d'au moins 30% en présence d'Epo. Pour mieux évaluer les variations liées à la lecture, la Direction des Contrôles de l'Ansm a également organisé une étude sur l'identification des colonies en envoyant un diaporama de différentes colonies hématopoïétiques obtenues sur milieu semi-solide de méthylcellulose à l'ensemble des producteurs.

La standardisation du test clonogénique nous montre qu'il peut être utilisé avec fiabilité pour évaluer la qualité des greffons hématopoïétiques. Les principaux éléments pour atteindre ces objectifs sont aujourd'hui proposés sous forme de « recommandations pour le test clonogénique des progéniteurs CFU-GM ».

RECOMMANDATIONS POUR LE TEST CLONOGENIQUE DES PROGENITEURS CFU-GM

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

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

PRINCIPE

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

MILIEU DE CULTURE

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

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

PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON POUR MISE EN CULTURE

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

DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION D'ENSEMENCEMENT

En fonction du pourcentage de CD34+ dans l'échantillon

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

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

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

En fonction de la nature des cellules

Pour les CSP (Cellules Souches Périphériques) avant congélation :

- Définir la concentration d'ensemencement en fonction du pourcentage de CD34+ de l'échantillon afin d'avoir environ 150 à 300 CD34+/mL selon le milieu utilisé en visant un nombre de colonies CFU-GM par boîte compris entre 20 et 80. Prendre en compte la clonogénicité moyenne obtenue sur le milieu utilisé.

- Si le pourcentage de CD34+ n'est pas connu, réaliser au moins 2 concentrations différentes (à définir sur la base de la médiane du % de CD34+ dans les produits préparés)¹. L'absence de la connaissance du nombre de CD34+ conduit à utiliser 2 à 3 concentrations cellulaires finales, généralement, 10 000, 40 000 et 80 000 cellules/mL.
- Il est possible de s'appuyer sur les CD34+ circulants pour estimer la concentration de cellules nucléées à ensemercer².

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

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

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

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

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

Ensemencement différé

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

LECTURE DES COLONIES ET VALIDATION ANALYTIQUE

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

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

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

INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats sont généralement exprimés en CFU-GM/10⁵ cellules, en CFU-GM/mL de la poche ou CFU-GM/kg de receveur et la clonogénicité doit être déterminée (nombre de CFU-GM/nombre de CD34 x 100). Les doses sont calculées de la façon suivante :

Nombre de CFU-GM/10⁵ cellules =

(Nb de CFU-GM comptées/Nb de cellulesensemencées) x 100 000

Nombre de CFU-GM/mL =

(Nb de CFU-GM comptées/Nb de cellulesensemencées) x [concentration en leucocytes de la poche]

Nombre de CFU-GM/kg = (si greffon attribué)

(Nb CFU-GM/mL x volume de la poche en mL) / poids du patient

Pour le critère de fonctionnalité du greffon, une dose minimale de CFU-GM/kg doit être définie au regard de la corrélation CD34/CFU-GM évaluée en condition intra-laboratoire et selon l'origine des CSH. Si malgré la validation technique de l'ensemble des conditions opératoires, la culture présente moins de 20 CFU-GM ou une clonogénicité anormalement faible (pour les CSP, <10%) ou forte (>40%), il convient d'alerter sur la qualité du greffon et d'identifier les causes dans la mesure du possible. **A titre indicatif le taux de clonogénicité attendu est généralement compris pour les CSP et USP entre 10 % et 30 %, pour les prélèvements de moelle osseuse entre 5 % et 20 %, pour les produits décongelés CSP autour de 10 %, pour les USP décongelées entre 10 % et 20 %.**

VALIDATION DE LA TECHNIQUE

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

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