



HAL
open science

Lysat plaquettaire, statuts juridiques et autorisations nécessaires à son utilisation en Europe

Marine Desgouillons

► **To cite this version:**

Marine Desgouillons. Lysat plaquettaire, statuts juridiques et autorisations nécessaires à son utilisation en Europe. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03162427

HAL Id: dumas-03162427

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03162427v1>

Submitted on 8 Mar 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

U.F.R DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 2021

Thèse n°14

THESE POUR L'OBTENTION DU
DIPLOME D'ETAT de DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

Par DESGOUILLONS, Marine

Née le 10/08/1994 à CROIX (59)

Le 28 janvier 2021

**LYSAT PLAQUETTAIRE,
statuts juridiques et autorisations nécessaires à son utilisation en Europe**

Sous la direction de : Charlotte FLIPO

Membres du jury :

Mme BAUMEVIEILLE, Marie

Mme FLIPO, Charlotte,

Mme GRANET Corinne

Président

Examineur

Examineur

Remerciements

A Madame Baumevieille,

Je vous remercie d'avoir accepté avec enthousiasme et intérêt de juger ce travail et de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Soyez assurée de ma parfaite considération et de mon profond respect.

A Madame Charlotte Flipo,

Je te remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Merci de m'avoir guidée et écoutée tout au long de l'élaboration de cette thèse et de m'avoir toujours soutenue malgré les difficultés. Sois assurée de ma plus profonde reconnaissance.

A Madame Corinne Granet,

Je te remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Merci de m'avoir encouragée à terminer le travail. Sois assurée de ma parfaite considération et de mon profond respect.

A mes parents,

Merci d'être là pour moi au quotidien et de m'avoir soutenu pendant ces longues études, en particulier pendant la première année. Merci de m'avoir appris à persévérer et positiver dans n'importe quelle situation. Votre présence m'est indispensable. Je vous aime.

A mes frères et sœurs, Émilie et Matteo,

Pour tous ces moments passés ensemble, pour tout l'amour que je vous porte, pour cette solidarité qui nous lie dans les bons comme dans les mauvais moments, pour tous vos encouragements.

A mes grands-parents, à Mamie Martine,

Pour votre présence si bénéfique dans ma vie, pour tous les conseils que vous m'avez donné et pour tout le soutien que vous m'apportez. Mamie Martine, tu me manques tellement. J'aurais aimé que tu sois là à cette soutenance.

A Manon, Lina et Clarissa, mais aussi toutes les autres de la team,

Pour toutes ces années d'études passées ensemble, parfois studieuses mais surtout pleines de bons moments, pour tout le soutien apporté les unes aux autres. Vous êtes très importantes pour moi. On aura fait les 400 coups toutes ensemble ! Et ce n'est pas fini...

A Clément,

Merci de faire partie de ma vie, de me faire rire encore et encore. Merci pour toutes tes attentions et ton soutien inconditionnel, lors de la rédaction de cette thèse comme dans la vie.

Table des matières

| | | |
|-----|---|----|
| I. | Présentation générale du lysat plaquettaire..... | 10 |
| | A. Généralités..... | 10 |
| | 1) Définitions..... | 10 |
| | 2) Composition et propriétés..... | 11 |
| | 3) Réglementation autour du don..... | 15 |
| | B. Processus de fabrication..... | 20 |
| | 1) Préparation de la matière première..... | 21 |
| | 2) Contrôle de la matière première et étape d'inactivation virale..... | 23 |
| | 3) Fabrication du lysat plaquettaire..... | 28 |
| | 4) Contrôles du produit fini..... | 32 |
| | C. Différents types de lysat plaquettaire..... | 36 |
| | 1) Définition selon sa composition..... | 36 |
| | 2) Définition en fonction de sa potentielle inactivation..... | 37 |
| | D. Utilisation du lysat plaquettaire..... | 39 |
| | 1) Usage scientifique en tant que supplément de milieu de culture..... | 39 |
| | 2) Usage thérapeutique potentiel..... | 41 |
| | 3) Comparaison vis-à-vis du sérum de veau fœtal (SVF)..... | 42 |
| II. | Réflexion autour des statuts et autorisations pour le lysat plaquettaire selon son utilisation..... | 45 |
| | A. Usage en tant que supplément de milieu de culture..... | 45 |
| | 1) Usage en recherche..... | 45 |
| | 2) Usage en culture cellulaire pour la production de médicaments biologiques et de médicaments de thérapie innovante (MTI)..... | 50 |
| | 3) Usage en culture cellulaire pour la production des préparations de thérapie cellulaire..... | 53 |
| | B. Usage dans un but thérapeutique..... | 55 |
| | 1) Substance active biologique..... | 56 |
| | 2) Préparation de thérapie cellulaire..... | 57 |
| | 3) Médicament..... | 60 |
| | a. Médicament expérimental..... | 65 |
| | b. Cas du médicament orphelin..... | 68 |
| | c. Médicament biologique..... | 74 |
| | d. Médicament dérivé du sang..... | 76 |

e. Médicament de thérapie innovante.....77

Liste des figures

| | |
|---|----|
| Figure 1 : Cargaison de granules de plaquettes (9)..... | 12 |
| Figure 2 : Différents types et fonctions des facteurs de croissance plaquettaires (2)..... | 13 |
| Figure 3 : Rôle des facteurs de croissance dérivés de plaquettes dans la cicatrisation (9)... | 14 |
| Figure 4 : Différentes modalités de préparation des concentrés plaquettaires (9)..... | 21 |
| Figure 5 : Méthode INTERCEPT®. a. Structure de l'amotosalène b. Mécanisme d'action de l'amotosalène (38)..... | 26 |
| Figure 6 : Mode de préparation du lysat plaquettaire humain (Human Platelet Lysate ou HPL) (45)..... | 28 |
| Figure 7 : Diversité des activités biologiques exercées par les cellules souches mésenchymateuses (55)..... | 40 |
| Figure 8 : Applications cliniques potentielles du lysat plaquettaire en médecine régénérative et thérapie cellulaire (2)..... | 41 |
| Figure 9 : Déclaration pour la préparation et conservation d'éléments du corps humain pour les propres besoins de programme de recherche du demandeur (72)..... | 47 |
| Figure 10 : Autorisation pour la préparation et conservation d'éléments du corps humain en vue de leur cession pour un usage scientifique (73)..... | 48 |
| Figure 11 : Importations et exportations d'échantillons biologiques humains destinés à la recherche (80)..... | 50 |
| Figure 12 : Diagramme représentatif de la structure du format CTD (108)..... | 63 |
| Figure 13 : Le médicament, un parcours encadré (114)..... | 65 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau 1 : Deux lysats plaquettaires de compositions différentes..... | 36 |
| Tableau 2 : Comparaison entre ATU de cohorte et ATU nominative..... | 73 |
| Tableau 3 : Comparaison entre Médicament Dérivé du Sang (MDS) et Produit Sanguin Labile (PSL)..... | 76 |

Liste des abréviations

ACD – Acide citrique, Citrate, Dextrose
ADN – Acide Désoxyribonucléique
ARN – Acide Ribonucléique
ADP – Adénosine Diphosphate
AMM – Autorisation de Mise sur le Marché
ANSM – Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des autres produits de santé
ARS – Agence Régionale de Santé
ATNC – Agent Transmissible Non Conventionnel
ATP – Adénosine Triphosphate
ATU – Autorisation Temporaire d'Utilisation
BCA – Acide Bicinchoninique
BPD – Bonnes Pratiques de Distribution
BPL – Bonnes Pratiques de Laboratoire
BPF – Bonnes Pratiques de Fabrication
CE – Communauté Européenne
CHMP – Committee for Human Medicinal Products (Comité des médicaments à usage humain)
CMV – Cytomegalovirus
COMP – Committee for Orphan Medicinal Products (Comité des médicaments orphelins)
CP – Concentré Plaquettaire
CPA – Concentré Plaquettaire d'Aphérèse
CPD – Citrate, Phosphate, Dextrose
CPP – Comité de Protection des Personnes
CRH – Coordonnateurs Régionaux d'Hémovigilance
CSM – Cellules Souches Mésoenchymateuses
CSP – Code de la Santé Publique
CTSA – Centre de Transfusion Sanguine des Armées
DEQM – Direction Européenne de la Qualité du Médicament et soins de santé
EBV – Virus d'Epstein-Barr
EFS – Établissement Français du Sang
EMA – European Medicine Agency (Agence Européenne du Médicament)
EST – Encéphalopathie Spongiforme Transmissible
HTLV - Virus T-Lymphotrope Humain
ICH – International Council for Harmonisation (Conseil International d'Harmonisation)
LAL – Lysat d'Amoebocytes de Limule
LD – Ligne Directrice
LP – Lysat Plaquettaire
MDS – Médicament Dérivé du Sang
MCP – Mélange de Concentrés de Plaquettes
MO – Micro-organismes
MTI – Médicament de Thérapie Innovante
MTI-PP – Médicament de Thérapie Innovante Préparé Ponctuellement
OMS – Organisation Mondiale de la Santé
PE – Pharmacopée Européenne
PRP – Plasma Riche en Plaquettes

PSL – Produit Sanguin Labile
PUT – Protocole d'utilisation thérapeutique et de recueil d'informations
PTC – Préparation de Thérapie Cellulaire
QBD – Qualification Biologique du Don
Rh – Rhésus
SVF – Sérum de Veau Fœtal
TMP – Triméthyl-psoralène
UE – Union Européenne
UV – Ultraviolet
VHA – Virus de l'Hépatite A
VHB – Virus de l'Hépatite B
VHC – Virus de l'Hépatite C
VHE – Virus de l'Hépatite E
VIH – Virus de l'Immunodéficience Humaine
8-MOP – 8-méthoxypsoralène

Introduction

Depuis quelques années, le lysat plaquettaire est de plus en plus utilisé de façon récurrente dans la culture cellulaire en remplacement du sérum de veau fœtal. Ce produit, dérivé de concentrés plaquettaires, est issu des dons de sang humain collectés en France par les Établissements Français du Sang. En particulier, la production de lysat plaquettaire utilise les concentrés plaquettaires considérés comme « expirés », c'est-à-dire ne pouvant plus être utilisés pour la transfusion. Particulièrement riche en facteurs de croissance et en éléments nutritifs, il favorise la croissance des cellules dans leur milieu de culture. Le lysat plaquettaire a démontré son efficacité dans la culture de nombreux types cellulaires comme, par exemple, les cellules souches mésenchymateuses ou encore des types de cellules plus différenciées tels que les myocytes.

Grâce à son contenu abondant en facteurs de croissances, en protéines, en cytokines et en chimiokines, le lysat plaquettaire intéresse de plus en plus les scientifiques depuis quelques années. En particulier, le rôle physiologique essentiel des plaquettes dans la cicatrisation des plaies et la réparation tissulaire pourrait justifier son utilisation en médecine régénérative. Des potentielles utilisations en thérapeutique sont donc à l'étude, et certaines en cours d'expérimentation. Par exemple, l'utilisation de lysat plaquettaire pourrait permettre de booster l'ensemble du système de maintien de la survie cellulaire, voire de réparation des lésions neuronales et permettrait ainsi la survie des neurones dans le cas de maladies neurodégénératives, notamment la sclérose latérale amyotrophique (SLA), maladie rare (1). Cette capacité de régénération cellulaire pourrait également être utilisée pour traiter l'ostéoarthrose du genou (2).

L'objectif de ce travail est d'analyser les différentes caractéristiques du lysat plaquettaire pour tenter de définir son statut juridique dans le cadre d'une utilisation thérapeutique. L'apparition récente de potentielles applications thérapeutiques soulève des interrogations concernant son statut dans la réglementation européenne.

Dans la première partie de ce travail, nous vous présenterons les principales caractéristiques du lysat plaquettaire en précisant son procédé de fabrication ainsi que les différents types de lysats qui existent à ce jour. Nous parlerons également de l'utilisation actuelle du lysat plaquettaire en recherche et, en particulier, de son utilisation en substitution du sérum de veau fœtal. Nous discuterons ensuite dans la deuxième partie de ce travail des différents statuts juridiques qui pourraient s'appliquer au lysat plaquettaire en fonction de son utilisation. Cette deuxième partie traitera notamment de la définition du médicament et des catégories de médicaments auxquels le lysat plaquettaire pourrait appartenir dans le cadre d'une utilisation

thérapeutique. Nous détaillerons, pour chacun des statuts, les particularités à prendre en compte pour la fabrication du produit et sa mise sur le marché.

I. Présentation générale du lysat plaquettaire

A. Généralités

1) Définitions

Par définition, le lysat plaquettaire est un produit liquide composé de plasma humain riche en protéines et en facteurs de croissance d'origine plaquettaire (3). Le plasma sanguin, fraction liquide du sang non coagulé, est riche en plaquettes et contient des lipides, des facteurs de coagulation mais aussi des hormones et des protéines.

Le lysat plaquettaire peut être produit à partir d'un simple don de sang. Ainsi, il est possible d'utiliser le sérum humain, élément obtenu après élimination des éléments coagulants dans le plasma. Cependant, le sérum n'est généralement pas disponible dans les établissements de transfusion sanguine, ce qui constitue un inconvénient pour les applications de routine.

Ainsi, le plus souvent, le lysat plaquettaire s'obtient à partir de concentrés de plaquettes, produits bien connus de la communauté scientifique puisqu'ils sont utilisés et qualifiés dans le cadre de la transfusion sanguine (4).

Il existe deux variétés de concentrés de plaquettes (5), différentes selon le type de don du sang :

- **Les MCP ou Mélanges de Concentrés de Plaquettes :**

Un MCP est préparé à partir de concentrés plaquettaires (CP) de plusieurs dons de sang total (multi-donneurs de même groupe ABO). Pour avoir suffisamment de plaquettes pour traiter un patient, 5 à 6 donneurs de sang de mêmes groupes sanguins sont nécessaires.

- **Les CPA ou Concentrés Plaquettaires d'Aphérèse :**

Un CPA est préparé à partir d'un don d'aphérèse et, à l'inverse des MCPs, un don unique est suffisant (mono-donneur). En effet, l'aphérèse est une technique automatisée permettant d'extraire sélectivement les plaquettes (en plus grosse quantité par rapport aux dons classiques) et de restituer aux patients les autres éléments du sang non recherchés.

Une fois collectés, les concentrés plaquettaires sont maintenus sous agitation douce et constante. Cette agitation continue est indispensable pour empêcher l'agrégation des plaquettes, ce qui pourrait entraîner une perte de viabilité. En raison du risque de contamination bactérienne, les MCP et les CPA ont une durée de conservation au-delà de laquelle ils ne peuvent plus être utilisés pour l'acte de transfusion. En France, d'après la décision du 3 mai 2018 modifiant la décision du 8 février 2018 fixant la liste et les caractéristiques des produits sanguins labiles (6), la durée de conservation des MCP/CPA est de 7 jours (auparavant 5 jours) dans des conditions de température entre +20°C et +24°C (4). Pour permettre cette durée maximale de 7 jours, les concentrés plaquettaires sont conservés dans une solution à base de citrate, d'acétate et de solution saline (PAS ou Platelet Additive Solution). De plus, les CP (concentrés plaquettaires) contiennent toujours un anticoagulant : l'ACD (Acide citrique, Citrate, Dextrose) pour les CPA et le CPD (Citrate, Phosphate, Dextrose) pour les MCP.

Les conditions de température optimales limitent, entre autres, le risque d'activation plaquettaire pouvant menacer à leur agrégation tandis que l'agitation permet un mélange homogène et les échanges gazeux (7).

C'est seulement après expiration de la durée de conservation (7 jours en France) que les concentrés plaquettaires seront utilisés, entre autres, pour fabriquer du lysat plaquettaire.

2) Composition et propriétés

Comme décrit précédemment, le lysat est préparé à partir de plaquettes, ou thrombocytes, qui sont des cellules anucléées de petite taille (8). Elles sont des constituants du sang humain qui lui permettent, entre autres, de coaguler.

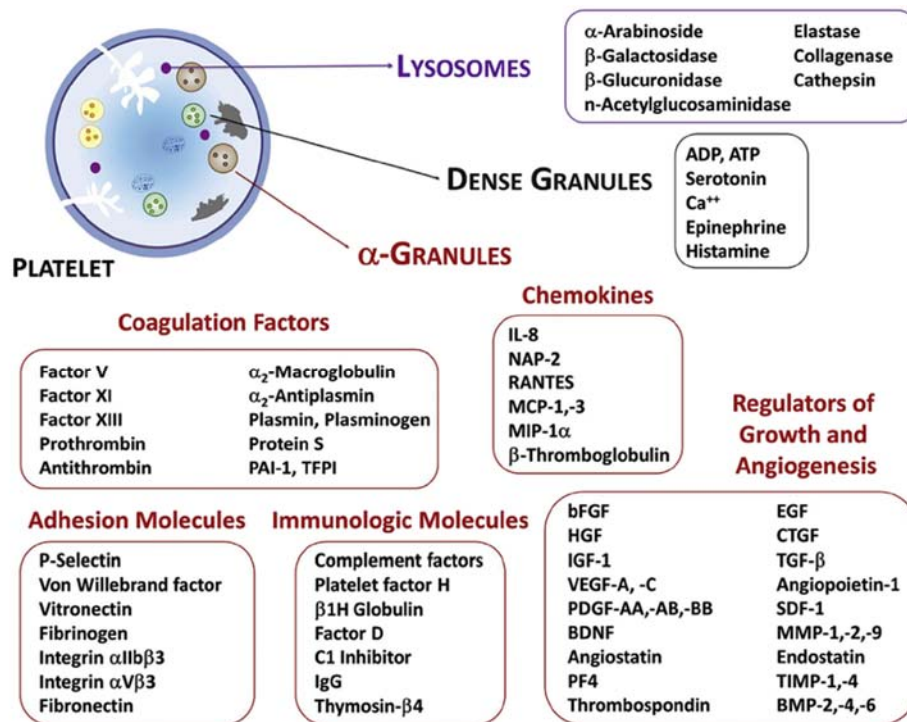


Figure 1 : Cargaison de granules de plaquettes (9)

Les plaquettes comportent dans leur structure plusieurs organelles dites « de sécrétion », plus communément appelés « granules plaquettaires » (10). Comme décrit dans le schéma ci-dessus, les granules stockent une pléthore de substances puissantes, notamment des enzymes lysosomales, des facteurs de coagulation, des molécules immunologiques et d'adhésion, des chimiokines et des facteurs de croissance pour l'hémostase, la défense de l'hôte, l'angiogenèse et la réparation des tissus.

Il en existe deux types : les granules denses et les granules alpha. Les granules denses contiennent de la sérotonine, de l'adénosine diphosphate et triphosphate (ADP, ATP) ainsi que du calcium (10). Majoritaires, les granules alpha contiennent de nombreuses protéines :

- Des facteurs de croissance : PDGF-AB, TGF-beta1, VEGF, BDNF, IGF1, b-FGF et EGF, HGF...
- Des cytokines : G-CSF, GM-CSF, interleukines et interférons...
- Des chimiokines
- Des facteurs de coagulation

NB : Parmi les facteurs de croissance, PDGF-AB, b-FGF, IGF1, TGF-beta1 et VEGF sont des acteurs majeurs dans la prolifération cellulaire, la cicatrisation et l'angiogenèse.

En particulier, les facteurs de croissances contenus dans les plaquettes ont des rôles dans différents processus, comme décrit dans la figure ci-dessous :

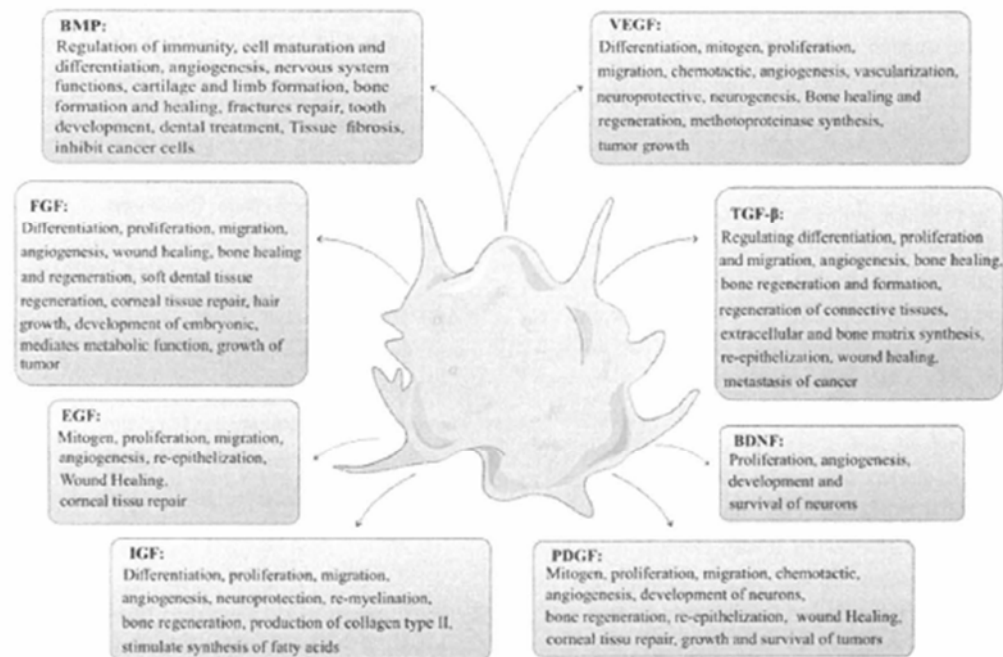


Figure 2 : Différents types et fonctions des facteurs de croissance plaquettaires (2)

En transfusion, les plaquettes sont utilisées principalement pour réduire ou contrôler le risque de saignement chez les patients présentant une faible concentration en plaquettes. En effet, les plaquettes contribuent à l'arrêt du saignement du fait de leurs propriétés d'adhésion et d'agrégation.

Dans un 1^{er} temps, en cas de saignement, elles colmatent les brèches des vaisseaux en s'étalant sur la surface lésée grâce à leurs propriétés adhésives et, en s'agrégeant les unes aux autres, elles vont former un bouchon appelé « clou plaquettaire » (10). Ce dernier est consolidé par la suite par l'activation de divers facteurs de coagulation.

En conséquence de leur activation, les plaquettes libèrent leur contenu en granules. Les cytokines, les facteurs de croissance et les chimiokines pro-inflammatoires contenus dans les granules contribuent à la cicatrisation des plaies en attirant les macrophages et les granulocytes pour éliminer les cellules et tissus endommagés mais aussi en aidant la défense contre la contamination bactérienne (figure ci-dessous).

Les effets stimulants et inhibiteurs de ces médiateurs provoquent la migration et la prolifération des fibroblastes, des cellules musculaires lisses et des cellules endothéliales, entraînant un remodelage des vaisseaux et une réparation tissulaire (9).

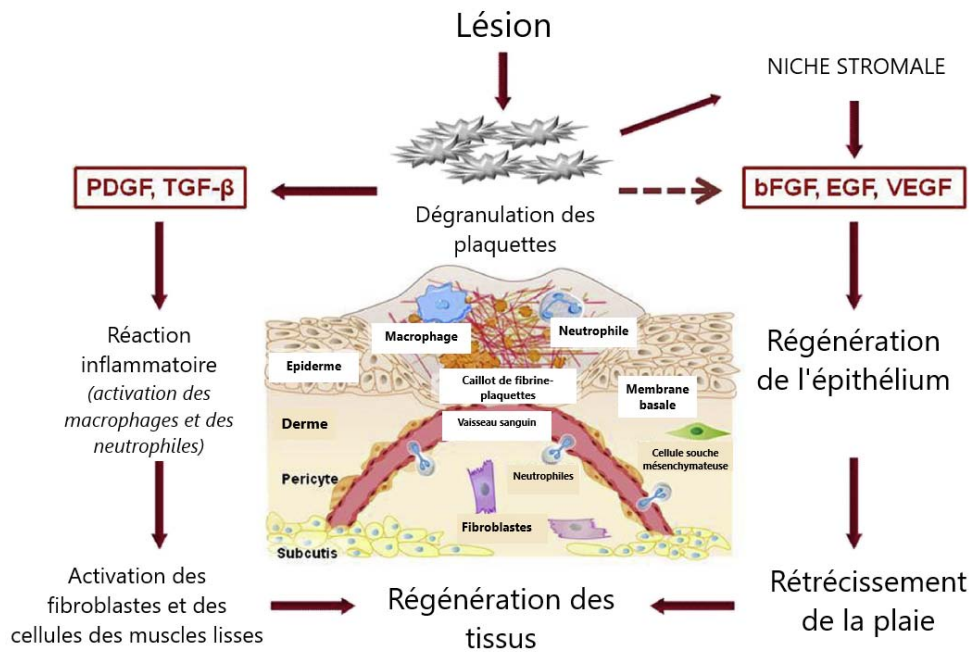


Figure 3 : Rôle des facteurs de croissance dérivés de plaquettes dans la cicatrisation (9)

Bien que l'hémostase constitue leur rôle principal, les plaquettes sont aussi reconnues comme éléments pouvant agir sur de nombreux processus physiologiques essentiels. Ceci s'explique par le protéome plaquettaire très complexe qui englobe les protéines, les peptides et les métabolites impliqués dans la défense immunitaire, l'adhésion des cellules et des protéines, la régulation de l'inflammation et de la réparation tissulaire, et l'angiogenèse. Majoritairement, le lysat plaquettaire contient de l'albumine et les immunoglobulines de types G, A et M (9).

Ces mêmes plaquettes servent à l'obtention du lysat. Ainsi, le lysat plaquettaire est un fluide biologique obtenu par un processus de lyse ou de dégranulation des plaquettes visant à perturber les membranes plaquettaires et à libérer leur contenu (9). Tout le contenu des granules plaquettaires est donc présent dans le lysat plaquettaire. Par conséquent, on peut dire que le lysat plaquettaire est une matière biologique multifactorielle. Son mécanisme d'action n'est pas clairement défini à ce jour mais il semblerait qu'il agisse en libérant un « cocktail » de facteurs de croissances, de nutriments et d'autres molécules utiles à la croissance cellulaire (9).

Parmi les avantages du lysat, on peut souligner qu'il contient plus de facteurs de croissance que les autres matières dérivées du sang (sérum humain et plasma riche en

plaquettes ou PRP) (9). De plus, sa production, qui nécessite peu d'étapes, est facile et peu coûteuse.

3) Réglementation autour du don

Le lysat plaquettaire est un produit issu de dons de sang humain. Ce type de prélèvement est très réglementé en France et en Europe.

Tout d'abord, d'un point de vue réglementaire, le concentré plaquettaire est considéré comme un Produit Sanguin Labile (PSL). Par définition, les Produits Sanguins Labiles sont des produits issus du sang d'un donneur, destinés à être transfusés à un patient (5). Il s'agit notamment du sang total, du plasma et des cellules sanguines d'origine humaine. Parmi ces produits, on distingue des produits autologues, destinés au donneur lui-même, et des produits homologues, destinés à une autre personne que le donneur.

Pour garantir la sécurité à tous les niveaux, les dons de sang ou de ses composants sont régis par différentes directives européennes et/ou lois nationales (11).

Tout d'abord, la directive 2002/98/CE (12) (directive européenne sur le sang) couvre toutes les étapes du processus de transfusion : don, collecte, contrôle, transformation, conservation et distribution. Ainsi, elle établit des normes de qualité et de sécurité de la collecte à la distribution du sang humain et de ses composants, ceci notamment dans le but d'éviter la transmission de maladies.

Cette directive (12) mentionne l'obligation pour les établissements de transfusion sanguine d'être agréés et autorisés par l'autorité compétente. En effet, le don de sang total ou de composants sanguins peut se faire uniquement dans ce qu'on appelle des « banques de sang » (établissement de transfusion sanguine). En France, c'est l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des autres produits de santé (ANSM) qui se charge de cet agrément et ces établissements de transfusion font régulièrement l'objet d'inspections par l'Agence. En cas de manquement aux exigences de la directive, l'établissement peut voir sa désignation et son autorisation d'ouverture suspendue ou retirée.

Dans chacun de ces établissements de transfusion sanguine, une Personne Responsable doit obligatoirement être désignée (12). Cette personne doit répondre à des conditions minimales de formation et est chargée de mettre en œuvre les exigences de la présente directive au sein de l'établissement.

Pour aider à mettre en œuvre cette directive de base, des actes d'exécution complémentaires ont été adoptés par la Commission Européenne en collaboration avec les autorités nationales :

- La directive 2004/33/CE (13) concernant certaines exigences techniques relatives au sang et aux composants sanguins ;
- La directive 2005/61/CE (14) concernant les exigences en matière de traçabilité et la notification des réactions et incidents indésirables graves ;
- La directive 2005/62/CE (15) concernant les normes et spécifications communautaires relatives à un système de qualité dans les établissements de transfusion sanguine.

En complément, les directives 2009/135/CE (16), 2011/38/UE (17), 2014/110/UE (18) et 2016/1214 (19) traitent de certaines exigences techniques spécifiques supplémentaires.

Parmi les directives citées ci-dessus, la directive 2004/33/CE (13) présente les exigences concernant les conditions de conservation, de transport et de distribution du sang et de ses composants. Selon le composant sanguin concerné, la température et la durée maximale de conservation sont différentes. Dans le cas des préparations de plaquettes, elles doivent être conservés 5 à 7 jours (7 jours si un système de détection/réduction de la contamination bactérienne est utilisé) à une température comprise entre +20 et +24°C. Le transport doit s'effectuer dans des conditions permettant de respecter l'intégrité du produit tout au long de la chaîne transfusionnelle.

Parmi les autres apports importants de la directive 2004/33/CE (13), on trouve dans l'annexe III les critères d'admissibilité des donneurs à vérifier avant tout don. L'annexe décrit les critères d'acceptabilité et les critères d'exclusion des donneurs de sang total ou de composants sanguins. Les critères d'acceptabilité sont les suivants :

- l'âge et le poids du donneur : de 18 à 65 ans, tout type de don est possible. De plus, le donneur doit peser au moins 50 kg dans le cas d'un don par aphérèse.
- certaines valeurs biologiques suffisamment élevées, notamment :
 - le taux d'hémoglobine : pour les donneurs homologues de sang total et de composants cellulaires, il doit être supérieur à 125 g/l pour les femmes et 135 g/l pour les hommes.
 - le taux de protéines dans le sang : la valeur doit être supérieure à 60 g/l et le dosage doit être effectué au moins 1 fois par an pour les dons de plasma par aphérèse.
 - le taux de plaquettes dans le sang : il doit être supérieur ou égal à $150 \times 10^9/l$ chez les donneurs de plaquettes d'aphérèse.

En parallèle, les critères d'exclusion sont nombreux. Ils peuvent être permanents avec, par exemple, l'interdiction de don pour les patients diabétiques ou les patients ayant une maladie ou des antécédents de maladie du système nerveux central. A l'inverse, une personne peut être temporairement interdite de don dans le cas de situations particulières. Par exemple, un donneur ayant été atteint de fièvre supérieure à 38°C doit attendre deux semaines après la date de disparition des symptômes pour pouvoir donner son sang total ou des composants sanguins.

Ces dispositions réglementaires européennes constituent un minimum. En effet, les États membres peuvent choisir d'appliquer des règles plus strictes concernant la qualité et la sécurité des produits sanguins.

En France, la directive européenne est complétée, entre autres, par l'arrêté du 17 décembre 2019 fixant les critères de sélection des donneurs de sang (20). En complément des dispositions européennes, les donneurs doivent impérativement respecter :

- un intervalle entre les dons : différent selon les types de dons effectués. Pour le don de plaquettes, les dons doivent être séparés par une durée minimum de 4 semaines.
- une fréquence de prélèvements maximale : Sur une période de douze mois, avec une tolérance de quinze jours, le nombre de dons, tout type confondu, est inférieur ou égal à vingt-quatre. Le nombre de dons de concentrés plaquettaires par aphérèse est inférieur ou égal à douze par an pour les hommes et les femmes. Aussi, le nombre d'unités de concentrés de globules rouges prélevés en sang total et/ou en aphérèse est limité à 4 par an pour une femme et 6 par an pour un homme.
- un volume de prélèvement
- des caractéristiques biologiques différentes car plus détaillées, par exemple pour le taux d'hémoglobine minimum où la valeur diffère selon le type de prélèvement.

En France, les modalités de « *collecte, préparation et conservation du sang, de ses composants et des produits sanguins labiles* » sont définies, entre autres, dans le Code de la Santé Publique (CSP) dans le Livre II (*Don et utilisation des éléments et produits du corps humain*), Titre II (*Sang humain*) (21). La traçabilité, l'origine biologique et les étapes d'identification sont garanties et gérées par les procédures du centre de transfusion.

Sur le territoire français, l'organisation des collectes, la préparation, la qualification, la distribution et la délivrance des Produits Sanguins Labiles sont sous la responsabilité de deux organismes : l'Établissement Français du Sang (EFS) et le Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA) (22).

Le CTSA intervient uniquement en milieu militaire et s'occupe de collecter et approvisionner en Produits Sanguins Labiles certains hôpitaux militaires mais aussi lors des opérations extérieures. L'EFS est donc l'acteur majoritaire du don du sang en France. Créé en 2000, c'est un établissement public sous la tutelle du Ministère de la Santé. Il est organisé en 13 établissements régionaux présents sur tout le territoire français (23).

L'ANSM est l'autorité compétente en matière de Produits Sanguins Labiles et incarne l'organisme de contrôle de l'EFS. Elle fixe par décision la liste et les caractéristiques des PSL pouvant être distribués ou délivrés à des fins thérapeutiques après avis de l'EFS (24).

En France, selon la loi du 4 janvier 1993 relative à la sécurité en matière de transfusion sanguine et de médicament (25), le don doit également respecter plusieurs principes fondamentaux : la gratuité, l'anonymat, le bénévolat du donneur et le don doit être exclu de tout commerce (26). Ceci est une particularité française ; les pratiques sont différentes dans d'autres pays. Par exemple, aux États-Unis, le don est rémunéré. Dans une autre forme, en Allemagne, les donneurs sont indemnisés via un montant défini par collecte mais aussi par la couverture de leurs frais de transport jusqu'à la plateforme de don (type EFS). Ceci est permis par la Directive Européenne qui est moins restrictive que la loi française et qui permet aux États membres de prendre "les mesures nécessaires pour encourager les dons volontaires et non rémunérés en vue de garantir que, dans toute la mesure du possible, le sang et les composants sanguins proviennent de ces dons" (27).

Toutes ces dispositions réglementaires permettent ainsi de définir plusieurs éléments clés assurant la sécurisation des dons.

D'une part, un entretien préalable au don a lieu (28). Il permet notamment de faire une sélection via un questionnaire remis au donneur. De plus, toutes les informations nécessaires sont fournies au donneur lors de cet entretien. Cette étape permet de détecter d'éventuelles contre-indications pour le bénéfice de la santé du receveur et du donneur mais aussi de vérifier si le donneur a bien respecté le délai minimum entre 2 dons (29). Par exemple, la prise d'aspirine ou de médicaments influençant les fonctions plaquettaires posent un risque d'inefficacité du concentré plaquettaire et limite ainsi le don.

D'autre part, des analyses biologiques systématiques (Qualification Biologique du Don) sont effectuées sur le don de manière à vérifier l'absence de pathogènes et/ou la qualité du don. Certaines analyses seront faites systématiquement, comme par exemple la détermination du groupe ABO, le phénotypage du système RH et les sérologies (30). Ainsi, en Europe, les

tests suivants (12) doivent être pratiqués sur les dons de sang total ou les dons par aphérèse, y compris les dons de sang autologues par prélèvement préalable :

- groupes ABO et Rh D (sauf pour le plasma destiné uniquement à être fractionné)
- tests de dépistage des infections suivantes chez les donneurs :
 - hépatite B (antigènes HBs)
 - hépatite C (anticorps anti-VHC)
 - VIH I/II (anticorps anti-VIH I/II)

Selon le contexte épidémiologique ou clinique du donneur, d'autres phénotypages ou tests sérologiques pourront être réalisés (VHE, paludisme...). La Qualification Biologique du Don (QBD) est définie également au niveau national dans le Code de la Santé Publique en Section II, chapitre 1^{er}, Titre II, Livre II (31). Elle sera décrite plus tard dans la partie concernant les analyses réalisées sur les concentrés plaquettaires.

Enfin, une vigilance post don est indispensable pour garantir la sécurité des deux acteurs : donneur et receveur. Ainsi, le donneur doit veiller à son état de santé et signalera à l'établissement de transfusion sanguine toute affection/symptôme significatif(ve) ou toute information qu'il a omis de mentionner lors du questionnaire de pré-don (32).

En France, l'ANSM (autorité compétente) est chargée de la surveillance et de l'évaluation des incidents graves, ainsi que des effets indésirables survenant chez les donneurs ou les receveurs de produits sanguins labiles. Cela se fait de la collecte du sang et de ses composants au suivi des receveurs, c'est-à-dire tout au long de la chaîne transfusionnelle. Il s'agit de l'hémovigilance (33). Cette discipline comprend aussi le suivi épidémiologique des donneurs.

La surveillance post-marché des produits sanguins passe tout d'abord par un système de traçabilité robuste permettant de connaître et retrouver le cheminement de chaque produit en cas d'incidents. Les exigences en matière de traçabilité sont définies au niveau européen dans la directive 2005/61/CE (14).

Tout établissement de transfusion sanguine doit mettre en place un système de traçabilité incluant un système d'identification du donneur, de chaque unité collectée et de chaque composant sanguin préparé. De la même manière, tout établissement de santé qui reçoit ces produits doit être doté d'un système d'enregistrement permettant de tracer les unités de sang ou composants sanguins reçues. Toutes les données collectées dans ces établissements sont conservées obligatoirement pendant 30 ans minimum.

Tout ce système mis en place intervient notamment suite à la notification d'effets indésirables ou d'incidents graves. En effet, les établissements de santé ont l'obligation de signaler les effets indésirables (graves ou non) auprès des établissements de transfusion

sanguine. Dans certains cas, il est nécessaire que l'établissement de santé ou de transfusion notifie l'évènement indésirable à l'autorité compétente. Pour cela, des procédures d'enregistrement et de notification doivent donc être mises en place dans ces établissements.

En France, le système d'hémovigilance s'établit à plusieurs niveaux : national, régional et local (33).

Au niveau national, l'ANSM coordonne les actions d'hémovigilance en définissant les orientations et en prenant, si besoin, des mesures appropriées. Elle s'occupe de réceptionner les déclarations d'effets indésirables, d'incidents graves ou toutes les informations relatives à l'ensemble de la chaîne transfusionnelle mais aussi de procéder à des enquêtes épidémiologiques ou des études sur la QBD, le prélèvement, etc... Un autre acteur national est l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), désormais partie intégrante de Santé Publique France, qui coordonne la surveillance épidémiologique des donneurs de sang.

Concernant les niveaux hiérarchiques inférieurs, les Coordonnateurs Régionaux d'Hémovigilance (CRH) présents dans les Agences Régionales de Santé (ARS) et les correspondants locaux d'hémovigilance sont sur le terrain. Ils se chargent notamment de la déclaration des effets indésirables et s'assurent que les décisions de l'ANSM sont mises en œuvre.

Ainsi, tout au long de leur cycle de vie, les éléments sanguins suivent un parcours extrêmement balisé. Ceci assure un niveau minimum de qualité et de sécurité pour le sang qui sert ensuite à la fabrication de concentrés plaquettaires utilisés pour produire du lysat.

B. Processus de fabrication

Il existe de multiples méthodes de production de lysat plaquettaire qui diffèrent selon plusieurs paramètres : formulation/sélection du concentré plaquettaire de départ, taille du pool, processus de lyse des membranes, utilisation d'une méthode d'inactivation virale, etc...

Le lysat plaquettaire est fabriqué à partir de concentrés plaquettaires qui constituent la matière première. La préparation de celle-ci est une étape importante pour garantir un produit de qualité, sûr et efficace. C'est dans un second temps que sera fabriqué le lysat plaquettaire à proprement dit.

NB : Le lysat plaquettaire peut être conditionné sous différentes formes : poches, flacons, cryotubes... Nous allons développer ici la fabrication des poches en matières plastiques spécifiques.

1) Préparation de la matière première

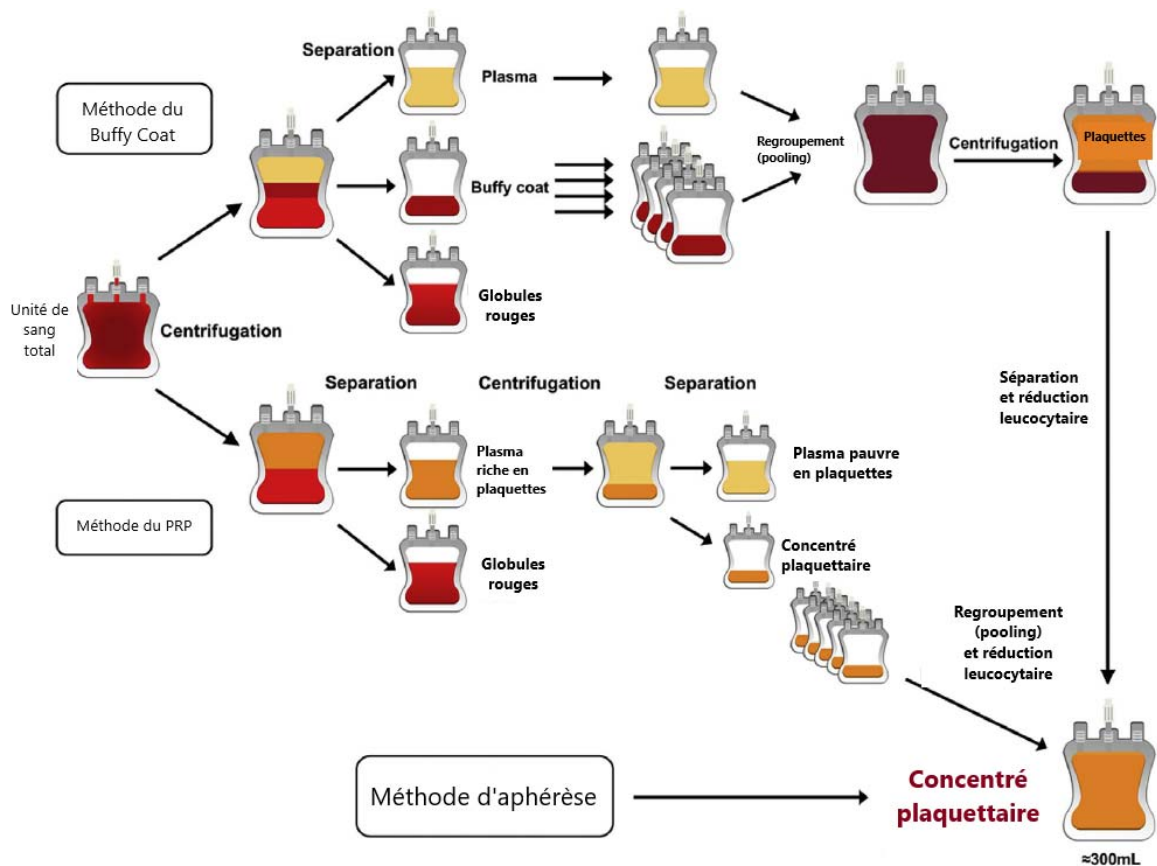


Figure 4 : Différentes modalités de préparation des concentrés plaquettaires (9)

Comme le montre le schéma ci-dessus, le concentré plaquettaire peut être préparé à partir de sang total, en utilisant la couche leuco-plaquettaire (ou Buffy coat) ou le plasma riche en plaquettes (PRP), ou encore à partir de plaquettes obtenues par la technique d'aphérèse. Si on utilise les dons de sang total pour la préparation, on obtiendra des concentrés plaquettaires de type « MCP ». A l'inverse, les CP de type « CPA » seront la matière première résultant de la préparation à partir de la technique d'aphérèse (5).

La technique dite « du Buffy Coat » est la plus largement utilisée en Europe (9). Le Buffy coat ou couche leuco-plaquettaire est une fraction de l'échantillon sanguin centrifugé (34). Comme son nom l'indique, cette couche est composée principalement de leucocytes (globules blancs) et de plaquettes.

Dans cette méthode, on applique donc une grande vitesse de centrifugation sur le sang total de manière à obtenir 3 couches différentes (de haut en bas) : Plasma / Buffy coat / Globules Rouges. Quatre unités de Buffy coat et une de plasma sont alors regroupées puis une seconde étape de centrifugation est nécessaire pour obtenir un concentré de plaquettes (9). Ce dernier est transféré dans une poche de stockage via un filtre de réduction leucocytaire. Cette étape permet d'éliminer la majorité des leucocytes présents dans le concentré plaquettaire. En effet, la présence de leucocytes pourrait entraîner des effets indésirables, et en particulier augmenter le risque d'infection.

La technique, dite « du Plasma Riche en Plaquettes (PRP) », est la méthode la plus utilisée aux États-Unis et en Asie (9). Dans cette méthode, le sang total est centrifugé à une vitesse lente afin de permettre aux plaquettes de se concentrer dans le surnageant, c'est-à-dire le plasma. Ce Plasma Riche en Plaquettes (PRP) est transféré dans une autre poche tandis que les globules rouges sont éliminés. Une centrifugation plus forte permet ensuite d'éliminer la plupart du plasma surnageant (plasma pauvre en plaquettes) et d'obtenir un concentré plaquettaire. Plusieurs CP sont ensuite regroupés puis, de la même manière que la méthode précédente, le passage via un filtre permet la réduction du nombre de leucocytes.

Enfin, la technique d'aphérèse est utilisée dans le monde entier, mais plus particulièrement dans les pays à hauts revenus du fait qu'un automate de haute technologie est nécessaire (9). L'aphérèse est une méthode utilisant un séparateur de cellules de manière à prélever uniquement un composant sanguin d'intérêt. Dans le cas du LP, le prélèvement par aphaérèse via un circuit extracorporel permet de collecter les plaquettes du patient et de lui restituer tout le reste des constituants du sang prélevé.

Actuellement, ceci est le meilleur moyen d'obtenir des plaquettes en grande quantité à partir d'un seul donneur. De plus, grâce à cette méthode, les plaquettes collectées sont moins contaminées par des leucocytes. Il n'est donc pas nécessaire d'ajouter une étape de réduction leucocytaire.

Toutes ces techniques aboutissent à l'obtention de la matière première pour la fabrication du lysat : le concentré plaquettaire.

En France, l'étape supplémentaire de filtration après le don et la préparation de la matière première est systématique depuis la circulaire du 20 février 1998 (35). On l'appelle l'étape de déleucocytation. Comme expliqué précédemment, cette étape consiste donc à éliminer par filtration la majeure partie des globules blancs/leucocytes. Ceci permet la

prévention de l'allo-immunisation HLA, des risques bactériens et de transmissions de virus intra-leucocytaires comme le cytomégalovirus (CMV), l'EBV ou l'HTLV.

La manière dont sont préparés les concentrés plaquettaires a une influence sur son contenu en plaquettes, en leucocytes et en protéines plasmatiques mais aussi et surtout sur la quantité de facteurs de croissance possiblement libérés. Aussi, les plaquettes subissent des changements physiologiques et fonctionnels au moment de leur entreposage, ce qui peut avoir une incidence sur les bienfaits thérapeutiques pour le receveur.

2) Contrôle de la matière première et étape d'inactivation virale

Comme indiqué précédemment, tous les concentrés plaquettaires sont soumis ensuite à la Qualification Biologique du Don (QBD) dans le but d'assurer la sécurisation des dons.

La QBD est d'abord définie au niveau européen. La directive européenne 2002/98/CE (12) liste les exigences de base relatives aux tests pratiqués sur les dons et donneurs de sang total et de plasma. Concernant la sécurité virale, les tests de détection du virus de l'Hépatite B (VHB), de l'Hépatite C (VHC) et des VIH1/2 sont réalisés systématiquement, a minima. Il est également spécifié que des tests additionnels peuvent être réalisés, en fonction du produit sanguin, des donneurs ou de situations épidémiologiques. Par exemple, on peut tester la présence de trypanosomes (parasites) ou encore la syphilis.

En pratique, au niveau national, les tests réalisés sont a minima ceux de la directive (12). A ceux-là s'ajoutent des tests supplémentaires selon les pays. Par exemple, en Allemagne, la loi n'impose pas de tester la présence d'anticorps anti-HTLV-I (anti-virus T-Lymphotrope Humain), à l'inverse de la France. En revanche, dans ce pays, lors de la sélection des donneurs, les personnes infectées par HTLV-I et celles ayant résidé plus de 6 mois dans une zone à risques sont exclues.

En France, la définition de la Qualification Biologique du Don dans le Code de la Santé Publique (36) précise les modalités de sélection des donneurs mais surtout les analyses biologiques et tests de dépistage. Ainsi, la QBD vise à protéger le receveur vis-à-vis des risques liés à la compatibilité immuno-hématologique et aux maladies transmissibles par le sang. De plus, les données collectées lors des analyses biologiques pourront être utilisées dans le cadre d'études de Santé Publique (épidémiologie).

Les analyses biologiques et dépistages sont détaillés dans l'article D.1221-6 du CSP (36). D'une part, la QBD a pour but de caractériser le profil immuno-hématologique du donneur en déterminant leur groupe sanguin dans le système ABO et leur phénotype Rh-Kell. D'autre

part, les anticorps anti-érythrocytaires pouvant avoir une incidence clinique transfusionnelle sont recherchés (anti-A, anti-B, dosage de l'hémoglobine). Enfin, des analyses sont réalisées en vue du dépistage de maladies transmissibles :

- Dépistage sérologique de la syphilis
- Détection de l'antigène HBs
- Détection des anticorps : anti-VIH1, anti-VIH2, anti-VHC, anti-HTLV-I, anti-HTLV-II, antipaludéen (si le donneur a séjourné récemment dans une zone endémique) et anti-HBc

Il convient également de tester le risque lié aux Encéphalopathies Spongiformes Transmissibles (EST) (37). Les EST (ou maladies à prion) sont des maladies neurodégénératives affectant le système nerveux central (cerveau et moelle épinière). Elles touchent certaines espèces animales (bovins, ovins, caprins, félins, visons, cervidés), ainsi que l'Homme. Elles sont provoquées par des agents transmissibles non conventionnels (ATNC), également appelés prions, par opposition aux agents biologiques classiques (bactéries, virus, parasites, moisissures) et il n'existe aucun traitement efficace à ce jour. Il n'existe pas non plus de moyen d'éliminer ce risque (appelé risque TSE/BSE) d'un produit final biologique. Cependant, ceci est possible sur la matière première (uniquement).

Ainsi, pour maîtriser ce risque, l'annexe 3 de la directive 2004/33/CE de la Commission du 22 mars 2004 portant application de la directive 2002/98/CE du Parlement européen et du Conseil concernant certaines exigences techniques relatives au sang et aux composants sanguins (13) précisent les critères d'exclusion permanente pour les candidats à des dons homologues de sang total ou de composants sanguins.

Les critères d'exclusion concernant le risque d'encéphalopathie spongiforme transmissible (EST) sont désignés comme suit :

« Sujets ayant des antécédents familiaux qui les exposent au risque de développer une EST, ou sujets qui ont reçu des greffons de dure-mère ou de cornée ou qui ont été traités par le passé avec des extraits de glandes hypophysaires d'origine humaine. En ce qui concerne la variante de la maladie de Creutzfeldt-Jakob, des mesures de précaution supplémentaires peuvent être recommandées ».

En complément, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a publié des lignes directrices décrivant le risque d'encéphalopathies spongiformes ainsi que des mesures préventives de minimisation de risques (37).

Enfin, des tests de sécurité microbiologique sont également effectués en routine : tests sur la présence d'endotoxines ou de mycoplasmes. Ces tests sont décrits plus bas puisqu'ils s'effectuent de la même manière pour le produit final.

Dans certains centres de transfusion sanguine, une étape d'inactivation virale de la matière première (concentrés plaquettaires) est réalisée. Elle s'inscrit dans les différentes mesures prises ces 20 dernières années pour prévenir le risque de transmission d'agents infectieux lors de l'acte de transfusion. Cependant, cette étape n'est aujourd'hui pas obligatoire.

Il existe plusieurs technologies différentes d'inactivation virale des concentrés plaquettaires. Nous verrons plus tard que cette étape d'inactivation virale est possible également sur le produit fini, le lysat plaquettaire.

Les deux premières technologies décrites ci-dessous ciblent la liaison et l'altération des acides nucléiques par une méthode de photo-activation.

Dans la 1^{ère} technique (**Intercept**®), on utilise une molécule photo-sensibilisante. Il s'agit d'un psoralène synthétique : l'amotosalène (38). Les psoralènes, comme le 8-MOP (8-méthoxypsoralène) ou le TMP (triméthyl-psoralène), sont reconnus pour avoir des effets sur les lésions de la peau et sont utilisés pour traiter plusieurs maladies, comme le psoriasis par exemple. Dans le cas de la méthode Intercept®, cette substance va traverser rapidement les membranes cellulaires, les enveloppes virales et les capsides des noyaux pour s'insérer irréversiblement dans les structures double-brin des acides nucléiques viraux. Après avoir mélangé le concentré plaquettaire à l'amotosalène, la suspension est soumise à une irradiation par des rayons UV de type A (400-315 nm). Ce type d'UV a été choisi en raison de l'effet néfaste (par la création d'espèces réactives à l'oxygène) des types de rayons UV de longueur d'onde plus petite (UV B et UV C). Ceci va bloquer la réplication et la transcription des acides nucléiques.

Cette technique peut être réalisée pour les dons aléatoires mais aussi pour les plaquettes d'aphérèse. Elle agit sur le lysat plaquettaire 100% plasma mais aussi sur les lysats contenant des solutions additives comme SSP+ (par exemple, le LP30). Des études ont montré l'efficacité de l'amotosalène sur les virus, les bactéries (dont les spirochètes), les protozoaires et les lymphocytes. De plus, cette molécule n'a pas d'impact néfaste sur les propriétés des composants du sang. En revanche, Intercept® est moins voire non efficace sur les virus nus (VHA, VHE, Parvo B19) (38).

Cette technique (et le dispositif associé) a obtenu le marquage CE (en 2002 pour son action sur les plaquettes) en tant que dispositif médical de classe III (39). En France, tous les EFS (Établissements Français du Sang) utilisent cette technique pour inactiver les concentrés plaquettaires (40).

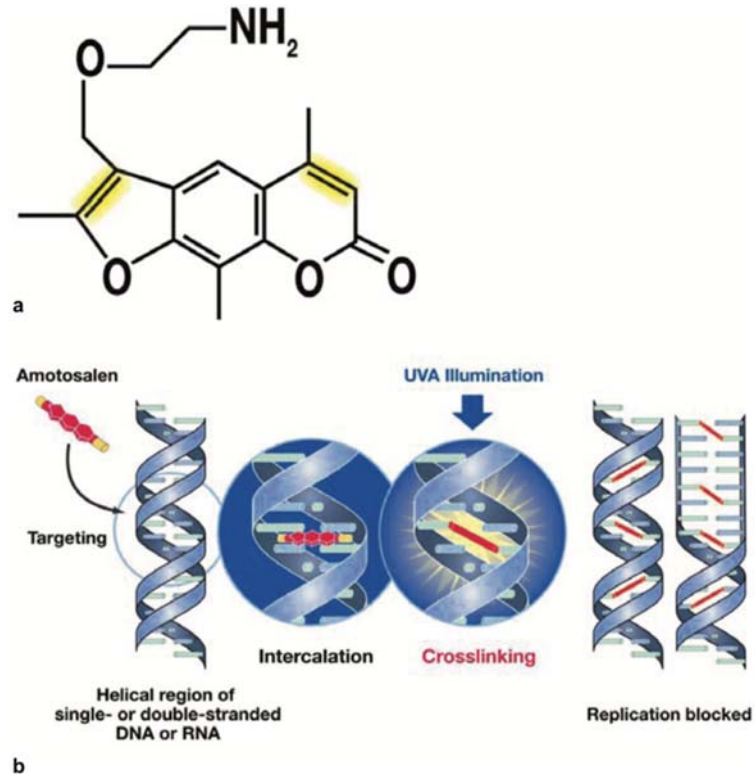


Figure 5 : Méthode INTERCEPT®. a. Structure de l'amotosalène b. Mécanisme d'action de l'amotosalène (38)

La seconde technique (**Mirasol**®) repose sur les mêmes principes. Elle combine de la riboflavine et des radiations UV larges (41).

La riboflavine, ou vitamine B2, est un composant naturel photosensibilisant non toxique et non mutagène, avec un profil de sécurité connu. Sous l'effet des UV, la molécule va générer des espèces réactives de l'oxygène entraînant la rupture des brins d'ADN contenus dans le matériel génétique du virus. Ceci les empêche donc de proliférer et inactive de manière irréversible les pathogènes et les lymphocytes sans porter atteinte aux plaquettes. Inactiver et ainsi inhiber la prolifération des lymphocytes permet également de prévenir le risque de maladie du greffon contre l'hôte associé à la transfusion (TA-GvHD).

Cette technique (et le dispositif associé) a obtenu le marquage CE en tant que dispositif de classe IIB en 2007 (42).

Une autre méthode photochimique utilisant les rayons ultraviolets a obtenu le marquage CE en tant que dispositif de classe IIB : le système **Theraflex-UV Platelets**® (42).

Ce système est basé sur les rayons UV de type C, i.e. de courte longueur d'onde (280-100 nm) et, à la différence des deux autres, n'utilise pas l'addition d'une molécule photosensibilisante (43). Le rayonnement UV appliqué aux concentrés plaquettaires va engendrer le blocage irréversible de la réplication des acides nucléiques des virus, bactéries et parasites. Néanmoins, les propriétés structurales et fonctionnelles des protéines sont conservées.

Des études ont montré que cette méthode n'influence pas la qualité et l'efficacité du concentré plaquettaire. Elle est efficace sur les virus enveloppés/non-enveloppés, les bactéries et les parasites (43). De plus, le fait de ne pas utiliser d'agent photosensibilisant reste un avantage conséquent en termes de sécurité.

Une fois que tous les tests ont été réalisés, l'établissement de transfusion sanguine délivre un certificat de conformité (44). Ce dernier permet de connaître les résultats de chaque analyse mais aussi d'assurer la traçabilité du don. En effet, il comprend le numéro de lot correspondant au numéro du don. Cette traçabilité est importante, notamment en cas de problèmes quand il est nécessaire de remonter jusqu'au donneur.

Une fois que la préparation (+/- inactivation) des concentrés plaquettaires est terminée, ils sont stockés aux alentours de -80 degrés (9).

Comme précisé plus tôt dans l'exposé, c'est lorsque les concentrés plaquettaires ne seront plus adaptés à la transfusion (après 7 jours, conservés à une température entre +20°C et +24°C) qu'ils sont utilisés comme matière de départ pour la préparation des suppléments de milieu de culture (lysate plaquettaire).

3) Fabrication du lysat plaquettaire

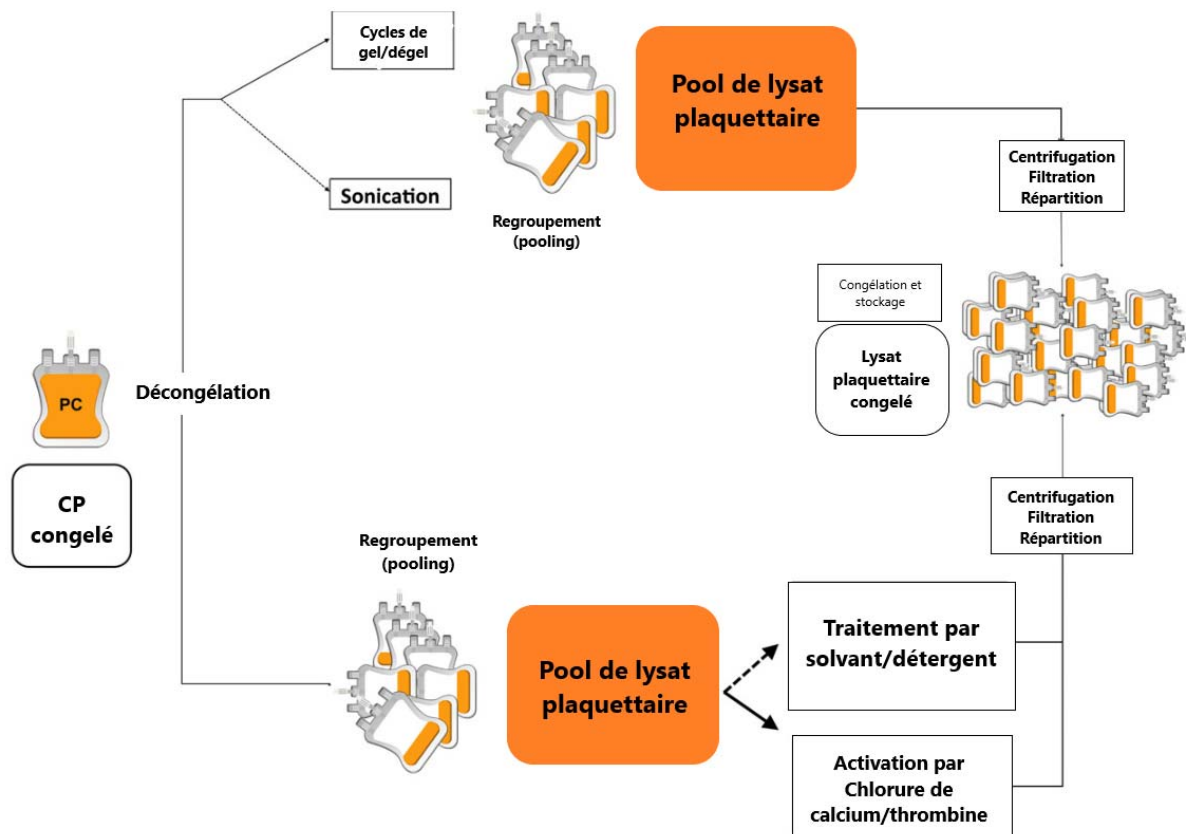


Figure 6 : Mode de préparation du lysat plaquettaire humain (Human Platelet Lysate ou HPL) (45)

A l'arrivée des matières premières sur le site de production, les lots de concentrés plaquettaires sont autorisés à être utilisés après la vérification des certificats de conformité délivrés par les banques de transfusion (44).

C'est à ce moment-là que la fabrication du produit final débute et consiste tout d'abord à décongeler les CP à une température autour de 4°C pendant minimum 24 heures (45). Cette décongélation constitue une première étape de lyse des plaquettes.

Pour induire d'avantage la lyse des plaquettes et la libération de facteurs de croissance, les concentrés plaquettaires peuvent subir une étape supplémentaire de gel/dégel ou de traitement par ultrasons.

La mise en œuvre d'un ou de plusieurs cycles de gel/dégel est la méthode la plus simple de lyser les plaquettes. Le pool de concentré plaquettaire va osciller entre une température de gel (de -30 à -80°C) et une température de dégel (+37°C) durant 2 ou 3 cycles (45). Ceci permet de fragmenter les plaquettes sans porter atteinte à leur contenu en fibrinogène et facteurs de coagulation.

Un traitement par ultrasons peut être effectué seul ou en complément des cycles de gel/dégel (45). Cette autre méthode efficace et rapide va avoir également comme effet la lyse des plaquettes et, par conséquent, le relargage des substances contenues dans les granules plaquettaires.

Les CP individuels lysés sont par la suite regroupés dans une poche de grande taille (plusieurs litres) pour former un pool de lysat plaquettaire (45).

Cette étape de création du pool permet, entre autres, de compenser les variations inter-lots. En revanche, créer un pool augmente le risque de transmissions d'agents infectieux. Il est donc conseillé dans la littérature de limiter la quantité de dons contenus dans un pool. En particulier, il est préconisé de ne pas dépasser 16 dons par pool (46). Dans le cas contraire, des méthodes robustes d'inactivation virale doivent être mises en place.

Si les deux méthodes précédentes (gel/dégel et traitement par ultrasons) ne sont pas utilisées, il existe une 3^{ème} méthode pour lyser les plaquettes. Elle se fait par activation directe des plaquettes et intervient après la formation du pool de lysat plaquettaire.

Cette étape consiste en l'activation directe des plaquettes par du chlorure de calcium (CaCl₂) ou de la thrombine. Ces deux molécules vont conduire à l'activation des plaquettes et, par conséquent, la libération du contenu de leurs granules (45).

Cette étape permet également d'améliorer les caractéristiques du lysat plaquettaire. En effet, le produit final (lysate) peut contenir du fibrinogène ou non. En temps normal, lors de la coagulation, sous l'action combinée de la thrombine III (présente dans le lysate plaquettaire) et du calcium (provenant du milieu de culture), le fibrinogène est clivé en fibrine, protéine participant à la formation d'un caillot sanguin. Le fragment de fibrine s'organise alors pour donner naissance à un réseau piégeant l'eau et les cytokines sous forme d'un hydrogel. En revanche, ce phénomène pose problème puisque cela empêche la culture cellulaire d'être menée à bien. En effet, dans ce cas, le milieu doit être changé régulièrement, et le fait que les cellules soient coincées dans un gel pose des problèmes pratiques pour la manipulation. Pour remédier à cela, le fait d'ajouter du chlorure de calcium permet la liaison au fibrinogène et donc son élimination.

Si cette étape n'est pas réalisée, le lysate contient du fibrinogène. Il est alors nécessaire d'ajouter de l'héparine pour prévenir la gélification et la coagulation du milieu de culture cellulaire.

Enfin, une méthode de traitement par solvant/détergent existe. Elle est utilisée pour les virus à enveloppe lipidique (VIH, VHB, VHC) (47) et accomplit un double objectif : lyse des plaquettes et inactivation virale.

Après toutes ces potentielles étapes de production, le lysat contient encore quelques débris cellulaires dans la poche de pool. Ces derniers sont éliminés lors de l'étape suivante : la filtration. Ceci consiste à faire passer le lysat à travers un filtre de diamètre défini au préalable. Le passage du lysat plaquettaire à travers deux filtres de porosités différentes permet :

- d'éliminer les derniers débris cellulaires présents dans le lysat à l'aide d'un filtre dont le diamètre des pores se trouve entre 10 et 450 μm : c'est une filtration clarifiante (48),
- mais aussi de faire une étape de stérilisation grâce à un filtre dont le diamètre des pores est au maximum égal à 0,22 μm : c'est ce qu'on appelle une filtration stérilisante (48).

Par la suite, le pool de lysat plaquettaire est réparti dans plusieurs poches de plus petites tailles (par exemple 20 poches de 50 ml) puis le produit final est mis en congélation. Dans un premier temps, les poches sont congelées à -40°C ce qui permet de les descendre en température et, dans un deuxième temps, à -80°C pour le stockage (49).

Si le fait d'utiliser du lysat plaquettaire annihile le risque virologique lié au sérum de veau fœtal (supplément standard plus fréquemment utilisé en culture cellulaire), le potentiel risque de contamination virale humaine est toujours présent, et ce malgré la sélection et les tests effectués sur les dons (cf partie A. 3) Réglementation du don). Pour cette raison, il est recommandé de faire une étape supplémentaire d'inactivation virale.

Comme décrit précédemment dans l'exposé, une étape d'inactivation virale peut avoir lieu sur la matière première (concentrés plaquettaire) par des techniques décrites scientifiquement (Intercept[®], Mirasol[®] et Theraflex UV-plaquettes[®]). Or, des virus restent résistants à ces techniques (par exemple, le VIH-1 pour Theraflex UV-plaquettes[®]). De plus, les techniques d'Intercept[®] et Mirasol[®] utilisent des agents intercalants dont la sécurité a été prouvée dans le cadre d'une activité de transfusion mais pas dans l'utilisation en culture cellulaire. En effet, ces agents pourraient, par l'intermédiaire du lysat, entrer dans les cellules réimplantées au patient et provoquer, à long terme, des cancers. Ainsi, dans le but de trouver une alternative à ces méthodes, celle d'inactivation par irradiation de type gamma a été documentée récemment (2019).

Cette étape se fait sur le lysat plaquettaire directement et non sur les concentrés plaquettaire (matières premières). Elle est réalisée dans de la neige carbonique afin d'éviter que les produits ne subissent une décongélation (47).

Cette méthode a été démontrée efficace sur différentes familles de virus (enveloppés, non-enveloppés, virus à ARN ou à ADN, virus simple ou double brin...). De plus, cette technique a l'avantage de ne pas utiliser d'additifs. D'après l'étude de clairance virale publiée dans l'article « *Viral inactivation of human platelet lysate by gamma irradiation preserves its optimal efficiency in the expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells* » (Viau S et al., 2019) (47), l'irradiation gamma n'affecte pas le contenu d'intérêt du lysat : facteurs biochimiques, protéines, albumine, vitamine B12, minéraux, facteurs de croissance. En revanche, l'irradiation gamma a un impact sur la quantité de facteurs de coagulation. Or ces derniers ne sont pas utiles pour la culture cellulaire de cellules mésenchymateuses. Ainsi, le lysat plaquettaire irradié est tout autant efficace que le non irradié en termes de prolifération, de potentiel de différenciation ou de propriétés immunosuppressives sur les cellules souches mésenchymateuses (CSM) (47).

D'autres méthodes d'inactivation virale peuvent être utilisées pendant le procédé de fabrication du lysat plaquettaire, sur le pool de lysat plaquettaire ou sur le produit final.

D'une part, il existe une méthode d'inactivation par irradiation du lysat aux rayons de types UV-C. Ainsi, l'irradiation UV-C est réalisée avec une lumière monochromatique à 254 nm dans le but de cibler particulièrement les acides nucléiques des virus. Cette procédure est très efficace avec les parvovirus et constitue donc une méthode supplémentaire possible pour les étapes d'inactivation virale (50). Pour rappel, une autre technique d'inactivation virale utilise les UV-C (Theraflex-UV Platelets[®]) mais cette fois-ci pour le traitement de la matière première, les concentrés plaquettaires.

D'autre part, la technique de traitement par solvant/détergent (mentionnée plus haut pour son effet sur la lyse des plaquettes) est aussi utilisée comme méthode d'inactivation virale. Cette dernière est utilisée et a fait ses preuves en termes d'efficacité et sécurité depuis de nombreuses années. Or, son utilisation et son efficacité dans l'inactivation virale a été démontrée sur les virus enveloppés (lipidiques) mais pas sur les virus non-enveloppés (47). Ceci suggère la nécessité d'ajouter une étape supplémentaire d'inactivation virale.

Enfin, il est aussi possible de faire une nanofiltration pendant le procédé de fabrication (51). Ceci consiste tout simplement à faire passer le lysat plaquettaire à travers un filtre de porosité 0.001 micromètres environ. Ce type de filtration permet d'éliminer la majorité des molécules organiques et la quasi-totalité des virus et bactéries.

NB: si on utilise une méthode d'inactivation virale, il est impératif de faire une étude de clairance virale pour prouver son efficacité et évaluer l'innocuité du lysat plaquettaire.

4) Contrôles du produit fini

Des contrôles appropriés sont réalisés sur le lysat plaquettaire. Certains ont lieu pendant la fabrication du lysat pour veiller à ce que le procédé de fabrication soit sous contrôle et produise de manière reproductible le produit de qualité définie. D'autres tests dits « de libération » permettent de vérifier les caractéristiques du produit final (lysat plaquettaire) à la fin de sa production.

On trouve dans le chapitre général 5.2.12 de la Pharmacopée Européenne (52) la liste des tests pouvant être réalisés sur les matières premières d'origine biologique utilisées pour la production des médicaments de thérapie cellulaire ou génique.

L'identité, la pureté et l'activité biologique du lysat plaquettaire doivent répondre à des critères de qualités prédéfinis. Voici une liste non exhaustive des contrôles pouvant être effectués :

- **Tests d'identification :**

- Aspect du lysat plaquettaire :

Cet essai permet de mettre en évidence d'éventuelles impuretés insolubles présentes dans le lysat plaquettaire. Il peut comporter les tests suivants : test du degré d'opalescence, test de turbidité...

L'opalescence est la propriété optique d'un matériau transparent qui lui donne un aspect ou une teinte laiteuse, avec des reflets irisés. Le lysat plaquettaire ne doit pas être opalescent, il doit être limpide. De la même manière, la turbidité est l'opacité d'un liquide causée par des particules en suspension. Si des particules sont présentes dans le lysat, elles diffusent la lumière incidente et le liquide perd sa transparence. Plusieurs techniques de mesure existent pour ces deux tests. La différence entre les deux tests réside dans le fait que le test de turbidité est quantitatif, à l'inverse du test d'opalescence qui est qualitatif.

- Mesure de l'osmolalité (selon le chapitre 2.2.35 de la Ph.Eur.) :

L'osmolalité est la mesure du nombre total d'entités chimiques par kilogramme de fluide (solvant). Il s'agit donc d'une indication de la pression osmotique du lysat plaquettaire. Elle se mesure par des formules de calcul (mesure de l'abaissement du point de congélation) ou, par exemple, à l'aide d'un osmomètre. Il est nécessaire de vérifier que la valeur de l'osmolalité est comprise dans les limites de la normale.

- Détermination du pH (selon le chapitre 2.2.3 de la Ph.Eur.) :

Le pH est la concentration en ions hydrogène d'une solution. Selon la Pharmacopée Européenne, la mesure du pH se fait par potentiométrie, c'est donc une mesure expérimentale. Ainsi, on mesure la différence de potentiel entre 2 électrodes plongées dans le lysat plaquettaire dont le pH est à évaluer.

- Dosage des protéines totales (selon le chapitre 2.5.33 de la Ph.Eur.) :

Il existe de nombreuses méthodes de dosages des protéines totales, dont sept sont décrites dans la Pharmacopée Européenne. Parmi ces techniques, il existe la méthode appelée « à l'acide bicinchoninique » (BCA). Elle se base sur le fait que les protéines réduisent l'ion cuivrique (Cu^{2+}) en ion cuivreux (Cu^{3+}) qui sont détectés grâce au réactif BCA. On mesure ensuite l'absorbance grâce à un spectrophotomètre, ce qui nous permet, par relation linéaire et par rapport à une droite d'étalonnage, de déterminer la teneur en protéines.

Une autre méthode utilisée est la méthode de Bradford. Elle repose sur la propriété que possèdent les protéines à déplacer le maximum d'absorption du bleu acide (470 nm à 595 nm) lors de la liaison au colorant. En mesurant l'absorbance et en comparant à une protéine de référence, on peut alors déterminer le taux de protéines totales dans le lysat plaquettaire.

- Contrôles microbiologiques :

Pour assurer la sécurité microbiologique du lysat plaquettaire, il est nécessaire de réaliser des tests de stérilité (selon le chapitre 2.6.1 de la Ph.Eur.) ainsi qu'une étape de suivi de la biocharge.

Le test de stérilité doit être réalisé sous conditions aseptiques. Pour cela, l'environnement doit être contrôlé et les précautions prises pour éviter une contamination microbienne ne doivent pas affecter les microorganismes recherchés. De plus, des prélèvements réguliers doivent être effectués pour vérifier le maintien de ces conditions et un milieu de culture convenant à l'essai de stérilité doit être utilisé.

L'essai de stérilité peut se faire par 2 méthodes : par filtration sur membrane ou par ensemencement direct du milieu de culture. Ces deux techniques comprennent des périodes d'incubation permettant la prolifération microbienne (si des microorganismes sont présents). Une détection visuelle de la contamination microbienne permettra de déterminer si le lysat plaquettaire satisfait à l'essai.

En parallèle, l'évaluation de la biocharge consiste à quantifier la flore microbiologique totale (germes aérobies et anaérobies, moisissures, levures) du lysat plaquettaire. La stérilisation n'étant qu'une opération qui permet de réduire le nombre de microorganismes, la stérilité du produit fini dépend du nombre de microorganismes présents avant la stérilisation. C'est pourquoi, selon l'annexe 1 des Bonnes Pratiques de Fabrication, la biocharge doit être mesurée avant la stérilisation afin de définir les limites de travail.

Il n'existe pas de chapitre spécifique dans la Pharmacopée Européenne mais en général, les essais sont réalisés selon le chapitre 2.6.12 « Contrôle microbiologique des produits non stériles ». Cet essai se fait par filtration membranaire et permet le dénombrement des espèces microbiennes.

- Recherche d'endotoxines bactériennes (selon le chapitre 2.6.14 de la Ph.Eur.) :

L'essai des endotoxines bactériennes consiste à détecter ou quantifier les endotoxines produites par les bactéries GRAM négatif. Ceci se fait au moyen de Lysat d'Amoebocytes de Limules, c'est la méthode dite « LAL ». Il peut être réalisé par différentes méthodes : gélification (induction de la formation d'un gel), turbidimétrie (développement d'une turbidité par clivage d'un substrat endogène) ou colorimétrie (développement d'une coloration par clivage d'un complexe peptide-chromogène synthétique).

- Recherche de mycoplasmes (selon le chapitre 2.6.7 de la Ph.Eur.) :

L'essai de recherche des mycoplasmes se fait par culture cellulaire. On utilise donc un milieu de culture (liquide ou solide) ayant des propriétés nutritives suffisantes à la croissance de ces microorganismes (MO). Après une période d'incubation, on vérifie tout d'abord l'absence de substances qui pourraient inhiber la croissance des MO et ainsi fausser la recherche. On ensemence alors les milieux de culture avec le lysat plaquettaire puis on laisse incuber pendant un temps défini. Les milieux sont ensuite observés au microscope afin de vérifier qu'aucune colonie typique de mycoplasmes est présente. Si c'est le cas, le lysat plaquettaire satisfait l'essai.

▪ **Test de performance :**

Ce test de performance permet de vérifier l'effet sur les cellules souches mésenchymateuses. Pour cela, on teste l'influence du lysat plaquettaire sur l'expansion des cellules.

▪ **Contamination virale (selon le chapitre 5.1.7 de la Ph.Eur.) :**

La fabrication du lysat plaquettaire utilise des matières d'origine humaine, il est donc nécessaire de contrôler sa sécurité virale. Le chapitre 5.1.7 de la Pharmacopée Européenne décrit des exigences générales sur cette sécurité virale. Dans le cas du lysat plaquettaire, le risque de contamination virale existe. Il est donc nécessaire de prendre des mesures complémentaires, à savoir :

- Sélectionner des matières sources et rechercher de contaminants viraux : dans le cas du lysat, ceci est contrôlé par la sélection des donneurs mais aussi par la Qualification Biologique du Don qui recherche de nombreux virus et bactéries (selon la réglementation française).
- Contrôler la capacité du procédé de fabrication à éliminer et/ou inactiver les virus : ceci est le cas pour le lysat plaquettaire. En effet, comme vu précédemment, plusieurs méthodes d'inactivation existent, que ce soit au niveau des concentrés plaquettaires ou au niveau du produit final (lysat).
- Rechercher une contamination virale aux étapes de production appropriées : ceci est tout d'abord effectué sur la matière première dans le cadre de la Qualification Biologique du Don. La contamination virale peut aussi être vérifiée sur le produit final.

▪ **Dosage des cytokines :**

Les principales cytokines présentes dans le lysat plaquettaire, à savoir bFGF, EGF, VEGF, IGF1, PDGFAB, TGF-beta1 sont dosées. Ceci est effectué dans le but de vérifier la reproductibilité de tous les lots.

A la fin du processus de fabrication et après avoir réalisé tous ces tests, le site de production industriel délivre un certificat d'analyse prouvant la conformité du lysat plaquettaire et permettant la libération des lots. Ce certificat est fourni aux clients qui achètent le lysat.

C. Différents types de lysat plaquettaire

Le mode de fabrication décrit ci-dessus donne lieu à l'obtention d'un lysat plaquettaire « classique ». Pour plusieurs raisons, et notamment des intérêts Marketing, certaines entreprises ont développé leur produit pour varier les caractéristiques du lysat.

Ainsi, il existe actuellement sur le marché plusieurs types de lysats ayant des attributs différents selon les laboratoires qui les commercialisent. Le lysat plaquettaire peut différer au niveau :

- De sa composition
- Du fait d'être inactivé ou non
- De sa conformité avec les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF)
- De l'ajout nécessaire ou non d'héparine lors de son utilisation

1) Définition selon sa composition

Concernant la composition, il existe des lysats différents en fonction de leur richesse en plasma : le LP30 et le LP100.

| | LP30 | LP100 |
|---|------------|-------------|
| Quantité de plasma | 30% | 100% |
| Quantité de solution additive | 70% | |
| Origine des CP utilisés pour la fabrication | Buffy coat | Aphérèse |

Tableau 1 : Deux lysats plaquettaires de compositions différentes

Le LP30 est un lysat plaquettaire composé de 30% de plasma et de 70% de solution additive tandis que le LP100 est composé de 100% de plasma. Une autre différence entre ces deux produits est l'origine de leur matière première. En effet, le LP30 est issu de concentrés plaquettaires obtenus à partir de Buffy coat, à l'inverse du LP100 dont les CP proviennent de dons d'aphérèse.

Ces produits présentent des caractéristiques et une efficacité différente sur la prolifération cellulaire. Ainsi, les protéines sont sur-exprimées dans le LP100 puisqu'il contient 3 fois plus de plasma que le LP30 (53).

2) Définition en fonction de sa potentielle inactivation

Un autre type de lysat plaquettaire a été développé suite à la parution d'un nouveau chapitre général de la Pharmacopée Européenne.

La Pharmacopée Européenne (52) est la référence juridique et scientifique en matière de normes de pharmacopée en Europe. Elle est préparée et publiée par la DEQM (Direction Européenne de la Qualité du Médicament et soins de santé) et s'applique aux 37 États membres de l'Union Européenne. Les normes officielles qui y sont publiées fournissent une base juridique et scientifique au contrôle de la qualité pendant les processus de développement, de production et de commercialisation. Elle contribue à assurer l'accès à des médicaments de qualité sur l'ensemble du continent (54).

Actuellement, la Pharmacopée Européenne en vigueur est la 10^{ème} édition. L'édition précédente, la 9^{ème}, a été publiée mi-2016 et mise en application en janvier 2017. Dans cette 9^{ème} édition, des chapitres généraux sont apparus, notamment le chapitre 5.2.12 concernant les « Matières premières d'origine biologique utilisées pour la production de médicaments à base de cellules et de médicaments de thérapie génique ».

Ce chapitre 5.2.12 de la Pharmacopée Européenne stipule :

« En raison du risque inhérent de transmission d'agents infectieux d'un mélange de plasma, d'un mélange de sérums, ou d'autres dérivés de mélanges de sang ou de plasma allogénique humain, il convient d'envisager une limite du nombre de dons composant un même mélange, sauf si des méthodes suffisantes d'inactivation/élimination des virus sont appliquées, le cas échéant, en cours de production. »

Aussi, elle insiste sur les méthodes à mettre en place durant la production :

« Le procédé de production est optimisé pour réduire à un minimum et/ou éliminer de façon reproductible les agents étrangers et les impuretés nocives, tout en conservant la qualité de la matière première. On peut pour ce faire utiliser une ou plusieurs des mesures suivantes :

- Utilisation de procédures validées d'inactivation ou d'élimination comme une stérilisation gamma ou une chromatographie à pH faible si possible.*
- Démonstration de la capacité d'un procédé de production à réduire, éliminer ou inactiver des agents étrangers ou des impuretés nocives.*
 - Recherche d'agents étrangers ou d'impuretés nocives. »*

Ainsi, ce chapitre 5.2.12 de la Pharmacopée Européenne recommande l'addition d'une étape d'inactivation virale pendant le processus de fabrication de tous les produits ayant le statut de « Raw biological material », i.e. matière première biologique utilisé pour les médicaments de thérapie innovante (MTI) ou les préparations de thérapie cellulaire (PTC).

C'est pourquoi certaines entreprises ont développé des lysats plaquettaires inactivés. Pour ce faire, ils utilisent une méthode parmi celles existantes pour l'inactivation virale. Ces méthodes d'inactivation, décrites plus tôt dans l'exposé, peuvent intervenir à deux niveaux : soit sur la matière première du lysat plaquettaire, les concentrés plaquettaires (Intercept®, Mirasol®, Theraflex-UV Platelets®), soit sur le lysat plaquettaire directement par irradiation gamma, par la méthode solvant/détergent, etc... De plus, la recherche d'agents infectieux transmissibles sera faite *a priori* (sur les dons) mais aussi *a posteriori* (sur le lysat), par différents tests, comme par exemple la recherche d'endotoxines par la méthode LAL (Lysat d'Amaebocytes de Limule) décrite dans la partie « Contrôles ».

Le lysat plaquettaire peut également différer en fonction de ses conditions de fabrication. En effet, le lysat ayant un statut de « raw material » (matière première), il ne doit pas être obligatoirement produit selon les Bonnes Pratiques de Fabrication qui, elles, encadrent la fabrication du médicament. Or, ce référentiel garantit une fabrication et un contrôle cohérent des produits et selon les normes de qualité adaptées à leur emploi. C'est donc un gage de qualité pour le produit, attribut pouvant être recherché pour le lysat plaquettaire. Ainsi, certains lysats sont revendiqués comme conformes aux BPF.

Enfin, il existe un lysat dit « heparin free » (sans héparine). Ce type a été développé en raison de la présence de fibrinogène dans le lysat plaquettaire. En effet, comme expliqué plus tôt dans l'exposé, en présence de calcium et/ou de thrombine, le fibrinogène contenu dans les plaquettes, et *a fortiori* dans le lysat plaquettaire, est clivé en fibrine et forme un caillot. Ceci entraîne la gélification du milieu de culture et ainsi des difficultés pratiques pour la manipulation des cellules. Pour éviter ce désagrément, les laboratoires qui commercialisent un lysat « classique » recommandent l'ajout d'héparine au milieu de culture. Cette molécule agit en tant qu'anticoagulant et permet d'éviter la gélification du milieu.

Cependant, depuis quelques années, l'utilisation d'héparine soulève des préoccupations d'ordre éthique en raison de l'origine animale de l'héparine (mammifères). Pour répondre à cet enjeu sanitaire, le lysat plaquettaire sans héparine (« heparin free ») a été développé. Ainsi, pour éviter l'utilisation d'héparine, le lysat plaquettaire est mis en présence de calcium durant son procédé de fabrication. Cette méthode engendre la précipitation de la fibrine puis cette dernière est éliminée avant de mettre en contact le lysat plaquettaire avec le milieu de culture.

D. Utilisation du lysat plaquettaire

1) Usage scientifique en tant que supplément de milieu de culture

Actuellement, le lysat plaquettaire est utilisé en culture cellulaire en tant que supplément de milieu de culture dans le cadre de la production de MTI (Médicament de Thérapie Innovante), de PTC (Préparations de Thérapie Cellulaire) ou dans la recherche. Les différents statuts réglementaires associés à ces utilisations seront détaillées dans la 2^{ème} partie.

Le but de l'utilisation de lysat plaquettaire est de favoriser l'expansion ex-vivo de différents types cellulaires. Son utilisation est validée dans la croissance des cellules souches mésenchymateuses mais de nombreuses études montrent son efficacité dans d'autres types cellulaires (2).

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) sont les cellules les plus communément utilisées dans les thérapies cellulaires. Elles ont la capacité de différencier plusieurs lignées, donnant naissance à une variété de phénotypes mésenchymateux tels que les ostéoblastes (os), les adipocytes (graisse), et les chondrocytes (cartilage). Leur caractère multipotent (capacité à se différencier en plusieurs types cellulaires) permet leur utilisation allogénique et en fait ainsi une cible attrayante pour le développement des thérapies cellulaires (3). Ces cellules sont des cellules souches adultes ayant un potentiel de différenciation et de migration multi-lignage mais aussi des propriétés d'orientation. De plus, leurs propriétés immunosuppressives et le profil de sécrétion des facteurs trophiques ont également conduit à un nombre croissant d'essais cliniques de thérapie cellulaire utilisant des CSM.

Ainsi, elles peuvent être utilisées à des fins de médecine régénérative, d'ingénierie tissulaire ou dans les traitements des maladies immunitaires ou inflammatoires.



Figure 7 : Diversité des activités biologiques exercées par les cellules souches mésenchymateuses (55)

Actuellement, les applications les plus courantes sont :

- le traitement des maladies osseuses et la réparation du cartilage,
- le contrôle de la réaction du greffon contre l'hôte et la facilitation de la greffe de moelle osseuse,
- le traitement de l'infarctus du myocarde.

Dans toutes ces situations, l'utilisation des CSM nécessite une phase d'isolation et d'expansion ex-vivo indispensable à l'obtention d'un nombre significatif de cellules. En effet, les CSM sont en faible nombre dans les tissus où elles sont présentes : moelle osseuse, sang de cordon, tissu adipeux... Il est donc nécessaire d'avoir cette phase de multiplication cellulaire pour obtenir une dose appropriée pour une application clinique.

Cette phase doit répondre à des exigences strictes de qualité et de sécurité (conformité aux BPF), notamment concernant le milieu de culture utilisé. Ce dernier est alimenté par de nombreux nutriments, enzymes, protéines et facteurs de croissance. C'est lors de cette étape que sont utilisés les suppléments de milieu de culture, et notamment le lysat plaquettaire.

2) Usage thérapeutique potentiel

En plus de son utilisation pour la phase d'expansion in-vivo des CSM, l'efficacité du lysat plaquettaire a été démontrée sur la croissance de nombreux autres types cellulaires : les fibrochondrocytes du ménisque, les ostéocytes, les myocytes, les cellules endothéliales de la cornée... Ceci suggère une grande variété d'applications cliniques potentielles dans le domaine de la médecine régénérative. Dans ce contexte, le schéma ci-dessous montre les nombreuses perspectives cliniques actuelles autour du lysat plaquettaire.

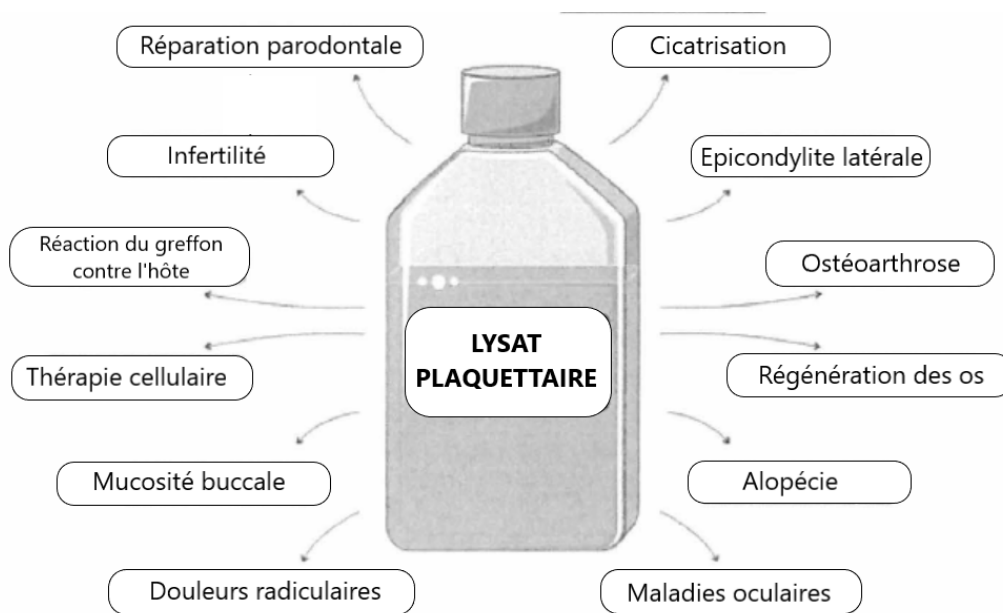


Figure 8 : Applications cliniques potentielles du lysat plaquettaire en médecine régénérative et thérapie cellulaire (2)

Parmi les possibilités ci-dessus, j'ai choisi de développer brièvement deux applications cliniques potentielles : l'ostéoarthrite et le traitement de l'alopecie.

Tout d'abord, l'ostéoarthrite ou arthrose est une maladie du cartilage (56). Elle peut être vue de différentes manières :

- Soit comme une usure du cartilage : ceci est visible par des microfractures et a pour conséquence l'amincissement du cartilage et la diminution de l'amortissement des pressions exercées par l'articulation lors d'un mouvement.
- Soit comme une pathologie globale de l'articulation affectant tous ses tissus et entraînant inflammation, destruction du cartilage et problèmes au niveau de l'os.

Cette maladie entraîne une perte de mobilité, des douleurs importantes mais aussi une diminution de la qualité de vie. Le stade ultime de la maladie est caractérisé par une opération du genou nécessaire avec pose de prothèse.

De nos jours, la prise en charge de cette maladie s'oriente principalement vers la prévention de la douleur et de la maladie (anti-inflammatoires, antalgiques, attelles de repos...). Il existe également un traitement de visco-supplémentation qui consiste à injecter de l'acide hyaluronique au sein de l'articulation (57).

Dans le même esprit que pour le traitement de visco-supplémentation, des études ont été menées avec du lysat plaquettaire injecté directement dans l'articulation du genou chez des chevaux (2). Cette méthode a montré des résultats encourageants dans l'amélioration des symptômes de cette maladie.

Un autre usage thérapeutique potentiel concerne le traitement de l'alopecie chez l'Homme (2). L'alopecie est définie comme la perte de cheveux ou de poils sur le corps. Elle pose des problèmes esthétiques et psychologiques mais peut également être le reflet d'une maladie systémique.

La cause la plus fréquente est l'alopecie androgénétique (58). C'est une affection héréditaire qui concerne jusqu'à 80% des hommes à l'âge de 70 ans. Les autres causes fréquentes sont : les médicaments (chimiothérapies par exemple), les infections, les troubles systémiques ou les traumatismes.

Certaines causes d'alopecie sont difficiles à traiter. Dans ce contexte, des études ont été réalisées sur l'utilisation du lysat plaquettaire dans le traitement de l'alopecie. Les résultats montrent que les régions traitées avec du lysat présentent un taux de croissance des follicules pileux plus élevé (2). Ces résultats sont encourageants. Cependant, des preuves et des études cliniques supplémentaires sont nécessaires pour affirmer d'avantage le potentiel du lysat dans cette thérapie ainsi que pour rechercher les potentiels effets indésirables.

3) Comparaison vis-à-vis du sérum de veau fœtal (SVF)

Historiquement, la phase d'expansion cellulaire ex-vivo utilise des dérivés d'origine animale en tant que supplément de milieu de culture. En effet, on utilise du Sérum de Veau Fœtal (SVF), aussi appelé sérum fœtal bovin (FBS ou *Fœtal Bovine Serum* en anglais), qui représente une fraction du sang du fœtus de la vache. Comme tout sérum sanguin, il s'agit du liquide surnageant obtenu après coagulation et centrifugation du sang. Il est dépourvu de cellules et de protéines de la coagulation, mais contient en revanche un certain nombre de facteurs (protéines, hormones, ions...) propices à la croissance cellulaire (59). Ainsi, à l'inverse du plasma, le sérum contient une grande variété de facteurs de croissances, des

cytokines et des chimiokines dérivées de la coagulation sanguine et libérées par les plaquettes physiologiquement activées. Ceci permet son efficacité pour la pousse des cellules en culture cellulaire.

Cependant, si le Sérum de Veau Foetal (SVF) a toujours été le « gold standard » pour l'étape d'expansion ex-vivo, des suppléments de milieu de culture « humanisés » tendent à le remplacer pour différentes raisons. Ceci devient de plus en plus important dans un contexte de croissance de la médecine régénérative et de la thérapie cellulaire, pour lesquels le SVF devrait être évité, conformément à certaines guidelines internationales (60).

Tout d'abord, la principale différence entre ces deux suppléments de milieu culture réside dans leur origine. En effet, le lysat plaquettaire provient de dons de sang humain alors que le sérum de veau foetal, comme son nom l'indique, est d'origine animale.

De plus, il existe des différences de composition entre ces deux suppléments de milieux de culture. En effet, le lysat plaquettaire contient plus d'immunoglobulines que le SVF et peut contenir du fibrinogène et des facteurs de coagulation (si l'étape d'activation de la thrombine ne fait pas partie de son procédé de fabrication) (9). De plus, la composition du lysat plaquettaire est bien décrite scientifiquement.

Pour prévoir un remplacement du SVF par le lysat, des études ont été réalisées et ont pu comparer le SVF au lysat plaquettaire humain. Ces études ont démontré que le lysat présente des résultats au moins aussi voire plus élevés que le SVF dans certaines catégories comme la croissance de CSM provenant de la moelle osseuse ou des tissus adipeux (61).

Un autre avantage non négligeable du lysat est le fait que sa production ne présente aucun risque de rupture de stock (9). Cet avantage est un paramètre à prendre en compte en raison de la demande croissante d'essais cliniques autour de la thérapie cellulaire. En effet, comme vu précédemment, le lysat plaquettaire peut être préparé à la fois à partir de don sang total mais aussi de don d'aphérèse. De plus, les concentrés plaquettaires non utilisés pour la transfusion (en raison de leur durée de conservation) représentent une autre source pour la production de lysat. Ainsi, il existe actuellement un volume important de matière première pour la production de lysat, ceci diminuant grandement le risque de rupture de stock de lysat plaquettaire.

A l'inverse du lysat plaquettaire, le SVF est un produit mal défini et sa composition complexe est encore mal connue (9). En effet, le contenu du sérum de veau foetal en cytokines et facteurs de croissance est très peu décrit, contrairement à celui du lysat plaquettaire. Les

facteurs suivants sont présents en plus grande quantité que les autres facteurs de croissance : PDGF-AB, IGF1 et BDNF. Dans le sérum de veau fœtal, on trouve des protéines et lipides de haut et bas poids moléculaires mais leur teneur varie entre les lots.

Outre sa composition complexe et mal connue, le SVF présente une grande variabilité dans sa composition (55). En effet, la production du Sérum de Veau Fœtal est dépendante de nombreux facteurs externes, comme par exemple les conditions météorologiques (sécheresse, inondations...), les zones géographiques ou encore les changements dans la consommation bovine (passage à la volaille). De plus, la grande variabilité inter-lots et inter-fournisseurs (en raison de la non standardisation du processus) pose problème pour obtenir un produit de qualité reproductible et dont les propriétés sont constantes.

En complément des inconvénients ci-dessus, une des principales raisons pour laquelle l'utilisation du Sérum de Veau Fœtal en culture cellulaire a été remise en question concerne les risques potentiels de sécurité sanitaire.

D'une part, malgré les efforts pour éliminer les protéines bovines du SVF, il reste des composants résiduels (comme par exemple, les structures immunogènes des xéno-glucides) qui peuvent induire des **réactions immunitaires** aux cellules lors de leur injection chez le receveur. De plus, les cellules internalisent les protéines xénogéniques en grande quantité, ce qui accroît le risque de réactions allergiques et immunologiques.

D'autre part, un problème de sûreté à prendre en compte concerne les **infections zoonotiques associées** à l'utilisation du SVF. En effet, plusieurs infections dues à des agents pathogènes animaux ont été recensés récemment : VIH, Ebola, Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS) lié au coronavirus, encéphalopathies spongiformes... L'occurrence de toutes ces maladies ont conduit l'OMS et l'EMA à émettre des restrictions sur l'utilisation des matières d'origine bovine via différents guidelines (62,63). Ces lignes directrices énumèrent notamment les tests de sécurité virale et bactériologique mais aussi suggèrent des mesures de minimisation du risque lié aux matières bovines.

Pour finir, le SVF est concerné par des préoccupations d'ordre éthique relatives au bien-être des animaux. En effet, la collecte du sérum chez le fœtus pourrait engendrer une certaine souffrance chez l'animal (59). Bien que des recommandations aient été faites à ce sujet, il n'y a que peu d'indications qui prouvent qu'elles soient appliquées.

Dans ce contexte et dans le but d'éliminer tout composant d'origine animale, les tentatives réalisées pour créer un milieu de culture chimiquement défini ont échoué. Ainsi, l'utilisation du sang humain paraît la solution la plus pragmatique et sûre pour substituer le SVF.

II. Réflexion autour des statuts et autorisations pour le lysat plaquettaire selon son utilisation

A. Usage en tant que supplément de milieu de culture

1) Usage en recherche

Actuellement, le lysat plaquettaire est utilisé en tant que supplément de milieu de culture dans le cadre de recherches scientifiques et tend à remplacer le sérum de veau fœtal, produit standard utilisé en culture cellulaire. Par exemple, hormis son utilisation pour la croissance des cellules souches mésenchymateuses (CSM), le lysat plaquettaire a démontré son efficacité pour de nombreux autres types de cellules comme les myocytes (64). Ainsi, le lysat plaquettaire n'a ni le statut de médicament ni de dispositif médical.

De manière générale, la recherche scientifique et médicale est très réglementée. Entre autres, la loi n°2012-300 du 5 mars 2012 (65) relative aux recherches impliquant la personne humaine (ou Loi Jardé) a permis d'apporter un cadre juridique harmonisé et un socle réglementaire pour toutes les catégories de recherche. Par conséquent, tout organisme exerçant de la recherche doit se soumettre à plusieurs obligations d'un point de vue légal et réglementaire. Dans ce cadre, la recherche en biologie, médecine et santé nécessite couramment l'utilisation d'échantillons biologiques humains, pour la plupart issus de soins hospitaliers. Par définition, on entend par échantillons biologiques humains les tissus, cellules et produits issus du corps humain (65).

En vue de cette utilisation, la loi française (66) prévoit la possibilité qu'un organisme puisse exercer les activités de préparation ou conservation d'échantillons biologiques humains pour les besoins de ses propres programmes de recherche ou encore en vue de cession à d'autres organismes pour leur usage de recherche. Cela s'applique donc au lysat plaquettaire puisqu'il provient d'échantillons biologiques humains, à savoir les dons de sang.

En novembre 2017, le décret d'application de la Loi Jardé (67) relatif à la conservation et à la préparation à des fins scientifiques d'éléments du corps humain a été publié et s'adresse aux différents organismes souhaitant exercer une des activités ci-dessous. Par « éléments du corps humain », ces textes visent les organes, les tissus, les cellules, les lignées cellulaires, le sang et ses composants et dérivés, y compris l'ADN, l'ARN, les protéines...

Les démarches suivantes sont à effectuer uniquement si l'activité n'est pas envisagée dans le cadre d'une recherche impliquant la personne humaine (68). Ceci est le cas pour le lysat plaquettaire puisqu'il sert de supplément pour les milieux de culture utilisés pour faire pousser des cellules dans le cadre d'essai clinique de thérapie cellulaire mais il n'est donc pas directement utilisé chez l'Homme.

Pour un usage de recherche scientifique (non sur la personne humaine), l'organisme doit effectuer différentes démarches selon l'activité concernée :

- Les activités de conservation et de préparation à des fins scientifiques de tissus et de cellules issus du corps humain pour les besoins propres des programmes de recherche de l'organisme doivent faire l'objet d'une **déclaration préalable** auprès du Ministère de la Recherche (69) ou, s'agissant des établissements de santé, auprès du directeur de l'Agence Régionale de Santé (ARS) ou, s'agissant des hôpitaux d'instruction des armées, auprès du Ministère de la Défense.
- Les activités de conservation et de préparation à des fins scientifiques de tissus et de cellules issus du corps humain assurées par un organisme en vue de leur cession pour un usage scientifique nécessitent l'obtention d'une **autorisation** délivrée par le Ministère de la Recherche (69) ou, le cas échéant, par le directeur de l'ARS ou le Ministère de la Défense.
Pour information, la cession désigne tout transfert à titre gratuit ou non à un tiers dès lors que ce tiers (entité juridiquement distincte) possède le libre usage de l'élément transféré.
- En cas d'importation ou d'exportation d'échantillon biologique humain, une **autorisation** est également nécessaire.

Toutes ces démarches s'effectuent via la plateforme électronique CODECOH (COnservation D'Eléments du COrps Humain), télé-service permettant de transmettre le dossier au Ministère de la Recherche (70). Le contenu des dossiers de déclaration et d'autorisation sont fixés par arrêté du Ministre de la Recherche.

a. Démarche administrative pour la déclaration (71) :

La déclaration est constituée d'une lettre signée par le représentant légal de l'organisme et d'un dossier justificatif. La lettre présente l'activité et atteste que le signataire a bien approuvé le dossier justificatif. Sans cette dernière, le dossier ne sera pas pris en compte.

Le dossier comporte 3 parties :

- **Administrative** : le statut juridique et les coordonnées de l'organisme, le(s) site(s) concerné(s), l'identité et les coordonnées du (ou des) responsable(s) scientifique(s) ;
- **Technique** : la description des locaux et des équipements, les personnels, les modalités de gestion ;
- **Scientifique** : la description du/des projet(s) de collections ou de série d'échantillons ne constituant pas une collection, les modalités d'obtention des éléments, la description des procédures concernant l'information, le consentement ou l'absence d'opposition des donneurs, le descriptif des recherches projetées.

La procédure d'instruction dure 2 mois à compter de la réception de l'accusé. Des demandes d'éléments manquants ou de modifications peuvent voir lieu dans ce délai. Au-delà, s'il n'y a pas eu d'opposition par le Ministre de la recherche, l'activité déclarée peut commencer.

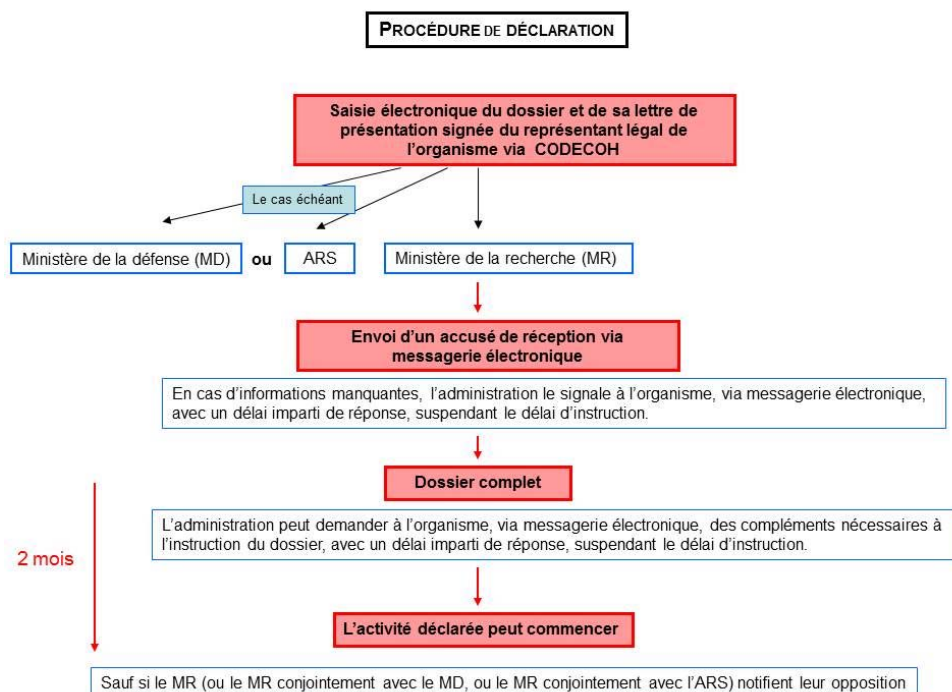


Figure 9 : Déclaration pour la préparation et conservation d'éléments du corps humain pour les propres besoins de programme de recherche du demandeur (72)

b. Démarche administrative pour l'autorisation (68) :

Dans ce cas, il faut également faire un dossier justificatif. Comme pour la déclaration, le dossier est accompagné d'une lettre signée du représentant légal de l'organisme déposant. Le dossier justificatif déposé auprès du téléservice CODECOH comporte trois parties :

- **Administrative** : le statut juridique et les coordonnées de l'organisme, le(s) site(s) concerné(s), l'identité et les coordonnées du (ou des) responsable(s) scientifique(s) ;
- **Technique** : le descriptif de l'activité projetée, la description des locaux et des équipements, les personnels, les modalités de gestion, le cadre juridique d'obtention des échantillons, la gestion de l'information, du consentement ou de l'absence d'opposition des donneurs, les modalités de gestion des cessions ;
- **Scientifique** : la description du/des projet(s) de collections ou d'une série d'échantillons ne constituant pas une collection.

Le dossier est considéré complet si, dans le mois suivant la réception du dossier, le ministre chargé de la recherche n'a pas fait connaître au demandeur les informations manquantes. Le mode d'instruction est le même que pour la déclaration mais le délai est différent, il est de 3 mois. En revanche, à l'inverse de la déclaration, l'absence de réponse par le Ministère vaut décision implicite de **rejet** de la demande d'autorisation.

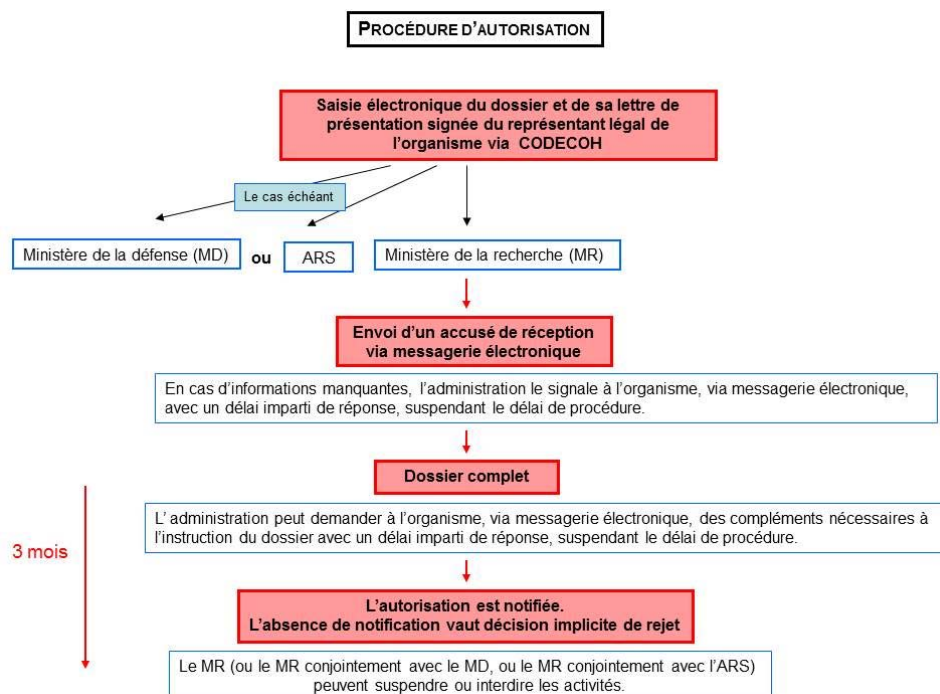


Figure 10 : Autorisation pour la préparation et conservation d'éléments du corps humain en vue de leur cession pour un usage scientifique (73)

c. Démarche administrative pour l'importation :

La législation prévoit des restrictions concernant la circulation des éléments issus du corps humain, y compris entre la France et un autre état membre de l'Union Européenne. De plus, l'import ou l'export n'est possible qu'à des fins médicales, scientifiques ou judiciaires. Dans le cas d'import/export à des fins scientifiques, une autorisation du Ministère chargé de la Recherche est nécessaire.

Des dispositions supplémentaires peuvent s'appliquer selon le type de matières (74,75). Concernant le lysat plaquettaire, l'importation ou l'exportation est soumise à une autorisation auprès du Ministère de la Recherche (76).

Les modalités de rédaction du dossier de demande d'autorisation sont détaillées dans l'arrêté du 20 avril 2000 (77). Toute demande d'autorisation doit être accompagnée d'une lettre de présentation du dossier signée par le représentant de l'organisme demande.

De plus, selon l'article R.1235-9 du CSP (78), le ministre chargé de la recherche transmet un exemplaire du dossier au directeur général de l'Agence de la biomédecine et, lorsque l'organisme demandeur bénéficie par ailleurs d'une autorisation prévue dans le CSP (79), au directeur général de l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, qui font connaître leur avis dans un délai d'un mois. L'absence de réponse passé ce délai vaut avis favorable. Le ministre chargé de la recherche se prononce dans un délai de trois mois à compter de la réception de la demande complète par ses services. L'absence de réponse dans ce délai vaut rejet de la demande.

Les autorisations sont délivrées pour une durée de cinq ans. Toute modification apportée au dossier initial doit être déclarée au Ministère de la Recherche.

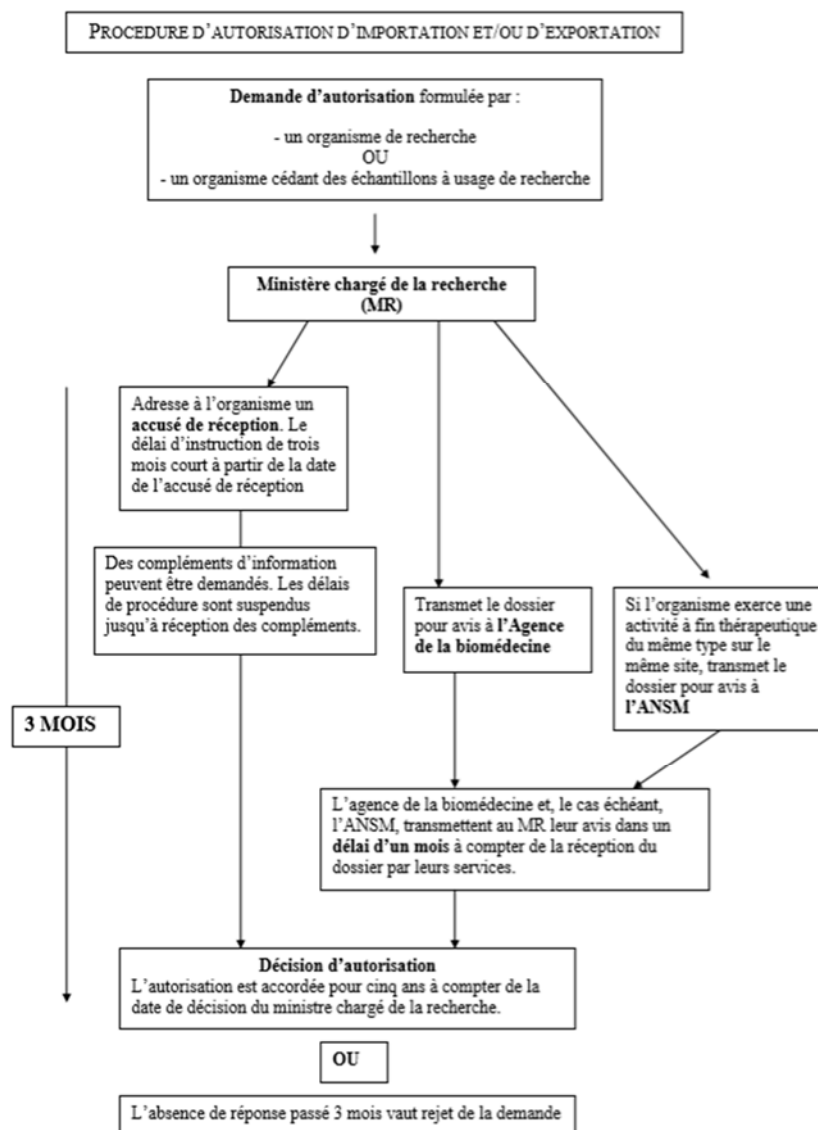


Figure 11 : Importations et exportations d'échantillons biologiques humains destinés à la recherche (80)

Pour toutes ces activités, il est impératif que la personne responsable (physique ou morale) s'assure que les modalités réglementaires autour du don ont été respectées, à savoir : gratuité du don, anonymat et consentement préalable du donneur (81).

2) Usage en culture cellulaire pour la production de médicaments biologiques et de médicaments de thérapie innovante (MTI)

Aujourd'hui, le lysat plaquettaire en qualité de supplément de milieu de culture n'est pas uniquement utilisé en recherche. En effet, il permet aussi de « nourrir » les milieux de culture servant à la fabrication de médicaments, et plus particulièrement les médicaments biologiques.

Ainsi, le lysat plaquettaire peut être considéré comme « matière première pour les médicaments biologiques ». Cette considération tient en partie de l'annexe 2 des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) (82) et de l'arrêté du 23 avril 2004 fixant « les normes et protocoles [...] » (83) qui permettent de définir les substances actives, les médicaments biologiques ainsi que les requis nécessaires à leur mise sur le marché.

En particulier, les Médicaments de Thérapie Innovante (MTI) nécessitent pour leur production l'utilisation de suppléments de milieu de culture (et donc de lysat plaquettaire). Considérant cette possible utilisation, et en accord avec la directive 2001/83/CE consolidée du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain (Annexe 1, partie IV point 3.3.1) (84), le lysat plaquettaire peut donc être défini en tant que matière première (« raw material ») servant à la fabrication de substance active pour les médicaments de thérapie innovante. En effet, de même que pour les médicaments biologiques, est considéré comme matière première toute matière utilisée pendant la fabrication de la substance active (milieux de culture, facteur de croissance...) mais qui n'est pas destinée à faire partie de la substance active.

Ces utilisations en tant que matière première sont notamment couvertes par le chapitre 5.2.12 de la Pharmacopée Européenne (52). Ce chapitre général s'applique aux matières premières d'origine biologique utilisées pour la production de médicaments à base de cellules et de médicaments de thérapie génique. Les dispositions de ce chapitre pourront être appliquées au lysat plaquettaire si le fabricant veut se conformer à la Pharmacopée Européenne mais il n'est pas d'application obligatoire.

Qu'est-ce qu'un Médicament de Thérapie Innovante ?

Cette classe de médicaments, définie très récemment au niveau européen (premiers textes en 2004 (85)), regroupe plusieurs catégories mais relève avant tout de la définition du médicament établie dans la Directive 2001/83/CE consolidée (84). Ainsi, tout MTI répond à la définition suivante : « un médicament désigne toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique ».

La réglementation des MTI s'établit tout d'abord à l'échelle européenne. Ainsi, le règlement 1394/2007/CE (86) relate les dispositions spécifiques des MTI qui s'ajoutent aux dispositions générales de la directive (84) et précise que les MTI constituent des **médicaments biologiques**.

Le règlement précité concerne donc les MTI et en expose les quatre types :

- les médicaments de thérapie génique
- les médicaments de thérapie cellulaire somatique
- les médicaments issus de l'ingénierie tissulaire et cellulaire
- les médicaments combinés de thérapie innovante (associant un MTI à un dispositif médical)

Ces différents types de MTI seront détaillés plus bas dans l'exposé.

En parallèle, il existe un statut à part : les MTI préparés ponctuellement (MTI-PP). Ces médicaments sont des MTI fabriqués et utilisés au sein d'un unique État membre. En effet, il est défini dans le règlement 1394/2007 (86) comme étant un MTI « préparé de façon ponctuelle, selon des normes de qualité spécifiques, et utilisés au sein du même État membre, dans un hôpital, sous la responsabilité professionnelle exclusive d'un médecin, pour exécuter une prescription médicale déterminée pour un produit spécialement conçu à l'intention d'un malade déterminé ». Ce type de MTI, créé en 2011 (87), est régulé au niveau national. Dans la mesure où ce statut constitue une spécificité nationale, ils sont donc exclus du champ du règlement 1394/2007 (86).

Le statut de MTI et de MTI-PP est apparu récemment suite à des progrès scientifiques dans le domaine des biotechnologies cellulaires et moléculaires. Par définition, dans le monde de la santé, une biotechnologie désigne « toute technique utilisant des êtres vivants (micro-organismes, animaux, végétaux) pour la fabrication industrielle de composés biologiques ou chimiques (médicaments, matières premières industrielles) » (88). Ces techniques de biotechnologie ont permis des avancées majeures en médecine, et aujourd'hui la biomédecine offre de nouvelles possibilités de traitements des maladies du corps humain.

Les MTI sont des produits complexes, notamment du fait de leur origine, les matériaux biologiques. De plus, ces médicaments ont des structures très complexes leur conférant des modes d'action très spécifiques. Ainsi, leur développement se fait « au cas par cas ».

En qualité de supplément de milieu de culture, le lysat plaquettaire peut donc être utilisé dans le processus de fabrication de ces médicaments, notamment pour favoriser la pousse des cellules (3).

Les suppléments de milieu de culture comme le lysat plaquettaire utilisés dans le cadre de la production de ces médicaments ne nécessitent pas d'autorisation particulière. En revanche, la qualité du lysat plaquettaire sera documentée dans le dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) ou dossier d'essai clinique du MTI pour lequel le lysat est utilisé.

Plus précisément, un dossier d'AMM comporte 5 modules différents dont le module 3 qui contient l'ensemble des « informations chimiques, pharmaceutiques et biologiques » relatives aux « médicaments contenant des substances chimiques ou biologiques actives » (89). Dans ce module, on retrouve de nombreuses données sur la substance active, les excipients ou le produit fini comme par exemple leurs spécifications ou encore le contrôle qualité dont ils font l'objet. Ainsi, certaines données concernant les matières premières utilisées lors de la fabrication des médicaments sont à renseigner dans le dossier. En effet, il est nécessaire :

- d'énumérer toutes les matières utilisées lors de la fabrication de la substance active ou des excipients, en identifiant à quel stade chaque matière intervient dans le procédé,
- de fournir des informations sur la qualité et le contrôle de ces matières, ainsi qu'une information démontrant que les matières sont conformes aux normes appropriées pour l'usage,
- et de fournir le nom de chaque fabricant.

Ainsi, toutes les caractéristiques du lysat plaquettaire ainsi que la documentation associée devront faire partie intégrante du dossier de demande de mise sur le marché du médicament biologique ou du MTI.

3) Usage en culture cellulaire pour la production des préparations de thérapie cellulaire

Le lysat plaquettaire étant un supplément de milieu de culture, on peut également envisager une utilisation dans la production de produits cellulaires à finalité thérapeutique, et plus précisément pour les préparations de thérapie cellulaire (PTC).

Par définition, à l'exception des produits sanguins labiles, les produits cellulaires à finalité thérapeutique (90) sont des cellules humaines utilisées à des fins thérapeutiques autologues (c'est-à-dire que le donneur et le receveur sont une même personne) ou allogéniques (le receveur et le donneur sont alors deux personnes différentes), quel que soit le niveau de transformation, y compris leurs dérivés.

Lorsque ces produits cellulaires à finalité thérapeutique sont des **spécialités pharmaceutiques** ou d'autres médicaments fabriqués industriellement, ils sont régis par les règles applicables au médicament à usage humain, et donc par les dispositions du titre II du livre 1er de la cinquième partie du Code de la Santé Publique (91). On est alors dans le cas d'un médicament de thérapie innovante.

Quand ils ne sont pas fabriqués de manière industrielle, ils sont alors qualifiés de **préparations de thérapie cellulaire**, y compris lorsque les cellules humaines servent à transférer du matériel génétique. A l'échelle nationale, elles sont régies par le chapitre III du titre IV du livre II de la Première partie du CSP (92). En parallèle, ces préparations entrent dans le champ de la directive européenne 2004/23/CE (93), plus communément appelée « directive tissus-cellules ». Cette directive s'applique au don, à l'obtention, au contrôle, à la transformation, à la conservation, au stockage et à la distribution de tissus et cellules humain(e)s ou de produits manufacturés dérivés de tissus ou cellules humain(e)s destinés à des applications humaines.

Contrairement aux MTI et MTI-PP, les préparations de thérapie cellulaire ne sont donc pas des médicaments au sens du CSP mais sont malgré tout placés sous la compétence de l'ANSM.

Le lysat plaquettaire sert aujourd'hui de supplément de milieu de culture pour la pousse de cellules, comme les cellules souches mésenchymateuses (94). Ainsi, dans la mesure où une préparation de thérapie cellulaire contient des cellules, on peut penser que le lysat plaquettaire pourrait être utilisé en tant que supplément de milieu en culture cellulaire dans le cadre de la fabrication des préparations de thérapie cellulaire. Dans ce cas, le lysat plaquettaire aurait un statut de « matériel entrant en contact avec les tissus ou les cellules préparé(e)s ».

En Europe, et plus particulièrement en France, les suppléments de milieu de culture utilisés dans le cadre de la production de PTC ne nécessitent pas d'autorisation particulière. En revanche, la qualité du lysat plaquettaire doit être documentée dans le dossier de demande d'autorisation de l'établissement responsable de la préparation de thérapie cellulaire pour laquelle il a été utilisé durant le procédé de fabrication (95). En effet, des informations sur le prélèvement des cellules sont à fournir dans le dossier, notamment la dénomination des produits entrant en contact avec ces cellules lors de la préparation, les coordonnées du fabricant, la justification du choix de ce produit précis en contact avec la préparation ainsi que des éléments de contrôle qualité du produit utilisé. Toutes ces informations permettent à l'ANSM, après avis de l'Agence de biomédecine, de délivrer une autorisation permettant à l'établissement d'exercer toutes les activités nécessaires au procédé de fabrication de la préparation de thérapie cellulaire (79,96,93).

De plus, en application de la directive Tissus-cellules, la fabrication des préparations doit se faire dans le respect des bonnes pratiques relatives à la préparation, à la conservation, au transport, à la distribution et à la cession des tissus et des préparations de thérapie cellulaire qui sont définies par décision de l'ANSM après avis de l'Agence de la biomédecine (97,98). Ces bonnes pratiques sont déclinées en plusieurs sous-parties, permettant ainsi de définir un cadre réglementaire pour les points suivants :

- système de management de la qualité,
- personnel, locaux et matériel nécessaire à la fabrication,
- activités pratiquées au sein de l'établissement,
- contrôle de la qualité,
- conditionnements utilisés et leur étiquetage,
- gestion du transport,
- gestion des systèmes informatisés, des non-conformités et des réclamations.

De plus, les bonnes pratiques comprennent une partie relevant des produits en contact avec les cellules ou tissus utilisés dans le cadre de la fabrication de la préparation de thérapie cellulaire. Cette dernière stipule que les éléments entrant en contact avec les cellules ou tissus doivent être validés et doivent satisfaire à des caractéristiques et spécifications documentées.

Ainsi, les caractéristiques et spécifications du lysat plaquettaire devront impérativement être prises en compte dans le cadre de la fabrication de la préparation.

B. Usage dans un but thérapeutique

De nos jours, en Europe, le lysat plaquettaire n'est pas utilisé dans le cadre d'un usage thérapeutique. Cependant, de nombreuses perspectives cliniques sont en cours d'étude et induiraient un changement de statut réglementaire pour le lysat plaquettaire.

De manière générale, toute personne souhaitant développer un produit pharmaceutique doit impérativement définir au plus tôt (au minimum avant les études « pivots ») le statut réglementaire et les qualifications du produit de manière à suivre les bons référentiels et éviter les impasses réglementaires rendant le développement inadapté.

Dans la suite de mon exposé, j'ai tenté de me mettre à la place d'une personne souhaitant développer le lysat plaquettaire pour un usage thérapeutique et ainsi de déterminer le statut et le cadre réglementaire associé.

1) Substance active biologique

Avant de se poser la question du statut de médicament, on peut évoquer la notion de substance active. En effet, les médicaments, au sens de l'article L.5111-1 du CSP (99), sont composés d'une ou plusieurs substances actives et d'excipients. Ces deux types de composants sont considérés comme des Matières Premières à Usage Pharmaceutique (MPUP).

La substance active d'un médicament est définie comme étant « toute substance ou tout mélange de substances destiné à être utilisé pour la fabrication d'un médicament et qui, lorsqu'utilisé pour sa production, devient un composant actif de ce médicament exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique en vue de restaurer, corriger ou modifier des fonctions physiologiques, ou d'établir un diagnostic médical ». Elle peut être obtenue à partir de synthèse chimique mais peut également être d'origine biologique, on parle alors de substance active biologique. Par définition, une substance biologique est une substance qui est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physico-chimico-biologiques, ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle (83).

Ainsi, le lysat étant produit à partir de matière d'origine humaine (plaquettes présentes dans le sang), sa définition en tant que substance active biologique est envisageable. Bien évidemment, pour être qualifiée de substance active biologique, le lysat plaquettaire devra démontrer qu'il peut exercer une action pharmacologique, immunologique ou métabolique.

Quelles sont les autorisations nécessaires pour enregistrer le lysat plaquettaire en tant que substance active ?

Si on considère que le lysat plaquettaire répond à la définition de substance active biologique, plusieurs éléments sont à prendre en compte pour qu'il soit conforme aux dispositions réglementaires.

Tout d'abord, le lysat plaquettaire doit répondre à la réglementation existante concernant les Matières Premières à Usage Pharmaceutique. Ainsi, dans un 1^{er} temps, il est à noter que les activités de fabrication, importation et distribution d'une substance active sont obligatoirement réalisées au sein d'établissements bénéficiant d'une autorisation par l'ANSM (100). La demande d'autorisation se fait au directeur général de l'ANSM via un télé-enregistrement et le dossier de demande est établi par décision du directeur général de l'ANSM (101) précisant sa forme et son contenu.

De plus, les MPUP doivent répondre à la Pharmacopée et être fabriquées et distribuées selon des bonnes pratiques (BPF ou Bonnes Pratiques de Fabrication et BPD ou Bonnes

Pratiques de Distribution) définies par le directeur général de l'ANSM (82,102). En particulier, la fabrication des substances actives utilisées dans les médicaments est décrite dans la partie II des BPF. En complément, les substances actives biologiques sont également encadrées par l'annexe 2 des mêmes BPF.

Il est à noter, qu'à l'inverse de la fabrication des substances actives chimiques qui est facilement reproductible, celle des substances actives biologiques peut aboutir à une grande variabilité inhérente au fait qu'elles sont issues d'organismes vivants.

Toutes les informations relatives à la substance active d'un médicament sont à verser au dossier de demande d'AMM du médicament pour laquelle elle est utilisée, et plus particulièrement dans le module 3 du dossier contenant les informations pharmaceutiques, chimiques ou biologiques relatives aux substances actives. Le contenu de ce module 3 est décrit au sein de l'arrêté du 23 avril 2004 fixant les normes et protocoles applicables aux essais analytiques, toxicologiques et pharmacologiques ainsi qu'à la documentation clinique auxquels sont soumis les médicaments (83). Ainsi, les propriétés générales, le procédé de fabrication et les contrôles de la substance active sont intégralement décrits dans ce module.

2) Préparation de thérapie cellulaire

Comme indiqué précédemment, l'usage du lysat plaquettaire peut être envisagé en tant que supplément de milieu de culture pour la fabrication des préparations de thérapie cellulaire.

Or, si on imagine que le lysat plaquettaire est utilisé en thérapeutique, la question de la désignation en tant que préparation de thérapie cellulaire à proprement parlé se pose. En effet, par définition, les préparations de thérapie cellulaire sont des produits cellulaires à finalité thérapeutique (90) non fabriqués industriellement et qui constituent des cellules humaines utilisées à des fins thérapeutiques autologues ou allogéniques, quel que soit le niveau de transformation, y compris leurs dérivés.

En complément de cette définition, pour qu'une préparation n'entre pas dans le cadre des MTI (MTI et MTI-PP inclus), elle doit respecter deux conditions :

- les modifications apportées aux cellules ou tissus ne doivent pas être substantielles, ce qui veut dire que les propriétés essentielles des cellules ou tissus n'ont pas été modifiées,
- les cellules ou tissus doivent être utilisés pour la ou les même(s) fonction(s) essentielle(s) chez le receveur et le donneur (86).

En effet, si des modifications substantielles, c'est-à-dire des modifications ayant un impact significatif sur les propriétés des cellules ou tissus, sont faites durant la production des cellules/tissus, le produit sera alors un MTI ou un MTI-PP et non une préparation.

Cette définition très complète soulève plusieurs interrogations concernant la potentielle qualification du lysat plaquettaire en tant que préparation de thérapie cellulaire.

En effet, d'une part, le lysat plaquettaire semble répondre à cette définition puisqu'il s'agit d'un dérivé issu de la lyse de cellules (plus précisément des plaquettes). Ainsi, il constitue bien des « cellules humaines [...] quel que soit le niveau de transformation, y compris ses dérivés ». En revanche, un premier « point sensible » concerne le fait d'être fabriqué industriellement ou non.

En effet, dans l'optique d'utiliser en thérapeutique le lysat plaquettaire, on peut penser qu'une production industrielle à grande échelle serait probablement envisagée. Dans ce cas, le lysat plaquettaire ne répondrait pas à la définition de préparation de thérapie cellulaire mais aurait un statut de médicament.

Cependant, du fait de son procédé de fabrication relativement simple, on peut imaginer que certains hôpitaux puissent fabriquer leur propre lysat plaquettaire dans le but d'un usage thérapeutique au sein même de l'établissement. Ce cas serait plus adapté pour un usage autologue, c'est-à-dire que le donneur et le receveur sont une seule et même personne. Si une telle situation existe, le lysat plaquettaire pourrait alors être considéré comme une préparation de thérapie cellulaire.

D'autre part, la potentielle qualification du lysat en tant que préparation de thérapie cellulaire repose sur le terme de « modification substantielle ». En effet, comme précisé dans la définition, les cellules d'une préparation de thérapie cellulaire ne doivent pas avoir subi de modifications substantielles, i.e. impactant leurs propriétés essentielles. L'annexe I du règlement 1394/2007/CE relatif aux MTI (86) traite de cette notion et mentionne uniquement les modifications qui ne sont pas considérées comme substantielles. Par exemple, l'irradiation ou la filtration ne sont pas considérées comme des manipulations substantielles. Ainsi, si le type de modification ne figure pas sur la liste, on peut supposer qu'il s'agit d'une manipulation substantielle. Or la lyse des plaquettes est réalisée par centrifugation et cette méthode figure parmi les modifications citées dans l'annexe I. Ainsi, la centrifugation n'étant pas considéré comme une manipulation substantielle, le statut de préparation de thérapie cellulaire pourrait s'appliquer au lysat.

Quelles sont les autorisations nécessaires pour enregistrer le lysat plaquettaire en tant que préparation de thérapie cellulaire ?

Si le lysat plaquettaire est ainsi défini, plusieurs éléments sont à prendre en compte par le développeur. D'une part, pour être mises sur le marché, les préparations de thérapie cellulaire doivent respecter deux conditions :

1. Une autorisation de « procédés de préparation et de conservation » doit être obtenue.
2. L'indication thérapeutique revendiquée doit être validée lors de la demande d'autorisation.

Ainsi, dans le cadre d'un usage à des fins thérapeutiques, les préparations font l'objet d'une autorisation de l'ANSM qui recueille au préalable l'avis de l'Agence de biomédecine (103,93). Cette autorisation est délivrée après évaluation de leur procédé de préparation et de conservation, de leurs indications thérapeutiques et permet d'évaluer l'efficacité, la sécurité et la qualité du produit. Cette autorisation est purement nationale, il n'existe pas de procédure européenne applicable.

En parallèle, comme expliqué dans une partie précédente de l'exposé, l'ANSM délivre les autorisations aux établissements ou organismes exerçant les activités de préparation, de conservation, de distribution et de cession, à des fins thérapeutiques autologues ou allogéniques, des préparations de thérapie cellulaire (79). L'autorisation est également délivrée après avis de l'Agence de biomédecine.

De plus, en application de la directive tissus-cellules, la fabrication des préparations doit se faire dans le respect des bonnes pratiques relatives à la préparation, à la conservation, au transport, à la distribution et à la cession des tissus et des préparations de thérapie cellulaire qui sont définies par décision de l'ANSM après avis de l'Agence de la biomédecine (104,98). Ces bonnes pratiques mentionnent ainsi les éléments dont le développeur doit se préoccuper, à savoir : avoir un système de management de la qualité robuste, du personnel, des locaux et matériaux adaptés, des contrôles qualités mis en place, un conditionnement et un étiquetage définis ainsi qu'une gestion globale du cycle de vie de la préparation de thérapie cellulaire avant et après sa mise sur le marché.

Par ailleurs, les préparations sont soumises à la biovigilance. Par définition (105), la biovigilance consiste à surveiller et prévenir les risques liés à l'utilisation à des fins thérapeutiques d'éléments et produits issus du corps humain tels les organes, les tissus, les cellules et le lait maternel. Cette dernière est sous la responsabilité de l'Agence de la biomédecine qui collecte l'ensemble des signalements de tout incident et de tout effet

indésirable, effectués par des professionnels de santé ou autres professionnels impliqués dans le cycle de vie du produit, comme les industriels à l'origine de la mise sur le marché du produit. Ainsi, le développeur devra mettre un système robuste en place afin d'assurer la biovigilance.

3) Médicament

Certaines publications scientifiques (2) ont évoqué le potentiel pouvoir du lysat plaquettaire en tant que médicament à proprement parlé.

Le statut de médicament impose de nombreuses contraintes à celui qui souhaite le développer, en particulier :

❖ **Définir le produit comme étant un médicament :**

Le médicament n'est pas un produit anodin, il est l'un des produits de consommation les plus encadrés. Il répond à une définition précise et obéit à une réglementation très stricte. En effet, dans un 1^{er} temps, le produit développé doit répondre à la définition de médicament, au sens Code de la Santé Publique (99). Pour rappel, un médicament est défini comme étant « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ou animales, ainsi que toute substance ou composition pouvant être utilisée chez l'homme ou chez l'animal ou pouvant leur être administrée, en vue d'établir un diagnostic médical ou de restaurer, corriger ou modifier leurs fonctions physiologiques en exerçant une action pharmacologique, immunologique ou métabolique ».

Les points clés de cette définition sont les suivants :

- Un médicament doit impérativement avoir des propriétés permettant de guérir une maladie (effet curatif) ou d'éviter son apparition (effet préventif),
- Et cet effet souhaité doit être réalisé par une action métabolique, pharmacologique ou immunologique. Par exemple, une substance ayant une action mécanique ne sera pas considérée comme un médicament.

Ces deux conditions doivent impérativement être remplies pour obtenir le statut de médicament.

❖ **Sélectionner la bonne molécule :**

Le développement passe tout d'abord par une phase de recherche. Durant cette phase, des milliers de molécules sont criblées pour arriver à la sélection d'une molécule qui passera les étapes suivantes de tests pour potentiellement devenir un médicament. Selon les chiffres du LEEM (106), sur 10 000 molécules ciblées, seules 10 seront « candidates médicament » et 1 deviendra réellement un médicament.

❖ **Tester la ou les molécules sélectionnées :**

En effet, pour prouver scientifiquement l'effet curatif ou préventif d'un médicament, il advient d'entreprendre des études précliniques puis cliniques (106).

Dans un premier temps, le développeur devra évaluer l'activité du lysat plaquettaire et acquérir des premières connaissances sur le lysat en tant que potentiel médicament : il s'agit des études précliniques. Cette première expérimentation en système in vivo se fait le plus souvent sur l'animal mais peut également se faire sur des cellules. Au cours de ce développement préclinique, de nombreuses études sont menées de manière à connaître les caractéristiques du lysat sur le plan pharmacocinétique, pharmacologique et toxicologique. Les études pharmacologiques ont, entre autres, pour but de valider le mécanisme d'action. Ceci pourrait être un premier frein pour la qualification du lysat plaquettaire en tant que médicament. En effet, à ce jour, aucune publication ne définit réellement le mécanisme d'action précis du lysat plaquettaire. Ceci est probablement dû au fait que le lysat plaquettaire est un mélange de molécules, chacune est potentiellement active mais rien ne permet de connaître le mécanisme d'action de ce groupe de molécules. Il sera donc impératif de réaliser des études pharmacologiques pour pouvoir décrire le mécanisme d'action du potentiel médicament. En parallèle, des études de pharmacocinétique devront être menées. Elles permettent de décrire le comportement et le devenir du lysat plaquettaire dans l'organisme vivant et ainsi de mesurer l'absorption, la distribution, la métabolisation et l'élimination du lysat. Enfin, les organes cibles et les doses potentiellement toxiques seront évaluées lors d'études toxicologiques.

Ainsi, les études précliniques permettront de déterminer la sécurité du lysat plaquettaire et de valider globalement le mécanisme d'action. Pour la réalisation de ces essais, le développeur doit suivre les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Ces principes de bonnes pratiques (107) constituent un système de garantie de la qualité du mode d'organisation et de fonctionnement des laboratoires (appelés aussi "installations d'essai") qui réalisent des essais de sécurité non cliniques sur les produits chimiques.

Si le lysat plaquettaire ne montre pas de potentiel risque pour la santé humaine, les études cliniques chez l'Homme pourront commencer après accord de l'ANSM et du comité d'éthique.

La dose de lysat à administrer aura été déterminée préalablement lors des essais précliniques. Les essais cliniques seront détaillés plus bas dans l'exposé puisqu'ils imposent d'utiliser le lysat plaquettaire, avant qu'il puisse devenir médicament, en tant que « médicament expérimental », statut possédant un cadre réglementaire strict.

❖ **Faire une demande d'Autorisation de Mise sur le Marché :**

Tous les résultats des études (précliniques et cliniques) sont ensuite détaillés dans le dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché, élément clé et indispensable à la commercialisation. Le contenu de ce dossier de demande d'AMM est défini au niveau européen dans la directive 2001/83 consolidée (Annexe 1 - Partie I) ainsi qu'au niveau national (83). Ce modèle de dossier standardisé se décline en 5 modules, à savoir :

- Module 1 : Renseignements d'ordre administratif
- Module 2 : Résumés
- Module 3 : Information chimique, pharmaceutique et biologique pour les médicaments contenant des substances chimiques et/ou biologiques actives
- Module 4 : Rapports non cliniques
- Module 5 : Rapports d'études cliniques

Les 4 derniers modules constituent ce qu'on appelle un CTD (Common Technical Document), modèle de dossier commun à tous les états membres de l'UE. Le module 1 ne fait partie du CTD car il contient uniquement des informations administratives.

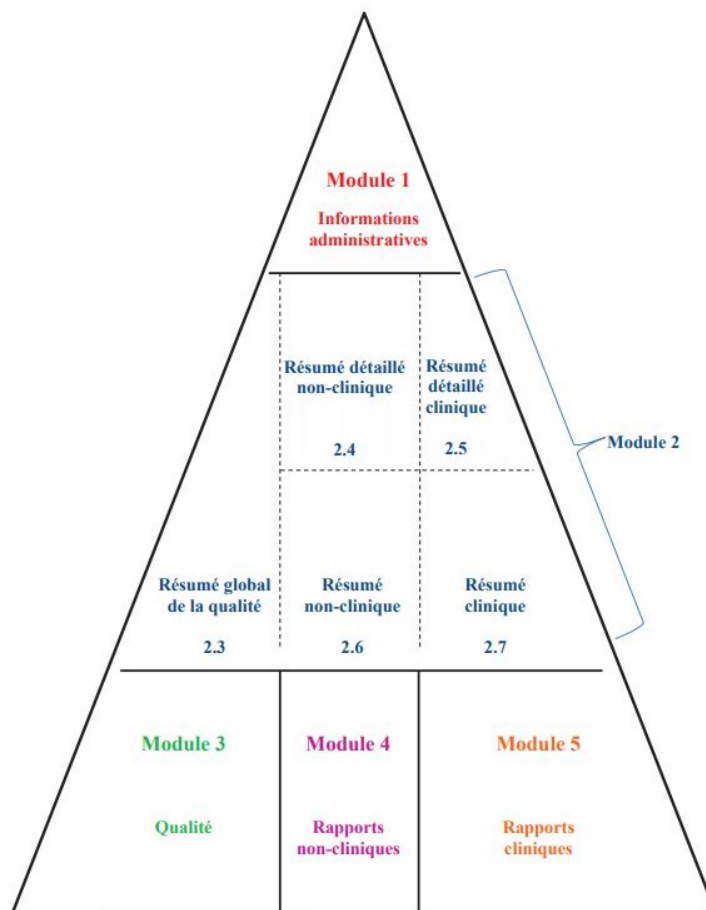


Figure 12 : Diagramme représentatif de la structure du format CTD (108)

Le contenu de ce dossier est également défini au niveau local par le CSP (109) qui impose, par exemple, de fournir des informations sur la forme du produit, la posologie ou encore l'indication thérapeutique.

Le développeur peut choisir, selon certains critères, de faire sa demande d'AMM en suivant la procédure nationale ou les procédures communautaires.

Si le développeur choisit la procédure nationale, le médicament sera enregistré uniquement dans un seul pays et son utilisation limitée au territoire national (89). Dans ce cas, en France, le médicament est évalué par l'ANSM selon des critères scientifiques de qualité, sécurité et efficacité. A compter du dépôt d'un dossier de demande complet, le directeur général de l'ANSM se prononce dans d'un délai de 210 jours.

En parallèle, il existe plusieurs types de procédures communautaires qui sont détaillées plus bas dans l'exposé. Les délais d'évaluation sont différents selon les procédures. Après évaluation du dossier complet par les instances de l'EMA, l'autorisation de mise sur marché est délivrée par la Commission Européenne. Le médicament sera alors enregistré dans plusieurs pays européens.

Une fois délivrée, l'autorisation de mise sur le marché (AMM) est délivrée pour une durée de 5 ans (110,85,84,111) et peut être ensuite renouvelée, le cas échéant, sans limite

de durée, sauf si l'autorité compétente décide, pour des raisons justifiées ayant trait à la pharmacovigilance, de procéder à un nouveau renouvellement quinquennal.

❖ **Respecter les requis de fabrication d'un médicament :**

Pour obtenir l'AMM, il faut également répondre à des exigences en termes de fabrication. En effet, le procédé de fabrication d'un médicament est très encadré.

Dans un premier temps, l'établissement prévu pour accueillir la production du médicament doit impérativement faire l'objet d'une autorisation d'ouverture d'établissement puisque la fabrication de médicaments ne peut être effectuée uniquement dans un établissement pharmaceutique (112). L'autorisation d'ouverture d'un établissement pharmaceutique est délivrée par le directeur général de l'ANSM, après avis du conseil central compétent de l'Ordre des pharmaciens et toute modification substantielle donnera lieu à une nouvelle demande d'autorisation.

Ce système d'autorisation garantit que l'ensemble des médicaments autorisés sur le marché européen ne sont fabriqués/importés que par des fabricants autorisés qui mettent en œuvre les principes de gestion du risque qualité.

De plus, l'établissement pharmaceutique doit impérativement être conforme, a minima, à la partie I des Bonnes Pratiques de Fabrication correspondant aux BPF des médicaments à usage humain. Les BPF sont éditées par l'ASNM (82) en accord avec le guide des BPF édité par la Commission Européenne (113). La partie I décrit les exigences fondamentales à respecter pour la fabrication d'un médicament à usage humain en termes de gestion du système de la qualité, gestion des locaux, de la production ou encore de la documentation. En complément, si le produit rentre dans une sous-catégorie de médicament, il devra également répondre aux exigences spécifiques couvertes par d'autres parties ou annexes des BPF.

L'ensemble de ce processus d'ouverture d'établissement pharmaceutique et de respect des BPF peut s'avérer très lourd si l'entreprise souhaitant développer ne comporte pas les infrastructures et autres éléments nécessaires à l'application des BPF.

Ainsi, le développement d'un médicament est très long et nécessite de nombreuses étapes comportant chacune son lot de potentielles difficultés pour le développeur.

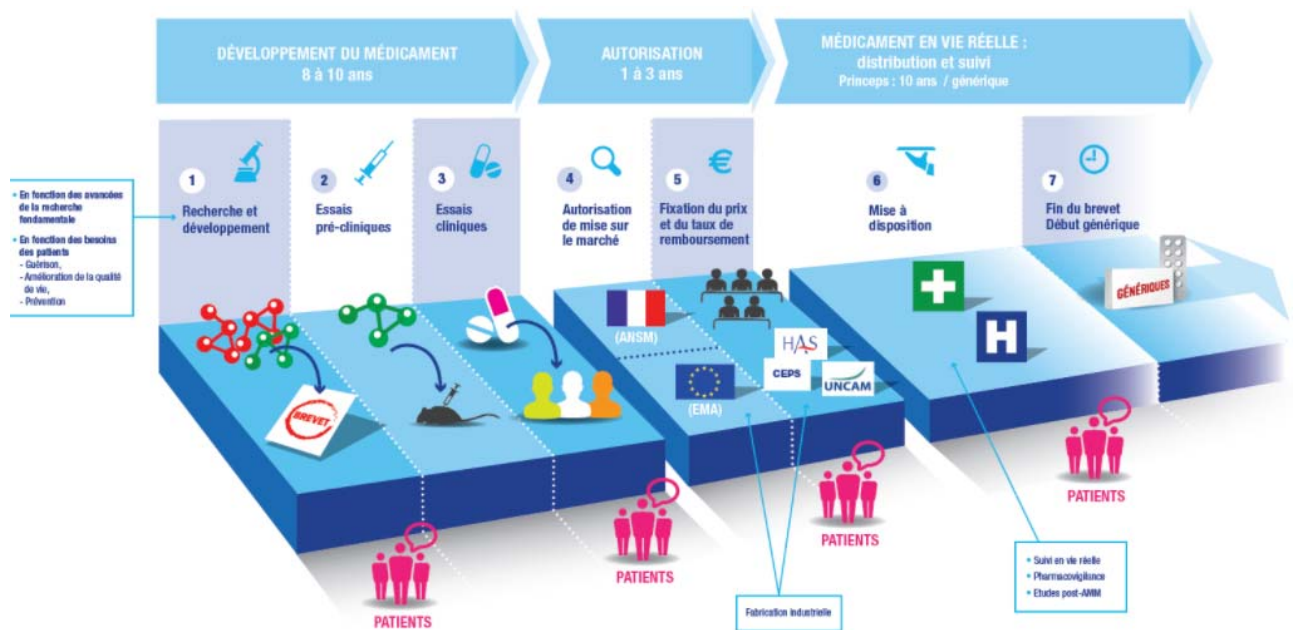


Figure 13 : Le médicament, un parcours encadré (114)

Avant de se lancer dans les démarches permettant l'obtention d'une Autorisation de Mise sur le Marché, il est nécessaire de vérifier que le lysat plaquettaire ne rentre pas dans une sous-catégorie de la définition du médicament, ce qui le soumettrait à d'autres exigences spécifiques.

A noter qu'une fois le statut du produit défini, il existe de nombreuses lignes directrices générales et spécifiques à chaque type de médicament. Elles sont fournies par l'EMA ou l'ICH et permettent d'aider le développement du médicament afin qu'il respecte la réglementation en vigueur.

a. Médicament expérimental

Comme dit précédemment, pour que le lysat plaquettaire obtienne le statut de médicament, l'efficacité et la sécurité du produit doivent être évaluées au moyen d'un essai clinique. Cette phase a lieu après la réalisation d'essais précliniques.

Un essai clinique est une recherche biomédicale organisée et pratiquée sur l'Homme en vue du développement des connaissances biologiques ou médicales (115). Dans le cas d'un médicament, cet essai clinique permet d'établir ou de vérifier des données pharmacocinétiques (effets de l'organisme sur le médicament), pharmacodynamiques (mécanisme d'action) et thérapeutiques (efficacité et tolérance).

Malgré l'existence de directives européennes, les essais cliniques possèdent avant tout un cadre réglementaire national. Dans le cadre d'un essai réalisé en France, il convient donc de respecter la loi française et plus particulièrement la loi n°2004-806 du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique (116) et ses textes d'application.

Dans le cadre d'un essai clinique, on va utiliser un médicament dit « expérimental ». Un médicament expérimental est défini comme « un médicament expérimenté ou utilisé comme référence, y compris comme placebo, lors d'un essai clinique » (110). Plus précisément, il s'agit d'un « principe actif sous forme pharmaceutique ou placebo expérimenté ou utilisé comme référence dans un essai clinique, y compris les produits bénéficiant déjà d'une AMM, mais utilisés ou formulés (présentation ou conditionnement) différemment de la forme autorisée, ou utilisés pour une indication non autorisée ou en vue d'obtenir de plus amples informations sur la forme autorisée » (117).

La définition du lysat plaquettaire en tant que médicament expérimental a plusieurs conséquences sur les démarches à suivre.

D'une part, le lysat plaquettaire utilisé lors de l'essai clinique est pris en charge par le promoteur de l'étude, personne physique ou morale étant à l'initiative de l'essai clinique. En effet, les médicaments expérimentaux et les dispositifs d'administration associés sont fournis ou mis à disposition gratuitement par le promoteur (118,119). Le promoteur sera le premier responsable de l'essai clinique, et notamment de la qualité des médicaments expérimentaux.

D'autre part, le lysat plaquettaire doit être fabriqué, conditionné et étiqueté selon les BPF (118). Toutes ces activités doivent être réalisées sous la responsabilité d'une personne qualifiée au sein d'un établissement disposant d'une autorisation de fabrication de médicament expérimental délivrée par l'ANSM. En France, les établissements pouvant être autorisés sont principalement des établissements pharmaceutiques (112,120), des Pharmacie à Usage Intérieur (PUI) au sein d'établissements de soin (121,122) ou encore des lieux de recherches (123).

Le lysat plaquettaire doit en particulier respecter les dispositions de la Ligne Directrice numéro 13 (LD13) des BPF qui traite de toutes les étapes du circuit d'un médicament expérimental (production, contrôle qualité, randomisation - insu, expéditions, retours...). Le respect et la conformité à cette LD13 des BPF est soumise à inspection (par l'ANSM) à tous les niveaux de l'essai : fabrication, sites d'investigation, promoteur...

Ceci n'est pas forcément réalisé pour le lysat plaquettaire, qui aujourd'hui n'est pas systématiquement fabriqué dans des établissements pharmaceutiques, et dont la fabrication ne respecte pas forcément les BPF puisque son statut actuel ne nécessite pas obligatoirement l'application des bonnes pratiques applicables au médicament.

Enfin, le lysat plaquettaire doit être décrit entièrement dans la demande d'autorisation d'essai clinique.

Cette demande d'autorisation fait partie des deux principaux éléments nécessaires à la mise en place d'un essai clinique (124) en France : une autorisation préalable par l'agence nationale de santé (l'ANSM) ainsi que l'avis favorable d'un Comité de Protection des Personnes (CPP). Ainsi, en pratique, l'essai ne peut débuter sans l'avis du CPP (en complément de l'autorisation par l'ANSM). En effet, le CPP donne un avis sur l'essai clinique en fonction de différents critères comme le consentement éclairé des participants, les modalités de recrutement des participants ou encore la pertinence de la recherche.

Parmi ces critères, le consentement éclairé est un point important relatif aux essais cliniques. En effet, aucun essai clinique n'a lieu sans que le participant n'ait eu au préalable des informations importantes concernant l'essai auquel il va participer. Ainsi, la personne concernée donne son consentement par écrit via un document contenant des informations telles que :

- l'objectif, la méthodologie et la durée de la recherche,
- les bénéfices attendus, les risques prévisibles,
- son droit de retirer son consentement à tout moment de l'étude...

Dans ce processus de demande d'autorisation d'essai clinique, le dossier de demande fait appel à ce qu'on appelle le Dossier du Médicament Expérimental (125). Le contenu, le format et les modalités de présentation du dossier sont fixés par décision du directeur de l'ANSM et sont disponibles sur le site internet de l'ANSM.

Une fois la demande effectuée, un numéro unique est attribué à chaque essai ayant lieu dans l'Union Européenne. Ces numéros sont recensés au sein de la base de données européenne EudraCT (126) qui regroupe tous les essais cliniques interventionnels portant sur des médicaments dans la Communauté européenne, soumis aux Comités de protection des personnes (CPP) et à l'autorité compétente (ANSM) à partir du 1er mai 2004.

NB : S'il n'a jamais été autorisé auparavant et qu'il prouve son efficacité et sécurité durant l'essai, le « médicament expérimental » deviendra « médicament » après l'obtention d'une AMM. Pour obtenir cette dernière, il est nécessaire de renseigner au sein du module 5 du dossier de demande d'AMM (Rapports cliniques) toutes les informations concernant les essais cliniques réalisés.

En revanche, dans le cas où le médicament expérimental était déjà autorisé mais que dans l'essai il est utilisé ou formulé différemment de la forme autorisée, ou utilisé pour une indication

non autorisée ou en vue d'obtenir de plus amples informations sur la forme autorisée, une modification de l'AMM initiale pourra être effectuée.

b. Cas du médicament orphelin

Si le lysat devient un médicament, il est nécessaire de se poser la question concernant la potentielle désignation en tant que médicament orphelin.

Certaines affections sont si peu fréquentes que le coût du développement et de la mise sur le marché d'un médicament destiné à les diagnostiquer, les prévenir ou les traiter est trop élevé et ne serait pas amorti par les ventes du produit. Les médicaments concernés sont appelés « médicaments orphelins ».

De manière à ce que les patients souffrant de maladies rares puissent bénéficier de la même qualité, sécurité et efficacité de traitement que les autres, une réglementation européenne a été mise en place pour inciter les industriels à se lancer dans le développement de ces produits. De plus, cette réglementation a permis d'instaurer un système communautaire avec une autorisation commune aux pays européens ainsi qu'un système de désignation des médicaments orphelins.

Le règlement 141/2000/CE détaille, entre autres, les modalités de la désignation d'un produit en tant que « médicament orphelin » (127). Tout industriel peut demander la désignation orpheline à n'importe quel moment du développement. La désignation est accordée sur décision de la Commission Européenne selon des critères :

- **de gravité,**
- **de prévalence** de la pathologie ou d'absence probable de retour sur investissement pour l'industriel,
- d'existence ou non de **méthodes alternatives** de prévention, traitement ou de diagnostic.

A ce jour, de nombreuses perspectives cliniques sont envisagées pour le lysat plaquettaire dans le but d'un usage en thérapeutique. Il sera donc nécessaire de prendre en compte l'indication souhaitée par le fabricant afin de déterminer s'il rentre dans les critères ci-dessus. Par exemple, l'application clinique du lysat plaquettaire dans le traitement de l'ostéoarthrose n'est pas une indication pour laquelle la désignation de médicament orphelin est envisageable puisque cette affection touche des millions de personnes en France (128).

De manière plus précise, un médicament obtient la désignation de médicament orphelin si :

- A) Il est destiné au diagnostic, à la prévention ou au traitement d'une affection entraînant une menace pour la vie ou une invalidité chronique ne touchant pas plus de 5 personnes sur 10 000 dans la Communauté.

OU

Il est destiné au diagnostic, à la prévention ou au traitement dans la Communauté, d'une maladie très invalidante ou d'une affection grave et chronique et qu'il est peu probable qu'en l'absence de mesures d'incitation, la commercialisation de ce médicament dans la Communauté génère des bénéfices suffisants pour justifier l'investissement nécessaire.

ET

- B) Il ne doit pas exister de méthode satisfaisante de diagnostic, de prévention ou de traitement de cette affection ayant été autorisée dans la Communauté.

OU

S'il en existe, le médicament en question devra procurer un bénéfice notable.

Ainsi, deux critères (un parmi la catégorie A, un parmi la catégorie B) doivent impérativement être réunis pour que le médicament soit dit « orphelin ».

Si l'instance décisionnelle est la Commission Européenne, c'est un comité spécialisé qui donne son avis sur les demandes de désignation : le COMP (Committee for Orphan Medicinal Products). Ce comité européen se réunit tous les mois à l'Agence Européenne du Médicament (EMA), publie des résumés concernant les opinions positives ou négatives et tient le Registre des médicaments désignés comme orphelins (129).

NB : Il est important de noter que cette désignation orpheline pour le médicament est valable uniquement pour une indication précise.

L'accès à cette désignation orpheline est un atout majeur pour les laboratoires pharmaceutiques. En effet, si le lysat plaquettaire est utilisé dans une indication orpheline, le laboratoire qui le développe et le commercialise peut profiter de mesures incitatives.

D'une part, le laboratoire bénéficie de l'assistance à l'élaboration de protocoles (Protocol Assistance (130)). Ceci consiste à demander un avis scientifique auprès de l'EMA pour optimiser le développement du produit (131). Habituellement soumis à redevances, cet avis est gratuit pour les médicaments orphelins. Cette phase d'avis scientifique est primordiale dans le cadre du développement d'un médicament orphelin.

D'autre part, la mise sur le marché est améliorée par plusieurs mesures. Le laboratoire bénéficie de 10 ans d'exclusivité commerciale après l'obtention de l'AMM. Ceci signifie

qu'aucun dossier de médicament générique ne peut être déposé durant ces 10 ans, permettant ainsi au laboratoire d'augmenter son retour sur investissement. De plus, ces médicaments sont enregistrés en procédure centralisée ce qui permet d'obtenir une AMM communautaire, valable dans tous les États Membres de l'Union Européenne. Enfin, les laboratoires bénéficient d'une réduction ou d'une exonération (selon la taille de l'entreprise) des taxes associées à la procédure centralisée.

Quelles sont les autorisations nécessaires pour enregistrer le lysat plaquettaire en tant que médicament orphelin ?

En matière d'autorisation, si le lysat plaquettaire est enregistré en tant que médicament orphelin, les mêmes standards que les médicaments sont attendus : qualité, efficacité et sécurité.

De plus, la désignation du lysat plaquettaire en tant que médicament orphelin lui offrirait l'accès à plusieurs procédures européennes d'autorisation particulières et plutôt avantageuses, à savoir :

- l'obtention d'une AMM conditionnelle,
- l'obtention d'une AMM sous circonstances exceptionnelles, ou
- l'obtention d'une AMM via la procédure centralisée.

L'AMM conditionnelle (132) s'applique aux médicaments orphelins, mais aussi aux médicaments destinés au traitement, à la prévention ou au diagnostic de maladies invalidantes graves ou potentiellement mortelles et peut être utilisée dans des situations d'urgence en réponse à une menace de Santé Publique. Cette autorisation ne sera possible pour le lysat que si plusieurs conditions sont remplies. En effet, le rapport bénéfice/risque du lysat devra avoir été démontré comme positif. De plus, il faut que le développeur et demandeur de cette autorisation puisse fournir par la suite les données cliniques détaillées. Enfin, les bénéfices du lysat plaquettaire découlant de la mise sur le marché immédiate doivent l'emporter sur le risque inhérent au fait que des données supplémentaires sont encore requises pour permettre une évaluation complète. Ainsi, de nombreuses données sont à fournir par le développeur pour espérer obtenir une telle autorisation.

Le médicament orphelin peut également obtenir une AMM sous circonstances exceptionnelles (132). En effet, dans de telles circonstances, et après consultation du demandeur, l'AMM peut être octroyée sous certaines conditions si le demandeur peut démontrer qu'il n'est pas en mesure de fournir des renseignements complets sur l'efficacité et la sécurité du médicament car :

- les indications prévues pour le lysat plaquettaire se présentent si rarement que le demandeur ne peut raisonnablement être tenu de fournir les renseignements complets, ou
- l'état d'avancement de la science ne permet pas de donner les renseignements complets, ou
- des principes de déontologie médicale, communément admis, interdisent de recueillir ces renseignements.

En revanche, cette AMM sera potentiellement accordée sous réserve de certaines obligations spécifiques, notamment axées sur la sécurité d'emploi. De plus, le développeur devra fournir une justification du bilan bénéfice/risque pour le médicament orphelin concerné.

La procédure la plus susceptible d'être utilisée si le lysat plaquettaire est un médicament orphelin est la procédure dite « centralisée ». En effet, le médicament orphelin entre dans le champ obligatoire de la procédure centralisée (85). Comme mentionné précédemment comme avantage d'une telle désignation, cette procédure permet au développeur d'obtenir une autorisation valable dans tous les États Membres de l'Union Européenne. Ceci mène à un accès direct à l'ensemble du marché intérieur de l'UE, sous un nom de marque, un résumé des caractéristiques du produit (RCP), une notice et un étiquetage uniques.

Pour les 3 types d'AMM citées, l'évaluation scientifique du dossier est sous la responsabilité du CHMP (Committee for Human Health Products ou Comité des médicaments à usage humain), comité constitutif de l'EMA, qui fournit un avis à la Commission Européenne, instance décisionnelle (132).

En parallèle, au moment de l'examen de la demande, le COMP vérifie que les critères de désignation sont toujours valides après avis du CHMP concernant l'octroi d'une AMM. En effet, la désignation pourra être retirée s'il est établi avant l'octroi de l'AMM que les critères ne sont plus remplis (127).

Enfin, une dernière solution s'offre au médicament orphelin pour être mis sur le marché. En effet, si le demandeur veut mettre à disposition le médicament orphelin avant l'obtention d'une AMM, il peut rendre disponible son produit « en vue d'un usage compassionnel ». Cet usage est défini au niveau européen par l'article 83 du règlement 726/2004 (85) et se traduit par des « programmes d'usage compassionnel » (*Compassionate Use Programs*). De plus, l'EMA fournit des recommandations sur cet usage, notamment en précisant quels médicaments et quels types de patients pouvant bénéficier d'un tel usage (133). Cependant, ces programmes sont mis en place de manière concrète par chaque État Membre, qui dispose de sa propre réglementation. En effet, chaque État Membre est en droit de fixer les règles d'application d'un usage compassionnel. Chaque État Membre peut également consulter l'EMA, et plus particulièrement le CHMP, pour obtenir, par exemple, un avis sur l'administration, la distribution ou l'utilisation d'un médicament dans le cadre d'un usage compassionnel (133).

En France, il existe la procédure d'ATU ou Autorisation Temporaire d'Utilisation définie dans le CSP (134). En effet, certaines spécialités pharmaceutiques peuvent obtenir cette autorisation si les conditions suivantes sont respectées :

- ✓ la spécialité pharmaceutique doit être destinée à traiter, prévenir ou diagnostiquer des maladies graves ou rares,
- ✓ aucun autre traitement approprié ne doit être disponible sur le marché,
- ✓ son efficacité et sa sécurité d'emploi sont présumées en l'état des connaissances scientifiques et la mise en œuvre du traitement ne peut pas être différée.

Ainsi, une telle autorisation (ATU) permet à un médicament d'être mis sur le marché sans AMM préalable ni études cliniques.

Ces conditions se recoupent avec les conditions remplies par un médicament orphelin, notamment au regard de l'absence de thérapeutique existant et du type de maladies traitées (maladies graves ou rares).

En France, il existe deux types d'ATU : l'ATU dite de cohorte (ATUc) et l'ATU dite nominative (ATUn) (135). Les principales différences entre ces deux types d'ATU sont résumées dans le tableau suivant :

| | ATU de cohorte (ATUc) | ATU nominative (ATUn) |
|---|---|--|
| Personne à l'origine de la demande | Laboratoire pharmaceutique (titulaire des droits d'exploitation) | Médecin prescripteur |
| Rapport efficacité/sécurité d'emploi | Fortement présumé | Présumé favorable |
| Destinataire | Groupe ou sous-groupe de patients traités et surveillés suivant des critères définis dans un protocole d'utilisation thérapeutique et de recueil d'informations (PUT) | Un seul patient nommé désigné et ne pouvant participer à une recherche biomédicale |
| Engagement | Dépôt d'une demande d'AMM dans un délai fixé ou demande d'AMM en cours d'évaluation | Respect du référentiel des ATU nominatives |

Tableau 2 : Comparaison entre ATU de cohorte et ATU nominative (135)

Comme décrit dans le tableau ci-dessus, chaque type d'ATU a ses particularités. D'une part, l'ATU de cohorte est associée obligatoirement à un Protocole d'Utilisation Thérapeutique et de recueil d'informations (PUT). Ce dernier est établi entre l'ANSM et le titulaire des droits d'exploitation du médicament et permet de fixer les modalités de suivi des patients traités, le recueil de données portant sur l'efficacité, les effets indésirables, les conditions réelles d'utilisation mais aussi de fixer les caractéristiques de la population bénéficiant du médicament autorisé (135).

D'autre part, pour l'ATU nominative, le prescripteur doit respecter impérativement le référentiel. Celui-ci recense la grande majorité des médicaments disponibles en ATU nominative, leurs critères d'octroi et autres informations utiles telles que les conditions d'utilisation, le résumé des caractéristiques du produit (RCP), le protocole d'utilisation thérapeutique (PUT). De plus, une ATUn ne peut être délivrée par l'ANSM uniquement s'il y a eu une demande d'ATUc ou d'AMM pour le médicament concerné (ou si le laboratoire s'engage à déposer une telle demande dans un délai déterminé), ou bien si un essai clinique est en cours en France (ou en cours de demande) (135). Ainsi, on peut par exemple imaginer que le lysat plaquettaire puisse accéder à une ATUn pendant la période d'essais cliniques si

son rapport bénéfice/risque est présumé favorable et qu'il est utilisé pour traiter une maladie rare ou grave.

A ce jour, aucune spécialité dont la substance active se rapproche de celle du lysat plaquettaire ne figure dans le référentiel. On peut donc supposer que le lysat plaquettaire pourrait figurer sur le référentiel s'il est considéré comme médicament orphelin et qu'il respecte les conditions précédemment citées.

Toutes ces autorisations sont avantageuses pour le développeur et lui permettraient de mettre le lysat plaquettaire sur le marché s'il démontre son efficacité pour une indication orpheline précise. Cependant, il est à noter que l'absence d'alternatives thérapeutiques est un paramètre important pour la désignation orpheline. En effet, l'existence d'un traitement similaire efficace concurrent du lysat plaquettaire annihilerait toute possibilité de qualification du lysat en tant que médicament orphelin et l'exclurait du processus (132).

c. Médicament biologique

Le médicament biologique est défini au niveau européen (84) et national (110) comme étant « tout médicament dont la substance active est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physiques, chimiques et biologiques ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle ».

Les points clés de cette définition qui font la particularité des produits biologiques sont les suivants :

- le produit doit avoir obligatoirement une origine biologique, et
- son procédé de fabrication doit être maîtrisé et décrit entièrement de manière à s'assurer que le produit final est invariable (et restera inchangé).

Le lysat est bien extrait d'une source biologique puisque les plaquettes sont des cellules d'origine humaine. En revanche, à ce jour, le procédé de fabrication mène à une importante variabilité inter-lots. En effet, la fabrication d'un médicament biologique d'extraction passe par plusieurs étapes : sélection du donneur, collecte, qualification, extraction, purification et mise en forme pharmaceutique. Toutes ces étapes sont susceptibles d'affecter les paramètres critiques du produit. Ainsi, ceci compromet la qualification du lysat en tant que médicament biologique puisqu'il est difficile d'assurer que le produit final sera invariable.

Quelles sont les autorisations nécessaires pour enregistrer le lysat plaquettaire en tant que médicament biologique ?

Si le lysat plaquettaire est défini en tant que médicament biologique, son procédé de fabrication devra respecter les Bonnes Pratiques de Fabrication (82) générales (concernant le médicament à usage humain – partie 1) mais aussi l'annexe spécifique (annexe 2) des BPF relative à la « fabrication des substances actives et des médicaments biologiques à usage humain ».

La mise sur le marché d'un médicament biologique doit avant tout respecter les principes généraux indispensables à la mise sur le marché d'un médicament (qualité, sécurité et efficacité). Cependant, elle comporte des particularités réglementaires. En effet, la qualification en tant que médicament biologique va avoir un impact sur la constitution du dossier de demande d'AMM. Le dossier de demande d'AMM devra ainsi respecter les exigences d'un dossier standardisé mais il devra être complété par des éléments relatifs à son origine biologique (84). Les particularités du dossier de demande de mise sur le marché d'un médicament biologique sont diverses. Par exemple, dans le dossier d'AMM d'un médicament biologique, il est nécessaire de décrire 2 méthodes d'inactivation virale alors que l'usage scientifique du lysat plaquettaire impose d'utiliser seulement une méthode.

A ce jour, il n'existe pas de lysat plaquettaire ayant le statut de médicament biologique. Ainsi, si le lysat devient un médicament biologique, l'aspect innovateur pourrait lui donner accès à la procédure centralisée. Ceci a priori de manière non obligatoire (136) sauf si :

- l'indication thérapeutique revendiquée fait partie des indications listées dans le champ obligatoire de la procédure centralisée, à savoir le traitement de maladies virales ou de maladies auto-immunes et autres dysfonctionnements immunitaires, ou si
- le lysat plaquettaire contient une nouvelle substance active non autorisée servant à traiter le SIDA, un cancer, une maladie neurodégénérative ou le diabète, ou si
- le produit bénéficie d'une désignation « médicament orphelin ».

Si le lysat plaquettaire est défini en tant que médicament biologique, il est nécessaire de vérifier s'il peut entrer dans une sous-catégorie de médicaments biologiques. En effet, sont considérés comme médicaments biologiques les médicaments dérivés du sang et du plasma humain ainsi que les médicaments de thérapie innovante (MTI).

d. Médicament dérivé du sang

Un Médicament Dérivé du Sang (MDS) désigne « tout médicament préparé industriellement à partir de sang ou de ses composants » (110). Ce type de médicament constitue un produit sanguin stable sous la responsabilité du pharmacien, à l'inverse des produits sanguins labiles, par exemple les plaquettes, qui eux sont sous l'égide des Établissements Français du Sang (EFS) (5). Les différences entre ces deux produits sont récapitulées dans le tableau ci-dessous :

| | Médicament Dérivé du Sang (MDS) | Produit Sanguin Labile (PSL) |
|------------------------------|--|--|
| Produits | Protéines issues de pool de plasma subissant un fractionnement physico-chimique et inactivation virale | Obtenus par séparation primaire des éléments du sang : plaquettes, globules rouges, plasma |
| Durée de conservation | 1 à 3 ans | Quelques jours à 1 an |
| Fabrication | Même requis et organisation que la fabrication des médicaments + spécificités réglementaires comme l'obligation de traçabilité (cf ci-dessous) | En fonction des besoins estimés |
| Autorité compétente | ANSM | EFS |
| Système de vigilance | Pharmacovigilance (Comme les médicaments) | Hémovigilance |

Tableau 3 : Comparaison entre Médicament Dérivé du Sang (MDS) et Produit Sanguin Labile (PSL) (137,5)

Les MDS diffèrent également des produits sanguins labiles par rapport à la réglementation qui leur est applicable.

La catégorie des médicaments dérivés du sang (137) comprend :

- Les médicaments issus du fractionnement du plasma, aussi appelés médicaments dérivés du plasma sanguin.

Par exemple, l'albumine, les immunoglobulines, certains facteurs de coagulation, les anti-protéases et les colles biologiques sont des MDS issus du fractionnement du plasma. Ils sont notamment utilisés dans le traitement de déficits immunitaires, les troubles de la coagulation et en réanimation.

- Le plasma à finalité transfusionnelle dans la production duquel intervient un processus industriel dont l'autorisation de mise sur le marché et les exigences relatives à la qualité et la sécurité sont conformes aux lois et réglementations en vigueur.

Le lysat plaquettaire ne constituant pas du plasma à part entière et n'ayant pas pour but la transfusion, il ne sera pas défini en tant que plasma à finalité transfusionnelle. En revanche, pourrait-il être défini en tant que médicament dérivé du plasma sanguin ?

Par définition, le fractionnement du plasma correspond au procédé de fabrication au cours duquel les composants du plasma sont séparés/purifiés par diverses méthodes physiques et chimiques, telles que, par exemple, la précipitation et la chromatographie (82). Pour rappel, le lysat plaquettaire est fabriqué par lyse de concentrés plaquettaires qui, eux-mêmes, sont définis comme Produits Sanguins Labiles. De plus, les plaquettes ne sont pas issues du plasma sanguin. Ainsi, le lysat plaquettaire ne semble pas répondre à la définition du médicament dérivé du sang.

e. Médicament de thérapie innovante

Étant donné l'absence sur le marché européen à ce jour de lysat plaquettaire utilisé en thérapeutique, on peut se poser la question concernant son caractère innovant et sa possible définition en tant que Médicament de Thérapie Innovante (MTI).

La réglementation des médicaments de thérapie innovante s'établit au niveau national (textes anciens) mais surtout plus récemment au niveau européen avec la directive 2004/23/CE (93) et le règlement 1394/2007/CE (86). Ces textes européens ont fait considérablement évoluer le cadre réglementaire de ces médicaments. Par exemple, certains produits ayant le statut de préparation de thérapie cellulaire ont changé de statut et sont devenus des MTI.

Pour rappel, les différentes réglementations européennes (86,138) et nationales définissent trois types de produits relatifs au domaine des médicaments de thérapie innovante :

- **Les Médicaments de Thérapie Innovante (MTI)** avec les médicaments de thérapie génique, les médicaments de thérapie cellulaire somatique, les médicaments issus de l'ingénierie tissulaire et cellulaire et les médicaments combinés de thérapie innovante (associant un MTI à un dispositif médical).

- Les **MTI préparés ponctuellement** (MTI-PP) qui sont des MTI fabriqués et utilisés au sein d'un unique État Membre. Du fait de cette utilisation et de leur production ponctuelle pour un patient, les MTI-PP ne sont pas couverts par le règlement européen (86) mais sont régis au niveau national.
- Les **préparations de thérapie cellulaire** qui sont des cellules humaines non fabriquées industriellement utilisées à des fins thérapeutiques, autologues ou allogéniques, quel que soit le niveau de transformation, y compris leurs dérivés.

L'évaluation des MTI ou MTI-PP nécessite une expertise très spécifique, et comprend des aspects à la frontière d'autres disciplines comme les biotechnologies et les dispositifs médicaux. Ainsi, l'Agence Européenne du Médicament (EMA) a décidé de créer un comité spécialisé pour ce type de médicament : le comité des thérapies innovantes (CAT ou Committee for Advanced Therapies). Le rôle de ce comité est avant tout de fournir un avis sur la qualité, la sécurité et l'efficacité d'un MTI en vue de l'obtention d'une AMM (139). Ainsi, l'évaluation du dossier d'AMM est avant tout réalisée par ce comité qui transmet son avis au Comité des médicaments à usage humain (CHMP ou Committee for Human Medicinal Products) qui prendra la décision finale.

Pour engager la réflexion autour du statut du lysat plaquettaire en vue d'une demande d'AMM, il est d'abord nécessaire pour le développeur de trancher entre MTI et préparation de thérapie cellulaire. En effet, pour différencier les MTI (MTI et MTI-PP inclus) des préparations, deux critères doivent être pris en compte (140) :

- La réalisation de modifications substantielles des cellules/tissus pendant le procédé de fabrication et,
- La fonction essentielle du tissu/cellule, le mode d'action du produit.

En effet, si des modifications substantielles, c'est-à-dire des modifications ayant un impact significatif sur le produit, sont effectuées durant la production des cellules/tissus, le produit sera alors un MTI ou un MTI-PP et non une préparation (140). L'annexe I du règlement 1394/2007/CE (86) encadre cette notion et mentionne uniquement les modifications qui ne sont pas considérées comme substantielles. Comme mentionné précédemment dans l'exposé, la lyse des plaquettes est faite par centrifugation et cette manipulation n'est pas considérée comme substantielle selon l'annexe du règlement. Le statut de préparation de thérapie cellulaire semble donc être le plus adapté dans l'état actuel des connaissances sur le lysat plaquettaire. En revanche, les études ne sont aujourd'hui pas suffisamment avancées pour connaître les caractéristiques d'un lysat plaquettaire "médicament", ce qui laisse la possibilité au lysat de devenir un MTI. En effet, si le procédé de fabrication du lysat plaquettaire

« médicament », potentiellement différent de l'actuel procédé de fabrication, fait intervenir une modification substantielle, alors le lysat plaquettaire pourrait être défini comme MTI.

De plus, pour savoir si le lysat entre dans le champ des MTI (ou MTI-PP), il est important de définir au préalable si sa fonction essentielle chez le receveur est différente de celle initiale (chez le donneur). Ceci est difficile à déterminer avec les données disponibles aujourd'hui et dépendra de l'utilisation souhaitée définie par le développeur.

Pour définir de manière ferme le statut du lysat plaquettaire, le développeur pourra faire appel au comité des thérapies innovantes. En effet, outre l'évaluation du dossier d'AMM, le comité est chargé d'apporter des conseils aux développeurs sur les produits pouvant tomber dans le champ des MTI et donne ainsi son avis sur la classification du produit (139). Cette procédure dure 60 jours calendaires suivant la réception d'une demande valise du développeur. L'EMA délivre sa recommandation après consultation de la Commission Européenne. Aussi, à tout moment du développement et en contrepartie de redevances, le développeur peut demander avis et conseil à l'autorité compétente (nationale ou européenne). Ainsi, le comité européen des thérapies innovantes peut apporter, sous forme d'un Avis scientifique, son expertise et conseiller le développeur sur une partie du dossier de demande d'AMM nécessitant des compétences scientifiques spécifiques (139).

NB : Le statut d'un même produit peut évoluer au cours du temps. En effet, si une modification du procédé de fabrication est apportée, la préparation cellulaire/tissulaire peut devenir un MTI. Aussi, si l'indication du produit change, la fonction recherchée n'est plus la même et le produit devient alors MTI.

Si le statut de MTI est établi pour le lysat plaquettaire, il est nécessaire de prendre en compte la directive 2004/23/CE (93). En effet, cette directive « tissus cellules » s'applique principalement aux préparations de cellulaire puisqu'elle traite des 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. Cependant, elle s'applique également pour les MTI mais uniquement en ce qui concerne le don, l'obtention et le contrôle des tissus et cellules humains puisque les autres aspects sont couverts dans le règlement 1394/2007/CE (86). Par ailleurs, ce règlement européen définit les quatre types de MTI, à savoir :

i. Médicaments de thérapie génique (86) :

Tout d'abord, il est à noter qu'un médicament de thérapie génique est un médicament biologique. Il doit donc respecter les dispositions réglementaires relatives à ce type de produits qui ont été mentionnées ci-dessus.

Ainsi, on définit un médicament de thérapie génique comme étant un médicament biologique qui a les caractéristiques suivantes :

- « il contient une substance active qui contient ou constitue un acide nucléique recombinant administré à des personnes en vue de réguler, de réparer, de remplacer, d'ajouter ou de supprimer une séquence génétique ;

et

- 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. »

Il est impératif que les deux conditions soient réunies pour que cette définition s'applique au produit.

ii. Médicaments de thérapie cellulaire somatique (86) :

Comme le médicament de thérapie génique, la définition du médicament de thérapie cellulaire somatique est basée sur celle du médicament biologique.

Outre les particularités du médicament biologique, il doit respecter les caractéristiques suivantes :

- « un médicament de thérapie cellulaire contient ou consiste en 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 structurales, ou des cellules ou tissus qui ne sont pas destinés à être utilisés pour la ou les mêmes fonctions essentielles chez le receveur et le donneur;

et

- est présenté comme possédant 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, ou est utilisé chez une personne ou administré à une personne dans une telle perspective. »

Les deux conditions doivent être vérifiées pour que le produit soit défini comme un médicament de thérapie cellulaire somatique.

iii. Médicaments issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire (86) :

Par définition, il s'agit d'un produit :

- qui contient des cellules ou tissus issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire, ou en est constitué,

et

- qui est présenté comme possédant des propriétés lui permettant de régénérer, réparer ou remplacer un tissu humain, ou est utilisé chez l'être humain ou administré à celui-ci dans ce but.

Un produit issu de l'ingénierie tissulaire peut contenir des cellules ou des tissus d'origine humaine ou d'origine animale, ou les deux. Les cellules ou tissus peuvent être viables ou non viables. Il peut également contenir des substances supplémentaires, telles que des produits cellulaires, des biomolécules, des biomatériaux, des substances chimiques, des supports ou des matrices.

Les produits contenant ou consistant exclusivement en des cellules et/ou des tissus humains ou animaux non viables, qui ne comprennent pas de cellule ou tissu viable et dont l'action principale n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques, immunologiques ou métaboliques, sont exclus de la présente définition.

Ainsi, 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 manipulations énumérées à l'annexe I du Règlement 1394/2007 (86), en particulier, ne sont pas considérées comme des manipulations substantielles,
- 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.

iv. Médicaments combinés de thérapie innovante (86):

Par définition, il s'agit d'un « médicament de thérapie innovante (MTI) qui satisfait aux conditions suivantes :

- il doit incorporer comme partie intégrante un ou plusieurs dispositifs médicaux au sens de l'article 1er, paragraphe 2, point a), de la directive 93/42/CEE (141), ou

bien un ou plusieurs dispositifs médicaux implantables actifs au sens de l'article 1er, paragraphe 2, point c), de la directive 90/385/CEE (142),

et

- sa partie cellulaire ou tissulaire doit contenir des cellules ou des tissus viables, ou sa partie cellulaire ou tissulaire contenant des cellules ou des tissus non viables doit être susceptible d'avoir sur le corps humain une action qui peut être considérée comme essentielle par rapport à celle des dispositifs précités. »

Dans ce cas, les dispositifs combinés qui incluent un DM ou un DM Implantable Actif (DMIA) doivent se soumettre aux exigences énoncées respectivement dans la directive 93/42/CE (141) et la directive 90/385/CE (142). Ainsi, le dossier doit contenir toutes les informations nécessaires permettant de prouver que le dispositif médical est conforme aux exigences essentielles. Dans ce cadre, la demande d'autorisation contient alors les résultats de l'évaluation faite par un organisme notifié conformément aux directives précitées.

Toutes ces catégories sont également applicables aux MTI-PP. En effet, les MTI-PP sont avant tout des MTI et répondent donc aux mêmes définitions. Ainsi, le statut de MTI-PP est possible pour les quatre types de MTI tels que définis dans le Règlement européen (86). Cependant, un MTI-PP doit répondre à des critères supplémentaires :

- ils doivent être préparés ponctuellement,
- selon des normes de qualité spécifiques,
- et doivent être utilisés au sein du même État membre, dans un hôpital, sous la responsabilité professionnelle exclusive d'un médecin, pour exécuter une prescription médicale déterminée pour un produit spécialement conçu à l'intention d'un malade déterminé (140).

Ainsi, ces produits ne sont pas exportables en dehors du pays dans lesquels ils sont utilisés.

Il convient au développeur de définir la stratégie qu'il veut adopter et de choisir s'il souhaite positionner son produit en tant que MTI ou MTI-PP. En effet, d'une part, la procédure d'autorisation ne sera pas la même pour ces deux produits (autorisation européenne pour les MTI, nationale pour les MTI-PP). De plus, selon la caractérisation du produit et la population ciblée, le développeur doit déterminer si l'utilisation du lysat plaquettaire peut revêtir un caractère ponctuel. Dans ce cas, le lysat serait utilisé spécifiquement pour un patient selon une prescription donnée, ce qui devra pouvoir être justifié par le développeur.

Les MTI-PP peuvent être utilisés uniquement au sein de l'État Membre dans lequel il est autorisé. En conséquence, l'importation et l'exportation sont impossibles pour ce genre de

produit. Le développeur doit donc considérer ce point lors de l'élaboration de sa stratégie puisque, dans ce cas, un développement international ne sera pas envisageable.

Enfin, le risque de ce statut de MTI-PP réside dans le fait qu'il n'est pas acquis de manière indéfinie. En effet, le développeur sera dans l'obligation de cesser la mise à disposition du MTI-PP (lysate plaquettaire) si un MTI est autorisé au niveau européen dans la même indication thérapeutique (140).

Outre ces considérations sur la stratégie du développeur pour le positionnement en tant que MTI-PP, il est important de déterminer quelle catégorie de MTI définit le mieux le lysate plaquettaire lorsqu'il est utilisé à but thérapeutique.

Tout d'abord, les caractéristiques du lysate plaquettaire ne respectent pas la 1^{ère} condition de la définition de médicament de thérapie génique. En effet, le lysate ne contient pas et ne constitue pas un acide nucléique recombinant. Il paraît donc évident que le lysate plaquettaire, dans le cadre d'un usage thérapeutique, ne pourra pas obtenir ce statut de médicament de thérapie génique.

En parallèle, si le lysate plaquettaire peut envisager de devenir un médicament de thérapie innovante, on peut se poser la question au sujet du statut de médicament combiné de thérapie innovante. Or, de nos jours, aucune étude associant le lysate plaquettaire à un dispositif médical est en cours. Il ne peut donc pas être défini comme un médicament combiné de thérapie innovante. En revanche, il n'est pas exclu, qu'à l'avenir, qu'une utilisation du lysate en association à un dispositif médical soit envisagée.

Il y a donc deux catégories potentielles pour le lysate : médicaments de thérapie cellulaire somatique ou médicament issu de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire. Pour ces deux types, les cellules ou les tissus utilisés pour constituer le médicament doivent avoir fait l'objet d'une manipulation substantielle de façon à modifier leurs caractéristiques biologiques, leurs fonctions physiologiques ou leurs propriétés structurales. De plus, la fonction des cellules ou tissus utilisés doit être différente chez le receveur et le donneur.

En revanche, la différence entre ces 2 types de MTI concerne l'usage revendiqué par le produit. En effet, un médicament de thérapie cellulaire possède des propriétés qui lui permettent de traiter, de prévenir ou de diagnostiquer une maladie à travers une action métabolique, immunologique ou pharmacologique tandis qu'un médicament issu de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire vise à régénérer, réparer ou remplacer un tissu humain.

Pour déterminer précisément le statut du lysate plaquettaire, il sera donc nécessaire de connaître l'usage souhaitée pour le produit. Il est impossible aujourd'hui de connaître précisément la catégorie dans laquelle sera classé le lysate plaquettaire selon son usage thérapeutique. Cependant, il me semble plus probable que le lysate plaquettaire devienne un

médicament de thérapie cellulaire somatique puisque les potentielles propriétés thérapeutiques allouées au lysat dans les publications scientifiques (2) évoquent une action pharmacologique, immunologique ou métabolique plutôt qu'une action de réparation ou de remplacement d'un tissu humain.

Quelles sont les autorisations nécessaires pour enregistrer le lysat plaquettaire en tant que MTI ?

Quoi qu'il en soit, si le lysat plaquettaire est défini en tant que MTI, il s'agit avant tout d'un médicament ; sa mise sur le marché passe donc par l'obtention d'une AMM.

En particulier, les MTI sont dans le champ obligatoire de la procédure centralisée (136). Cette procédure réglementaire permet d'obtenir une autorisation valable pour tous les États Membres de l'UE. Dans le cas d'un MTI, l'évaluation du dossier de demande est réalisée par le comité des thérapies innovantes (CAT) qui transmet son avis au comité des médicaments à usage humain (CHMP). Ce comité, faisant partie intégrante de l'EMA, fait part de son avis final à la Commission Européenne qui est l'instance décisionnelle (139).

Le contenu du dossier de demande d'AMM d'un MTI, tel que défini dans le règlement 1394/2007, doit respecter les mêmes exigences de format (modules 1 à 5) que le dossier standardisé (84) d'un médicament. En revanche, le dossier comporte des données spécifiques aux MTI. Les exigences requises pour le dossier d'un MTI sont décrites dans la partie IV de l'annexe I de la directive 2001/83 (84). Par exemple, dans le dossier d'un médicament, le développeur doit soumettre une description détaillée du système de pharmacovigilance et, le cas échéant, la description du plan de gestion de risque. Dans cette même partie, un dossier de demande d'AMM pour un MTI doit comporter des informations complémentaires. En effet, le règlement 1394/2007 (Article 14 (1)) impose au demandeur de soumettre les mesures envisagées pour assurer le suivi de l'efficacité (bénéfice) et le suivi du profil de sécurité (risque) du médicament à long terme.

A noter, le procédé de fabrication de tels médicaments doit également respecter les BPF (82). En effet, en complément des exigences des BPF relatives au médicament à usage humain, tout MTI devra être fabriqué selon la partie spécifique des BPF applicable aux MTI (Partie IV) mais aussi selon l'annexe 2 puisqu'un MTI constitue un médicament biologique.

Comme pour le médicament orphelin, un médicament de thérapie innovante en cours de développement pourra bénéficier d'une ATU. Comme décrit précédemment dans l'exposé, cette autorisation permet aux patients atteints de maladies rares ou graves pouvant pas être traitées de manière satisfaisante par un médicament déjà autorisé de bénéficier d'un traitement approprié.

Quelles sont les autorisations nécessaires pour enregistrer le lysat plaquettaire en tant que MTI-PP ?

Les MTI-PP ne sont pas compris dans ce scope obligatoire de la procédure centralisée, sa mise sur le marché passe donc par une procédure nationale. Néanmoins, ils nécessitent eux aussi une autorisation, qui sera obtenue auprès de l'ANSM puisque les MTI-PP sont soumis à la réglementation nationale. En conséquence, l'autorisation est sous la responsabilité de l'État Membre qui doit cependant appliquer des critères de traçabilité, de pharmacovigilance et de qualité pharmaceutique équivalents à ceux prévus par le règlement européen.

La demande d'autorisation (143) doit être accompagnée d'un dossier dont le contenu est fixé par arrêté du ministre chargé de la santé, sur proposition du directeur général de l'ANSM (144). Il contient, entre autres, des données relatives à la qualité du médicament concernant la substance active et le produit fini ou encore l'indication thérapeutique et la posologie proposées. Le directeur général de l'ANSM notifie sa décision au demandeur dans un délai maximum de 120 jours à compter de la date de réception du dossier complet. L'absence de décision après les 120 jours prévus pour l'évaluation signifie que la demande est rejetée. Une fois l'autorisation délivrée, le demandeur devra impérativement faire une nouvelle demande d'autorisation dès lors qu'une modification ayant un impact sur la qualité, la sécurité et l'efficacité du médicament est prévue.

Enfin, une des particularités d'un MTI-PP est qu'il constitue une exemption hospitalière. Ainsi, la réglementation en vigueur (86) permet aux établissements publics de santé de pouvoir fabriquer ce type de médicaments sans être établissements pharmaceutiques (145).

Conclusion

Ainsi, le lysat plaquettaire est largement utilisé en recherche de nos jours pour permettre la croissance des cellules en culture cellulaire. A terme, le lysat plaquettaire pourrait ne plus être utilisé puisqu'il pourrait être remplacé par des solutions chimiquement définies. Comme leur nom l'indique, ces solutions diffèrent du lysat plaquettaire ou du sérum de veau foetal par le fait que l'on sait avec précision ce qu'elle contient, à savoir des hormones ou des facteurs de croissance pouvant être d'origine animale ou végétale, ou même des composants recombinants produits en laboratoire (146).

En parallèle, le lysat plaquettaire constitue une piste thérapeutique qui reste encore à explorer pour imaginer son utilisation en tant que médicament. La réflexion concernant son statut juridique dans le cadre d'une utilisation thérapeutique est complexe mais il semblerait que le lysat plaquettaire puisse répondre a minima à la définition de médicament biologique et peut-être même au statut de médicament de thérapie innovante si certaines conditions sont respectées.

Dans le cycle de développement d'un médicament, il est indispensable pour la personne qui souhaite le développer de consulter les agences réglementaires de manière précoce et à chaque étape du développement. En effet, plusieurs solutions sont apportées par les autorités de santé au niveau européen mais aussi au niveau local en France. Tout d'abord, un Avis Scientifique peut être demandé à un stade précoce du développement pour un nouveau médicament, auprès de l'ANSM ou de l'EMA et quel que soit le type de procédure (147). Il peut être demandé, par exemple, dans le cas où la connaissance de la maladie ciblée est limitée et permettra au développeur de déterminer, entre autres, les études appropriées à mener dans le cadre du développement du médicament. Si le lysat plaquettaire tend à devenir un médicament de thérapie innovante, il existe des services spécifiques à ce type de médicament. Établie au niveau européen, l'Innovation Task Force (ITF) est un groupe multidisciplinaire qui comprend des compétences scientifiques, réglementaires et juridiques et qui a été créé pour fournir un forum de dialogue précoce avec les développeurs. En parallèle, le comité des thérapies innovantes (CAT) peut permettre au développeur de connaître l'avis des autorités sur la classification du produit en MTI. Tous ces outils permettront au développeur du lysat plaquettaire de franchir les obstacles réglementaires pour envisager la mise sur le marché d'un lysat plaquettaire médicament.

Bibliographie

1. France U de L-. Levée de Fonds pour la société InBrain Pharma [Internet]. [cité 25 oct 2020]. Disponible sur: https://www.univ-lille.fr/actualites/detail-actualite/?tx_news_pi1%5Bnews%5D=1565&tx_news_pi1%5Bcontroller%5D=News&tx_news_pi1%5Baction%5D=detail&cHash=41a16e492abc8f13207975ad4e78e6
2. Zamani M, Yaghoubi Y, Movassaghpour A, Shakouri K, Mehdizadeh A, Pishgahi A, et al. Novel therapeutic approaches in utilizing platelet lysate in regenerative medicine: Are we ready for clinical use? *J Cell Physiol.* 2019;234(10):17172-86.
3. Sensebé L, Bourin P. Cellules souches mésenchymateuses: Production à usage clinique et contraintes sécuritaires. *Med Sci (Paris)* [Internet]. mars 2011 [cité 6 nov 2020];27(3):297-302. Disponible sur: <http://www.medicinesciences.org/10.1051/medsci/2011273297>
4. Transfusion et hémovigilance: Bienvenue à toutes les personnes concernées [Internet]. HEMOVIGILANCE - SECURITE TRANSFUSIONNELLE. [cité 26 oct 2020]. Disponible sur: <http://hemovigilance-cnrh.fr/wp18/>
5. Les produits sanguins labiles | l'Établissement français du sang [Internet]. [cité 2 janv 2020]. Disponible sur: <https://www.efs.sante.fr/activite/les-produits-sanguins-labiles>
6. Décision du 3 mai 2018 modifiant la décision du 8 février 2018 fixant la liste et les caractéristiques des produits sanguins labiles - Légifrance [Internet]. [cité 26 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000036876350/>
7. Weltgesundheitsorganisation, éditeur. Manuel de gestion, maintenance et utilisation du matériel de la chaîne du froid pour le sang. Genève: Organisation Mondiale de la Santé; 2008. 98 p. (Sang et produits sanguins sécurisés).
8. Universalis E. SANG - Coagulation [Internet]. Encyclopædia Universalis. [cité 26 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.universalis.fr/encyclopedie/sang-coagulation/>
9. Burnouf T, Strunk D, Koh MBC, Schallmoser K. Human platelet lysate: Replacing fetal bovine serum as a gold standard for human cell propagation? *Biomaterials.* janv 2016;76:371-87.
10. Pertuy - Etude des mécanismes de formation des plaquettes s.pdf [Internet]. [cité 26 oct 2020]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01294016/document>
11. Anonymous. Sang [Internet]. Santé publique - European Commission. 2016 [cité 26 oct 2020]. Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/blood_tissues_organ/blood_fr
12. Directive 2002/98/CE du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 2003 établissant des normes de qualité et de sécurité pour la collecte, le contrôle, la transformation, la conservation et la distribution du sang humain, et des composants sanguins, et modifiant la directive 2001/83/CE [Internet]. 033, 32002L0098 févr 8, 2003. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/dir/2002/98/oj/fra>
13. EUR-Lex - 02004L0033-20150109 - EN - EUR-Lex [Internet]. [cité 26 oct 2020]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX:02004L0033-20150109>
14. EUR-Lex - 32005L0061 - EN - EUR-Lex [Internet]. [cité 26 oct 2020]. Disponible sur:

<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=celex%3A32005L0061>

15. Directive 2005/62/CE de la Commission du 30 septembre 2005 p... - EUR-Lex [Internet]. [cité 26 oct 2020]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/LSU/?uri=celex:32005L0062>

16. Commission Directive 2009/135/EC of 3 November 2009 allowing temporary derogations to certain eligibility criteria for whole blood and blood components donors laid down in Annex III to Directive 2004/33/EC in the context of a risk of shortage caused by the Influenza A(H1N1) pandemic (Text with EEA relevance) [Internet]. 288, 32009L0135 nov 4, 2009. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/dir/2009/135/oj/eng>

17. EUR-Lex - 32011L0038 - EN - EUR-Lex [Internet]. [cité 26 oct 2020]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/ALL/?uri=CELEX%3A32011L0038>

18. EUR-Lex - 32014L0110 - EN - EUR-Lex [Internet]. [cité 26 oct 2020]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/?uri=CELEX%3A32014L0110>

19. Directive (UE) 2016/1214 de la Commission du 25 juillet 2016 modifiant la directive 2005/62/CE en ce qui concerne les normes et spécifications applicables au système de qualité dans les établissements de transfusion sanguine (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [Internet]. 199, 32016L1214 juill 26, 2016. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/dir/2016/1214/oj/fra>

20. Arrêté du 17 décembre 2019 fixant les critères de sélection des donneurs de sang.

21. Titre II : Sang humain (Articles L1220-1 à L1223-8) - Légifrance [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section_lc/LEGITEXT000006072665/LEGISCTA000006154985/#LEGISCTA000006154985

22. Les partenaires institutionnels de l'EFS [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <http://www.efs.sante.fr/lefs-nos-parties-prenantes/les-partenaires-institutionnels-de-lefs>

23. Accueil | l'Etablissement français du sang [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.efs.sante.fr/>

24. Produits sanguins labiles - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/Produits-de-sante/Produits-sanguins-labiles>

25. Loi n° 93-5 du 4 janvier 1993 relative à la sécurité en matière de transfusion sanguine et de médicament. - Légifrance [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000178299/2020-11-01/>

26. L'organisation du don de sang - Etablissement français du sang | Etablissement français du sang [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <https://dondesang.efs.sante.fr/comprendre/comment-est-organise-le-don-de-sang>

27. La Cour des comptes demande à l'EFS de réfléchir à l'indemnisation des donneurs de plasma, hors de question pour les syndicats [Internet]. LCI. [cité 26 oct 2020]. Disponible sur: <https://www.lci.fr/population/la-cour-des-comptes-demande-a-l-efs-de-reflechir-a-l-indemnisation-des-donneurs-de-plasma-hors-de-question-pour-les-syndicats-2112203.html>

28. Don du sang [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.service-public.fr/particuliers/vosdroits/F2376>
29. EFS_questionnaire_preable au don_METROPOLE_210X297_v10 mars 2019_BD.pdf [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: https://dondesang.efs.sante.fr/sites/default/files/EFS_questionnaire_preable%20au%20don_METROPOLE_210X297_v10%20mars%202019_BD.pdf
30. Web S. La Qualification Biologique du Don assure la sécurité du receveur [Internet]. Tout sur la transfusion. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.toutsurlatransfusion.com/preparation-qualification-biologique-du-don/qualification/interet.php>
31. Chapitre Ier : Collecte, préparation et conservation du sang, de ses composants et des produits sanguins labiles. (Articles L1221-1 à L1221-14) - Légifrance [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section_lc/LEGITEXT000006072665/LEGISCTA000006171018/#LEGISCTA000006171018
32. L'après don - Etablissement français du sang | Etablissement français du sang [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <https://dondesang.efs.sante.fr/donner-les-etapes-du-don/lefs-et-vous>
33. L'hémovigilance et son organisation - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 26 oct 2020]. Disponible sur: [https://www.ansm.sante.fr/Declarer-un-effet-indesirable/Hemovigilance/L-hemovigilance-et-son-organisation/\(offset\)/0#psl](https://www.ansm.sante.fr/Declarer-un-effet-indesirable/Hemovigilance/L-hemovigilance-et-son-organisation/(offset)/0#psl)
34. CISMef. CISMef [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <http://www.chu-rouen.fr/page/mesh-descripteur/buffy-coat>
35. Circulaire N° DGS/DH/98/118 du 20 février 1998 [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <http://hemovigilance-cncrh.fr/www2/reglementation/1998/20021998.HTM>
36. Article D1221-6 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: https://circulaire.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000037924559
37. Weltgesundheitsorganisation, éditeur. WHO Guidelines on tissue infectivity distribution in transmissible spongiform encephalopathies. Geneva: World Health Organization; 2006. 53 p.
38. Irsch J, Lin L. Pathogen Inactivation of Platelet and Plasma Blood Components for Transfusion Using the INTERCEPT Blood System™. Transfus Med Hemother [Internet]. févr 2011 [cité 1 nov 2020];38(1):19-31. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3132977/>
39. prd-tds_00121-fr_v7.0_secured.pdf [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: https://www.interceptbloodsystem.com/sites/default/files/resources/prd-tds_00121-fr_v7.0_secured.pdf
40. Généralisation de la mesure d'atténuation des pathogènes susceptibles d'être présents dans les concentrés de plaquettes [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <http://www.efs.sante.fr/generalisation-de-la-mesure-dattenuation-des-pathogenes-susceptibles-detre-presents-dans-les>

41. Marschner S, Goodrich R. Pathogen Reduction Technology Treatment of Platelets, Plasma and Whole Blood Using Riboflavin and UV Light. *Transfus Med Hemother* [Internet]. févr 2011 [cité 1 nov 2020];38(1):8-18. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3132976/>
42. Prowse CV. Component pathogen inactivation: a critical review. *Vox Sanguinis* [Internet]. 2013 [cité 1 nov 2020];104(3):183-99. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1423-0410.2012.01662.x>
43. Gravemann U, Handke W, Müller TH, Seltsam A. Bacterial inactivation of platelet concentrates with the THERAFLEX UV-Platelets pathogen inactivation system. *Transfusion*. 2019;59(4):1324-32.
44. Décision du 10/07/2018 définissant les principes de bonnes pratiques prévues à l'article L.1222-12 du code de la santé publique - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/Decisions/Generiques-biosimilaires-medicaments-en-acces-direct-depot-de-publicite-PSL-MDS-bonnes-pratiques-Bonnes-pratiques/Decision-du-10-07-2018-definissant-les-principes-de-bonnes-pratiques-prevues-a-l-article-L.1222-12-du-code-de-la-sante-publique>
45. Chou ML, Burnouf T. Current methods to manufacture human platelet lysates for cell therapy and tissue engineering: possible trends in product safety and standardization. *ISBT Science Series* [Internet]. 2017 [cité 1 nov 2020];12(1):168-75. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/voxs.12316>
46. Standardization of platelet releasate products for clinical applications in cell therapy: a mathematical approach | *Journal of Translational Medicine* | Full Text [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <https://translational-medicine.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12967-017-1210-z>
47. Viau S, Eap S, Chabrand L, Lagrange A, Delorme B. Viral inactivation of human platelet lysate by gamma irradiation preserves its optimal efficiency in the expansion of human bone marrow mesenchymal stromal cells. *Transfusion*. 2019;59(3):1069-79.
48. Classification de la filtration | glossaire [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <http://www.filtrotechnic.fr/glossaire/classification-filtration.html>
49. Shih DT-B, Burnouf T. Preparation, quality criteria, and properties of human blood platelet lysate supplements for ex vivo stem cell expansion. *N Biotechnol* [Internet]. 25 janv 2015 [cité 1 nov 2020];32(1):199-211. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7102808/>
50. Thursday, November 20, Share 2014. UV-C Irradiation: A New Viral Inactivation Method for Biopharmaceuticals [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <http://www.americanpharmaceuticalreview.com/Featured-Articles/169257-UV-C-Irradiation-A-New-Viral-Inactivation-Method-for-Biopharmaceuticals/>
51. Ultrafiltration, nanofiltration et l'osmose inverse [Internet]. Safe Drinking Water Foundation. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.safewater.org/french-fact-sheets/2017/2/5/uf-nf-osmose-inverse>
52. European Pharmacopoeia Online [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <https://pheur.edqm.eu/subhome/10-0>
53. Human Platelet Lysate - Macopharma [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur:

<https://platelet-lysate.macopharma.com/multipli/>

54. Contexte et Mission - Pharmacopée européenne [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.edqm.eu/fr/Pharmacop%C3%A9e-Europ%C3%A9enne-contexte-mission>
55. Bieback K. Platelet Lysate as Replacement for Fetal Bovine Serum in Mesenchymal Stromal Cell Cultures. *Transfus Med Hemother* [Internet]. 2013 [cité 1 nov 2020];40(5):326-35. Disponible sur: <https://www.karger.com/Article/FullText/354061>
56. Arthrose | la rhumatologie pour tous [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <https://public.larhumatologie.fr/grandes-maladies/arthrose/>
57. Traitement Acide hyaluronique [Internet]. Mon arthrose. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <http://www.mon-arthrose.com/traitements/acide-hyaluronique/>
58. Alopecie - Quelles causes? - Fiches santé et conseils médicaux [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <https://sante.lefigaro.fr/sante/maladie/alopecie/quelles-causes>
59. Sérum de veau fœtal : 5 questions autour de son utilisation [Internet]. Recherche animale. [cité 2 janv 2020]. Disponible sur: <https://www.recherche-animale.org/serum-de-veau-foetal-5-questions-autour-de-son-utilisation>
60. GUIDELINE ON HUMAN CELL-BASED MEDICINAL PRODUCTS. 2008;25.
61. Multifaceted regenerative lives of ‘expired’ platelets - Burnouf - 2018 - ISBT Science Series - Wiley Online Library [Internet]. [cité 1 nov 2020]. Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/voxs.12415>
62. Weltgesundheitsorganisation, éditeur. WHO Guidelines on tissue infectivity distribution in transmissible spongiform encephalopathies. Geneva: World Health Organization; 2006. 53 p.
63. Guideline on the use of bovine serum in the manufacture of human biological medicinal products. :8.
64. The Positive Effects of Different Platelet-Rich Plasma Methods on Human Muscle, Bone, and Tendon Cells - Augustus D. Mazzocca, Mary Beth R. McCarthy, David M. Chowaniec, Evan M. Dugdale, Derek Hansen, Mark P. Cote, James P. Bradley, Anthony A. Romeo, Robert A. Arciero, Knut Beitzel, 2012 [Internet]. [cité 10 févr 2020]. Disponible sur: <https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0363546512452713>
65. LOI n° 2012-300 du 5 mars 2012 relative aux recherches impliquant la personne humaine - Dossiers législatifs - Légifrance [Internet]. [cité 6 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/dossierlegislatif/JORFDOLE000020142132/>
66. Décret n°2007-1220 du 10 août 2007 relatif au prélèvement, à la conservation et à la préparation à des fins scientifiques d’éléments du corps humain et modifiant le code de la santé publique (dispositions réglementaires). - Légifrance [Internet]. [cité 6 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000829163/2020-11-06/>
67. Décret n° 2016-1537 du 16 novembre 2016 relatif aux recherches impliquant la personne humaine - Légifrance [Internet]. [cité 6 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000033394083/>

68. Sous-section 2 : Organismes assurant la conservation et la préparation de tissus et de cellules issus du corps humain en vue de leur cession pour un usage scientifique (Articles R1243-57 à R1243-66) - Légifrance [Internet]. [cité 6 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000035996811/2017-11-11/>
69. Chapitre III : Préparation, conservation et utilisation des tissus, des cellules et de leurs dérivés. (Articles L1243-1 à L1243-9) - Légifrance [Internet]. [cité 6 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000025449694/2012-03-07/>
70. CODECOH [Internet]. [cité 6 nov 2020]. Disponible sur: https://appliweb.dgri.education.fr/appli_web/codecoh/IdentCodec.jsp
71. Sous-section 1 : Organismes assurant la conservation et la préparation de tissus et de cellules issus du corps humain pour les besoins de leurs propres programmes de recherche (Articles R1243-49 à R1243-56) - Légifrance [Internet]. [cité 6 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000035996780/2017-11-11/>
72. Schema_declaration_101117.jpg (960×720) [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://appliweb.dgri.education.fr/appli_web/codecoh/infos/Schema_declaration_101117.jpg
73. Schema_autorisation_101117.jpg (960×720) [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://appliweb.dgri.education.fr/appli_web/codecoh/infos/Schema_autorisation_101117.jpg
74. Article L1235-1 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000006686186/2004-08-07
75. Article L1245-5 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000034079655/2017-02-25
76. Article L1221-12 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000034079641/2017-02-25
77. Arrêté du 20 avril 2000 fixant le modèle de dossier de demande d'autorisation d'activité d'importation et d'exportation à des fins scientifiques d'organes, de tissus et de leurs dérivés, et de cellules du corps humain - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000583904>
78. Article R1235-9 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000025788445/
79. Article L1243-2 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000025104376/2012-05-01
80. Schema_procedure_import-export.pdf [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://appliweb.dgri.education.fr/appli_web/codecoh/infos/Schema_procedure_import-export.pdf
81. Article R1245-2 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000034288055/2017-03-26
82. Bonnes pratiques de fabrication de médicaments à usage humain - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.ansm.sante.fr/Activites/Elaboration-de-bonnes-pratiques/Bonnes-pratiques-de->

fabrication-de-medicaments-a-usage-humain/(offset)/4

83. Arrêté du 23 avril 2004 fixant les normes et protocoles applicables aux essais analytiques, toxicologiques et pharmacologiques ainsi qu'à la documentation clinique auxquels sont soumis les médicaments ou produits mentionnés à l'article L. 5121-8 du code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000436679/2020-11-07/>
84. 2001_83_cons2009_fr.pdf [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/dir_2001_83_cons2009/2001_83_cons2009_fr.pdf
85. Règlement (CE) n° 726/2004 du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 établissant des procédures communautaires pour l'autorisation et la surveillance en ce qui concerne les médicaments à usage humain et à usage vétérinaire, et instituant une Agence européenne des médicaments (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [Internet]. OJ L, 32004R0726 avr 30, 2004. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/reg/2004/726/oj/fra>
86. EUR-Lex - 32007R1394 - EN - EUR-Lex [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/ALL/?uri=CELEX%3A32007R1394>
87. LOI n° 2011-302 du 22 mars 2011 portant diverses dispositions d'adaptation de la législation au droit de l'Union européenne en matière de santé, de travail et de communications électroniques (1). 2011-302 mars 22, 2011.
88. Larousse É. Définitions : biotechnologie - Dictionnaire de français Larousse [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.larousse.fr/dictionnaires/francais/biotechnologie/9475>
89. L'AMM et le parcours du médicament - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: [https://www.ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-de-Mise-sur-le-Marche-AMM/L-AMM-et-le-parcours-du-medicament/\(offset\)/3](https://www.ansm.sante.fr/Activites/Autorisations-de-Mise-sur-le-Marche-AMM/L-AMM-et-le-parcours-du-medicament/(offset)/3)
90. Article L1243-1 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000006686214/
91. Titre II : Médicaments à usage humain (Articles L5121-1 à L5127-6) - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section_lc/LEGITEXT000006072665/LEGISCTA000006155085/#LEGISCTA000006155085
92. Titre IV : Tissus, cellules, produits du corps humain et leurs dérivés (Articles L1241-1 à L1245-8) - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section_lc/LEGITEXT000006072665/LEGISCTA000006154988/#LEGISCTA000006154988
93. 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]. 102, 32004L0023 avr 7, 2004. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/dir/2004/23/oj/fra>
94. Schallmoser K, Rohde E, Bartmann C, Obenauf AC, Reinisch A, Strunk D. Platelet-derived

growth factors for GMP-compliant propagation of mesenchymal stromal cells. *Biomed Mater Eng.* 2009;19(4-5):271-6.

95. Décision du 2 juillet 2015 précisant la forme et le contenu du dossier de demande d'autorisation prévue à l'article L.1243-2 du CSP [Internet]. Disponible sur: https://www.ansm.sante.fr/content/download/78893/999429/version/1/file/decision_02072015_forme-contenu-dossier-autorisation2.pdf
96. Sous-section 2 : Procédure d'autorisation. (Articles R1243-4 à R1243-8) - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000006909204/2004-08-07/>
97. Chapitre V : Dispositions communes. (Articles L1245-1 à L1245-8) - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000025139266/2012-05-01/>
98. Décret n° 2017-786 du 5 mai 2017 modifiant divers décrets portant statut particulier des personnels enseignants et d'éducation du ministère chargé de l'éducation nationale. 2017-786 mai 5, 2017.
99. Article L5111-1 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000006689867/
100. Chapitre VIII : Matières premières à usage pharmaceutique. (Articles L5138-1 à L5138-6) - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000026809083/2012-12-22/>
101. Décision du 24 février 2015 fixant la forme et le contenu de la demande d'autorisation des activités de fabrication, d'importation ou de distribution de substances actives, et de la déclaration des activités de fabrication, d'importation ou de distribution d'excipients prévues à l'article L. 5138-1 du code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000030391149>
102. Bonnes pratiques de distribution en gros - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: [https://www.ansm.sante.fr/Activites/Elaboration-de-bonnes-pratiques/Bonnes-pratiques-de-distribution-en-gros/\(offset\)/9](https://www.ansm.sante.fr/Activites/Elaboration-de-bonnes-pratiques/Bonnes-pratiques-de-distribution-en-gros/(offset)/9)
103. Chapitre III : Conservation et utilisation des tissus et cellules. (Articles L1243-1 à L1243-7) - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000006686223/2004-07-13/>
104. Chapitre V : Dispositions communes. (Articles L1235-1 à L1235-7) - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000006686186/2004-08-07/>
105. Biovigilance - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 13 févr 2020]. Disponible sur: [https://www.ansm.sante.fr/Declarer-un-effet-indesirable/Biovigilance/Biovigilance/\(offset\)/0](https://www.ansm.sante.fr/Declarer-un-effet-indesirable/Biovigilance/Biovigilance/(offset)/0)
106. Recherche et développement [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.leem.org/recherche-et-developpement>

107. Bonnes pratiques de laboratoire - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: [https://www.anism.sante.fr/Activites/Elaboration-de-bonnes-pratiques/Bonnes-pratiques-de-laboratoire/\(offset\)/7](https://www.anism.sante.fr/Activites/Elaboration-de-bonnes-pratiques/Bonnes-pratiques-de-laboratoire/(offset)/7)
108. Feroyard A. Constitution d'un dossier d'autorisation de mise sur le marché d'un médicament à usage humain et ses différentes procédures d'enregistrement en Europe [Internet]. undefined. 2014 [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: </paper/Constitution-d%27un-dossier-d%27autorisation-de-mise-le-Feroyard/b9add6f069c6417658ea364c956626e1e665bd21/figure/0>
109. Article R5121-25 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000026903038
110. Chapitre Ier : Dispositions générales. (Articles L5121-1 à L5121-21) - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000025104483/2012-05-01/>
111. Paragraphe 4 : Dispositions communes aux deux procédures (Articles R5121-51-4 à R5121-51-7) - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000025788060/2012-05-01/>
112. Chapitre IV : Fabrication et distribution en gros. (Articles L5124-1 à L5124-18) - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000006689996/2000-06-22/>
113. Anonymous. Good manufacturing practice [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/compliance/good-manufacturing-practice>
114. Le médicament: un parcours encadré [Internet]. www.euractiv.fr. 2017 [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.euractiv.fr/section/sante-modes-de-vie/infographic/le-medicament-un-parcours-encadre/>
115. Qu'est ce qu'un essai clinique? - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: [https://www.anism.sante.fr/Activites/Essais-cliniques/Qu-est-ce-qu-un-essai-clinique/\(offset\)/4](https://www.anism.sante.fr/Activites/Essais-cliniques/Qu-est-ce-qu-un-essai-clinique/(offset)/4)
116. Loi n° 2004-806 du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique (1).
117. Glossaire relatif aux essais cliniques - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.anism.sante.fr/Activites/Essais-cliniques/Repertoires-des-essais-cliniques-de-medicaments/Repertoires-des-essais-cliniques-de-medicaments/Glossaire-relatif-aux-essais-cliniques>
118. EUR-Lex - 32001L0020 - EN - EUR-Lex [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/fr/ALL/?uri=CELEX%3A32001L0020>
119. Chapitre Ier : Principes généraux relatifs aux recherches impliquant la personne humaine (Articles L1121-1 à L1121-17) - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000032722842/2018-01-15/>
120. Section 1 : Champ d'application et définitions (Articles R5124-1 à R5124-15) - Légifrance

[Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur:

<https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000033857013/2017-01-12/>

121. Chapitre VI : Pharmacies à usage intérieur. (Articles L5126-1 à L5126-11) - Légifrance

[Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur:

<https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000033621036/2017-07-01/>

122. Sous-section 2 : Missions et activités des pharmacies à usage intérieur (Articles R5126-8 à R5126-11) - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur:

<https://www.legifrance.gouv.fr/codes/id/LEGIARTI000038598073/2019-05-24/>

123. Article L1121-13 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020].

Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000036515061/2018-01-19

124. Titre II : Recherches impliquant la personne humaine (Articles L1121-1 à L1126-12) - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur:

https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section_lc/LEGITEXT000006072665/LEGISCTA000006154978/#LEGISCTA000025457387

125. Avis aux promoteurs - Formulaires - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur:

[https://www.anism.sante.fr/Activites/Medicaments-et-produits-biologiques/Avis-aux-promoteurs-Formulaires/\(offset\)/6](https://www.anism.sante.fr/Activites/Medicaments-et-produits-biologiques/Avis-aux-promoteurs-Formulaires/(offset)/6)

126. Obtenir le numéro EudraCT - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur:

[https://www.anism.sante.fr/Activites/Medicaments-et-produits-biologiques/Obtenir-le-numero-EudraCT/\(offset\)/7](https://www.anism.sante.fr/Activites/Medicaments-et-produits-biologiques/Obtenir-le-numero-EudraCT/(offset)/7)

127. Règlement (CE) n° 141/2000 du Parlement européen et du Conseil, du 16 décembre 1999, concernant les médicaments orphelins [Internet]. OJ L, 32000R0141 janv 22, 2000. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/reg/2000/141/oj/fra>

128. Arthrose [Internet]. Inserm - La science pour la santé. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur:

<https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/arthrose>

129. Public Health - European Commission [Internet]. Union Register of medicinal products. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://ec.europa.eu/health/documents/community-register/html/reg_od_act.htm?sort=a

130. Anonymous. Scientific advice and protocol assistance [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-advice-protocol-assistance>

131. reg_2000_141_cons-2009-07_fr.pdf [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur:

https://ec.europa.eu/health/sites/health/files/files/eudralex/vol-1/reg_2000_141_cons-2009-07/reg_2000_141_cons-2009-07_fr.pdf

132. Dhanani A. Les médicaments orphelins, procédure de désignation et d'autorisation. 2019 janv; Master II Affaires Réglementaires Européennes et Internationales des Produits de Santé (AREIPS).

133. Anonymous. Compassionate use [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cité 7 nov

2020]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/compassionate-use>

134. Article L5121-12-1 - Code de la santé publique - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/article_lc/LEGIARTI000041721223/2020-10-01

135. Qu'est ce qu'une autorisation temporaire d'utilisation? - ANSM : Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: [https://www.anism.sante.fr/Activites/Autorisations-temporaires-d-utilisation-ATU/Qu-est-ce-qu-une-autorisation-temporaire-d-utilisation/\(offset\)/1](https://www.anism.sante.fr/Activites/Autorisations-temporaires-d-utilisation-ATU/Qu-est-ce-qu-une-autorisation-temporaire-d-utilisation/(offset)/1)

136. Dhanani A. Procédure centralisée. 2018 nov; Master II Affaires Réglementaires Européennes et Internationales des Produits de Santé (AREIPS).

137. Sous-section 5 : Médicaments dérivés du sang (Articles R5121-181 à R5121-201) - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/codes/section_lc/LEGITEXT000006072665/LEGISCTA000006196563/#LEGISCTA000006196563

138. Directive 2003/63/CE de la Commission, du 25 juin 2003, modifiant la directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE) [Internet]. 159, 32003L0063 juin 27, 2003. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/dir/2003/63/oj/eng>

139. Anonymous. Committee for Advanced Therapies (CAT) [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/committees/committee-advanced-therapies-cat>

140. Médicaments de thérapie innovante, Médicaments de thérapie innovante préparé ponctuellement et préparations : Synthèse du cadre réglementaire applicable pour la fabrication, le développement et la mise sur le marché de ces produits. :32.

141. Directive 93/42/CEE du Conseil, du 14 juin 1993, relative aux dispositifs médicaux [Internet]. 169, 31993L0042 juill 12, 1993. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/dir/1993/42/oj/fra>

142. Directive 90/385/CEE du Conseil, du 20 juin 1990, concernant le rapprochement des législations des États membres relatives aux dispositifs médicaux implantables actifs [Internet]. 189, 31990L0385 juill 20, 1990. Disponible sur: <http://data.europa.eu/eli/dir/1990/385/oj/eng>

143. Article 3 - Décret n° 2012-1236 du 6 novembre 2012 relatif aux médicaments de thérapie innovante - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/article_jo/JORFARTI000026588877

144. Arrêté du 4 février 2013 fixant le contenu des demandes d'autorisation initiale, de renouvellement d'autorisation ou de modification d'autorisation des médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement et des établissements ou organismes qui préparent ces produits - Légifrance [Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur: <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000027062323/>

145. Décision du 20 mai 2015 relative aux principes de bonnes pratiques de préparation, de conservation, de distribution et de cession des médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement définis au 17° de l'article L. 5121-1 du code de la santé publique - Légifrance

[Internet]. [cité 7 nov 2020]. Disponible sur:

<https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000030747090/>

146. van der Valk J, Brunner D, De Smet K, Fex Svenningsen A, Honegger P, Knudsen LE, et al. Optimization of chemically defined cell culture media--replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. *Toxicol In Vitro*. juin 2010;24(4):1053-63.

147. Dhanani A. Avis scientifique (Scientific advice). 2018 nov; Master II Affaires Réglementaires Européennes et Internationales des Produits de Santé (AREIPS).

Titre : Lysat plaquettaire, statuts juridiques et autorisations nécessaires à son utilisation en Europe

Résumé : Le lysat plaquettaire est un produit liquide issu de don de sang humain, et en particulier de concentrés plaquettaires. Une fois collectés, les concentrés plaquettaires subissent des manipulations diverses menant à la lyse des plaquettes et de leur contenu. Certaines étapes de son procédé de fabrication sont variables et permettent ainsi d'obtenir différents types de lysats : lysat plaquettaire inactivé, lysat plaquettaire à 30% de plasma, lysat plaquettaire sans héparine... Les granules qui composent les plaquettes contiennent de nombreuses protéines, et notamment certains facteurs de croissance agissant dans la prolifération cellulaire. C'est pourquoi le lysat plaquettaire est utilisé aujourd'hui en tant que supplément de milieu de culture dans le cadre de la culture cellulaire, en remplacement du sérum de veau fœtal. Cependant, du fait de son contenu riche en molécules actives, certaines études analysent le potentiel intérêt d'une utilisation du lysat plaquettaire en thérapeutique. Si un tel usage s'avère possible, il faudra définir le statut juridique de ce produit. Trois possibilités sont envisageables en thérapeutique : deviendra-t-il une substance active, une préparation de thérapie cellulaire ou un médicament ? Si le lysat plaquettaire est un médicament, il s'agira de définir à quel sous-type il appartient. Chaque statut juridique conditionne les autorisations nécessaires à l'utilisation du produit en Europe. A ce jour, les connaissances ne permettent pas de statuer définitivement sur le cas du lysat plaquettaire et laissent la discussion ouverte sur sa désignation/son utilisation.

Mots clés : Lysat plaquettaire humain, Fabrication, Recherche, Thérapeutique, Substance active, Médicament, Statut juridique, Autorisation de mise sur le marché.

Title: Platelet lysate, legal status and authorizations required for its use in Europe

Abstract: Platelet lysate is a liquid product derived from human blood donations, particularly from platelet concentrates. Once collected, platelet concentrates undergo various manipulations leading to the lysis of the platelets and their contents. Certain steps in the manufacturing process are variable and thus make it possible to obtain different types of lysates: inactivated platelet lysate, 30% plasma platelet lysate, heparin-free platelet lysate, etc. The granules that make up the platelets contain numerous proteins, and in particular certain growth factors acting in cell proliferation. This is why platelet lysate is used today as a culture medium supplement in cell culture, replacing fetal calf serum. However, due to its rich content of active molecules, some studies are analyzing the potential interest of using platelet lysate in therapy. If such a use proves possible, the legal status of this product will have to be defined. Three possibilities are possible in therapeutics: will it become an active substance, a preparation for cell therapy or a drug? If the platelet lysate is a drug, it will be necessary to define to which subtype it belongs. Each legal status conditions the authorizations necessary for the use of the product in Europe. To date, knowledge does not allow a final decision on the case of platelet lysate and leaves open the discussion on its designation/use.

Keywords: Human Platelet Lysate, Manufacturing, Research, Therapeutic, Active Substance, Medicine, Legal status, Marketing Authorization.