



**HAL**  
open science

# Validation du système automatisé BacT/ALERT®3D pour la détection des contaminations microbiologiques des milieux de culture de cellules épithéliales

Vincent Langeron

► **To cite this version:**

Vincent Langeron. Validation du système automatisé BacT/ALERT®3D pour la détection des contaminations microbiologiques des milieux de culture de cellules épithéliales. Sciences du Vivant [q-bio]. 2010. hal-01731999

**HAL Id: hal-01731999**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01731999>**

Submitted on 14 Mar 2018

**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.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



Validation du système automatisé BacT/ALERT®3D  
Pour la détection des contaminations microbiologiques  
Des milieux de culture de cellules épithéliales.

Thèse

Présentée à l'Université Claude Bernard -Lyon 1

et soutenue publiquement le 29 septembre 2010

pour obtenir le grade de Docteur en Médecine

par

M Vincent Langeron

Né(e) le 7 mai 1976

A Oullins (69)

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ, NANCY 1  
**FACULTÉ DE MÉDECINE DE NANCY**

-----  
**Président de l'Université : Professeur Jean-Pierre FINANCE**  
**Doyen de la Faculté de Médecine : Professeur Henry COUDANE**

**Vice Doyen Recherche : Professeur Jean-Louis GUEANT**

**Vice Doyen Pédagogie : Professeur Annick BARBAUD**

**Vice Doyen Campus : Professeur Marie-Christine BÉNÉ**

**Assesseurs :**

du 1<sup>er</sup> Cycle : **M. Christophe NEMOS**

du 2<sup>ème</sup> Cycle : **M. le Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI**

du 3<sup>ème</sup> Cycle : **M. le Professeur Pierre-Edouard BOLLAERT**

Filières professionnalisées : **M. le Professeur Christophe CHOSEROT**

Prospective : **M. le Professeur Laurent BRESLER**

FMC/EPP : **M. le Professeur Jean-Dominique DE KORWIN**

**DOYENS HONORAIRES**

Professeur Adrien DUPREZ – Professeur Jean-Bernard DUREUX

Professeur Jacques ROLAND – Professeur Patrick NETTER

=====

**PROFESSEURS HONORAIRES**

Pierre ALEXANDRE – Jean-Marie ANDRE - Daniel ANTHOINE - Alain BERTRAND - Pierre BEY - Jean  
BEUREY

Jacques BORRELLY - Michel BOULANGE - Jean-Claude BURDIN - Claude BURLET - Daniel BURNEL  
- Claude CHARDOT

Jean-Pierre CRANCE - Gérard DEBRY - Jean-Pierre DELAGOUTTE - Emile de LAVERGNE - Jean-Pierre  
DESCHAMPS

Michel DUC - Jean DUHEILLE - Adrien DUPREZ - Jean-Bernard DUREUX - Gabriel FAIVRE – Gérard  
FIEVE - Jean FLOQUET

Robert FRISCH - Alain GAUCHER - Pierre GAUCHER - Hubert GERARD - Jean-Marie  
GILGENKRANTZ

Simone GILGENKRANTZ - Oliéro GUERCI - Pierre HARTEMANN - Claude HURIET – Christian  
JANOT - Jacques LACOSTE

Henri LAMBERT - Pierre LANDES - Alain LARCAN - Marie-Claire LAXENAIRE - Michel LAXENAIRE  
- Jacques LECLERE

Pierre LEDERLIN - Bernard LEGRAS - Michel MANCIAUX - Jean-Pierre MALLIÉ - Pierre MATHIEU  
Denise MONERET-VAUTRIN - Pierre NABET - Jean-Pierre NICOLAS - Pierre PAYSANT - Francis  
PENIN - Gilbert PERCEBOIS

Claude PERRIN - Guy PETIET - Luc PICARD - Michel PIERSON - Jean-Marie POLU - Jacques POUREL  
- Jean PREVOT

Antoine RASPILLER - Michel RENARD - Jacques ROLAND - René-Jean ROYER - Paul SADOUL -  
Daniel SCHMITT

Jean SOMMELET - Danièle SOMMELET - Michel STRICKER - Gilbert THIBAUT - Augusta TREHEUX  
- Hubert UFFHOLTZ

Gérard VAILLANT - Paul VERT - Colette VIDAILHET - Michel VIDAILHET - Michel WAYOFF -  
Michel WEBER

=====

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS**  
**PRATICIENS HOSPITALIERS**

(Disciplines du Conseil National des Universités)

**42<sup>ème</sup> Section : MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Anatomie)**

Professeur Gilles GROSDIDIER

Professeur Pierre LASCOMBES – Professeur Marc BRAUN

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cytologie et histologie)**

Professeur Bernard FOLIGUET

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Anatomie et cytologie pathologiques)**

Professeur François PLENAT – Professeur Jean-Michel VIGNAUD

-----  
**43<sup>ème</sup> Section : BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Biophysique et médecine nucléaire)**

Professeur Gilles KARCHER – Professeur Pierre-Yves MARIE – Professeur Pierre OLIVIER

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Radiologie et imagerie médicale)**

Professeur Denis REGENT – Professeur Michel CLAUDON

Professeur Serge BRACARD – Professeur Alain BLUM – Professeur Jacques FELBLINGER

Professeur René ANXIONNAT

**44<sup>ème</sup> Section : BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET NUTRITION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Biochimie et biologie moléculaire)**

Professeur Jean-Louis GUÉANT – Professeur Jean-Luc OLIVIER – Professeur Bernard NAMOUR

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Physiologie)**

Professeur François MARCHAL – Professeur Bruno CHENUÉL – Professeur Christian BEYAERT

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Biologie Cellulaire)**

Professeur Ali DALLOUL

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Nutrition)**

Professeur Olivier ZIEGLER – Professeur Didier QUILLIOT

-----  
**45<sup>ème</sup> Section : MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Bactériologie – virologie ; hygiène hospitalière)**

Professeur Alain LE FAOU - Professeur Alain LOZNIÉWSKI

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Maladies infectieuses ; maladies tropicales)**

Professeur Thierry MAY – Professeur Christian RABAUD

-----  
**46<sup>ème</sup> Section : SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Épidémiologie, économie de la santé et prévention)**

Professeur Philippe HARTEMANN – Professeur Serge BRIANÇON

Professeur Francis GUILLEMIN – Professeur Denis ZMIROU-NAVIER

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Médecine et santé au travail)**

Professeur Christophe PARIS

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Médecine légale et droit de la santé)**

Professeur Henry COUDANE

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication)**

Professeur François KOHLER – Professeur Éliane ALBUISSON

-----  
**47<sup>ème</sup> Section : CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Hématologie ; transfusion)**

Professeur Thomas LECOMPTE – Professeur Pierre BORDIGONI

Professeur Jean-François STOLTZ – Professeur Pierre FEUGIER

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cancérologie ; radiothérapie)**

Professeur François GUILLEMIN – Professeur Thierry CONROY

Professeur Didier PEIFFERT – Professeur Frédéric MARCHAL

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Immunologie)**

Professeur Gilbert FAURE – Professeur Marie-Christine BENE

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Génétique)**

Professeur Philippe JONVEAUX – Professeur Bruno LEHEUP

-----  
**48<sup>ème</sup> Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE, PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Anesthésiologie et réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence)**

Professeur Claude MEISTELMAN – Professeur Hervé BOUAZIZ

Professeur Paul-Michel MERTES – Professeur Gérard AUDIBERT

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Réanimation médicale ; médecine d'urgence)**

Professeur Alain GERARD - Professeur Pierre-Édouard BOLLAERT

Professeur Bruno LÉVY – Professeur Sébastien GIBOT

**3<sup>ème</sup> sous-section : (Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique ; addictologie)**

Professeur Patrick NETTER – Professeur Pierre GILLET

**4<sup>ème</sup> sous-section : (Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie)**

Professeur François PAILLE – Professeur Gérard GAY – Professeur Faiez ZANNAD

**49<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE NERVEUSE ET MUSCULAIRE, PATHOLOGIE MENTALE, HANDICAP et RÉÉDUCATION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Neurologie)**

Professeur Gérard BARROCHE – Professeur Hervé VESPIGNANI

Professeur Xavier DUCROCQ – Professeur Marc DEBOUVERIE

**2<sup>ème</sup> sous-section : (Neurochirurgie)**

Professeur Jean-Claude MARCHAL – Professeur Jean AUQUE  
Professeur Thierry CIVIT  
**3<sup>ème</sup> sous-section : (Psychiatrie d'adultes ; addictologie)**  
Professeur Jean-Pierre KAHN – Professeur Raymund SCHWAN  
**4<sup>ème</sup> sous-section : (Pédopsychiatrie ; addictologie)**  
Professeur Daniel SIBERTIN-BLANC – Professeur Bernard KABUTH  
**5<sup>ème</sup> sous-section : (Médecine physique et de réadaptation)**  
Professeur Jean PAYSANT

-----  
**50<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE OSTÉO-ARTICULAIRE, DERMATOLOGIE et CHIRURGIE PLASTIQUE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Rhumatologie)**  
Professeur Isabelle CHARY-VALCKENAERE – Professeur Damien LOEUILLE  
**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie orthopédique et traumatologique)**  
Professeur Daniel MOLE - Professeur Didier MAINARD  
Professeur François SIRVEAUX – Professeur Laurent GALOIS  
**3<sup>ème</sup> sous-section : (Dermato-vénérologie)**  
Professeur Jean-Luc SCHMUTZ – Professeur Annick BARBAUD  
**4<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie)**  
Professeur François DAP – Professeur Gilles DAUTEL

-----  
**51<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE CARDIORESPIRATOIRE et VASCULAIRE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Pneumologie ; addictologie)**  
Professeur Yves MARTINET – Professeur Jean-François CHABOT – Professeur Ari CHAOUAT  
**2<sup>ème</sup> sous-section : (Cardiologie)**  
Professeur Etienne ALIOT – Professeur Yves JUILLIERE – Professeur Nicolas SADOUL  
Professeur Christian de CHILLOU  
**3<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie thoracique et cardiovasculaire)**  
Professeur Jean-Pierre VILLEMOT - Professeur Jean-Pierre CARTEAUX – Professeur Loïc MACÉ  
**4<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire)**  
Professeur Denis WAHL – Professeur Sergueï MALIKOV

-----  
**52<sup>ème</sup> Section : MALADIES DES APPAREILS DIGESTIF et URINAIRE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Gastroentérologie ; hépatologie ; addictologie)**  
Professeur Marc-André BIGARD - Professeur Jean-Pierre BRONOWICKI – Professeur Laurent PEYRIN-  
BIROULET  
**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie digestive)**  
**3<sup>ème</sup> sous-section : (Néphrologie)**  
Professeur Michèle KESSLER – Professeur Dominique HESTIN – Professeur Luc FRIMAT  
**4<sup>ème</sup> sous-section : (Urologie)**  
Professeur Philippe MANGIN – Professeur Jacques HUBERT – Professeur Pascal ESCHWEGE

-----  
**53<sup>ème</sup> Section : MÉDECINE INTERNE, GÉRIATRIE et CHIRURGIE GÉNÉRALE**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Médecine interne ; gériatrie et biologie du vieillissement ; médecine générale ; addictologie)**  
Professeur Jean-Dominique DE KORWIN – Professeur Pierre KAMINSKY  
Professeur Athanase BENETOS - Professeur Gisèle KANNY  
**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie générale)**  
Professeur Patrick BOISSEL – Professeur Laurent BRESLER  
Professeur Laurent BRUNAUD – Professeur Ahmet AYAV

**54<sup>ème</sup> Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-OBSTÉTRIQUE, ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Pédiatrie)**  
Professeur Pierre MONIN - Professeur Jean-Michel HASCOET - Professeur Pascal CHASTAGNER  
Professeur François FEILLET - Professeur Cyril SCHWEITZER  
**2<sup>ème</sup> sous-section : (Chirurgie infantile)**  
Professeur Michel SCHMITT – Professeur Pierre JOURNEAU – Professeur Jean-Louis LEMELLE  
**3<sup>ème</sup> sous-section : (Gynécologie-obstétrique ; gynécologie médicale)**  
Professeur Michel SCHWEITZER – Professeur Jean-Louis BOUTROY  
Professeur Philippe JUDLIN – Professeur Patricia BARBARINO  
**4<sup>ème</sup> sous-section : (Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques ; gynécologie médicale)**  
Professeur Georges WERYHA – Professeur Marc KLEIN – Professeur Bruno GUERCI

-----  
**55<sup>ème</sup> Section : PATHOLOGIE DE LA TÊTE ET DU COU**

**1<sup>ère</sup> sous-section : (Oto-rhino-laryngologie)**  
Professeur Claude SIMON – Professeur Roger JANKOWSKI

2<sup>ème</sup> sous-section : (*Ophthalmologie*)  
Professeur Jean-Luc GEORGE – Professeur Jean-Paul BERROD – Professeur Karine ANGIOI-DUPREZ  
3<sup>ème</sup> sous-section : (*Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie*)  
Professeur Jean-François CHASSAGNE – Professeur Etienne SIMON

=====

**PROFESSEURS DES UNIVERSITÉS**  
64<sup>ème</sup> Section : **BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**  
Professeur Sandrine BOSCHI-MULLER

=====

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS  
HOSPITALIERS**

42<sup>ème</sup> Section : **MORPHOLOGIE ET MORPHOGENÈSE**

1<sup>ère</sup> sous-section : (*Anatomie*)

Docteur Bruno GRIGNON – Docteur Thierry HAUMONT

2<sup>ème</sup> sous-section : (*Cytologie et histologie*)

Docteur Edouard BARRAT - Docteur Françoise TOUATI – Docteur Chantal KOHLER

3<sup>ème</sup> sous-section : (*Anatomie et cytologie pathologiques*)

Docteur Béatrice MARIE

-----

43<sup>ème</sup> Section : **BIOPHYSIQUE ET IMAGERIE MÉDICALE**

1<sup>ère</sup> sous-section : (*Biophysique et médecine nucléaire*)

Docteur Marie-Hélène LAURENS – Docteur Jean-Claude MAYER

Docteur Pierre THOUVENOT – Docteur Jean-Marie ESCANYE – Docteur Amar NAOUN

2<sup>ème</sup> sous-section : (*Radiologie et imagerie médicale*)

Docteur Damien MANDRY

-----

44<sup>ème</sup> Section : **BIOCHIMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLÉCULAIRE, PHYSIOLOGIE ET  
NUTRITION**

1<sup>ère</sup> sous-section : (*Biochimie et biologie moléculaire*)

Docteur Jean STRACZEK – Docteur Sophie FREMONT

Docteur Isabelle GASTIN – Docteur Marc MERTEN – Docteur Catherine MALAPLATE-ARMAND

Docteur Shyue-Fang BATTAGLIA

2<sup>ème</sup> sous-section : (*Physiologie*)

Docteur Nicole LEMAU de TALANCE

3<sup>ème</sup> sous-section : (*Biologie Cellulaire*)

Docteur Véronique DECOT-MAILLERET

4<sup>ème</sup> sous-section : (*Nutrition*)

Docteur Rosa-Maria RODRIGUEZ-GUEANT

45<sup>ème</sup> Section : **MICROBIOLOGIE, MALADIES TRANSMISSIBLES ET HYGIÈNE**

1<sup>ère</sup> sous-section : (*Bactériologie – Virologie ; hygiène hospitalière*)

Docteur Francine MORY – Docteur Véronique VENARD

2<sup>ème</sup> sous-section : (*Parasitologie et mycologie*)

Docteur Nelly CONTET-AUDONNEAU – Madame Marie MACHOUART

-----

46<sup>ème</sup> Section : **SANTÉ PUBLIQUE, ENVIRONNEMENT ET SOCIÉTÉ**

1<sup>ère</sup> sous-section : (*Epidémiologie, économie de la santé et prévention*)

Docteur Alexis HAUTEMANIÈRE – Docteur Frédérique CLAUDOT

3<sup>ème</sup> sous-section (*Médecine légale et droit de la santé*)

Docteur Laurent MARTRILLE

4<sup>ème</sup> sous-section : (*Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication*)

Docteur Pierre GILLOIS – Docteur Nicolas JAY

-----

47<sup>ème</sup> Section : **CANCÉROLOGIE, GÉNÉTIQUE, HÉMATOLOGIE, IMMUNOLOGIE**

1<sup>ère</sup> sous-section : (*Hématologie ; transfusion*)

Docteur François SCHOONEMAN

2<sup>ème</sup> sous-section : (*Cancérologie ; radiothérapie : oncologie (type mixte : biologique)*)

Docteur Lina BOLOTINE

3<sup>ème</sup> sous-section : (*Immunologie*)

Docteur Marcelo DE CARVALHO BITTENCOURT

4<sup>ème</sup> sous-section : (*Génétique*)



Docteur Christophe PHILIPPE – Docteur Céline BONNET

-----  
**48<sup>ème</sup> Section : ANESTHÉSIOLOGIE, RÉANIMATION, MÉDECINE D'URGENCE,  
PHARMACOLOGIE ET THÉRAPEUTIQUE**

**3<sup>ème</sup> sous-section :** (*Pharmacologie fondamentale ; pharmacologie clinique*)

Docteur Françoise LAPICQUE – Docteur Marie-José ROYER-MORROT – Docteur Nicolas GAMBIER

**4<sup>ème</sup> sous-section :** (*Thérapeutique ; médecine d'urgence ; addictologie*)

Docteur Patrick ROSSIGNOL

-----  
**50<sup>ème</sup> Section : RHUMATOLOGIE**

**1<sup>ère</sup> sous-section :** (*Rhumatologie*)

Docteur Anne-Christine RAT

-----  
**54<sup>ème</sup> Section : DÉVELOPPEMENT ET PATHOLOGIE DE L'ENFANT, GYNÉCOLOGIE-  
OBSTÉTRIQUE,**

**ENDOCRINOLOGIE ET REPRODUCTION**

**5<sup>ème</sup> sous-section :** (*Biologie et médecine du développement et de la reproduction ; gynécologie médicale*)

Docteur Jean-Louis CORDONNIER

=====

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES**

**5<sup>ème</sup> section : SCIENCE ÉCONOMIE GÉNÉRALE**

Monsieur Vincent LHUILLIER

-----  
**40<sup>ème</sup> section : SCIENCES DU MÉDICAMENT**

Monsieur Jean-François COLLIN

-----  
**60<sup>ème</sup> section : MÉCANIQUE, GÉNIE MÉCANIQUE ET GÉNIE CIVILE**

Monsieur Alain DURAND

-----  
**61<sup>ème</sup> section : GÉNIE INFORMATIQUE, AUTOMATIQUE ET TRAITEMENT DU SIGNAL**

Monsieur Jean REBSTOCK – Monsieur Walter BLONDEL

**64<sup>ème</sup> section : BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE**

Mademoiselle Marie-Claire LANHERS

-----  
**65<sup>ème</sup> section : BIOLOGIE CELLULAIRE**

Mademoiselle Françoise DREYFUSS – Monsieur Jean-Louis GELLY

Madame Ketsia HESS – Monsieur Hervé MEMBRE – Monsieur Christophe NEMOS

Madame Natalia DE ISLA – Monsieur Pierre TANKOSIC

-----  
**66<sup>ème</sup> section : PHYSIOLOGIE**

Monsieur Nguyen TRAN

-----  
**67<sup>ème</sup> section : BIOLOGIE DES POPULATIONS ET ÉCOLOGIE**

Madame Nadine MUSSE

=====

**MAÎTRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS**

**Médecine Générale**

Professeur associé Alain AUBREGE

Docteur Francis RAPHAEL

Docteur Jean-Marc BOIVIN

Docteur Jean-Louis ADAM

Docteur Elisabeth STEYER

=====

**PROFESSEURS ÉMÉRITES**

Professeur Daniel ANTHOINE - Professeur Pierre BEY - Professeur Michel BOULANGE  
Professeur Jean-Pierre CRANCE - Professeur Jean FLOQUET - Professeur Jean-Marie GILGENKRANTZ

Professeur Simone GILGENKRANTZ – Professeur Henri LAMBERT - Professeur Alain LARCAN  
Professeur Denise MONERET-VAUTRIN - Professeur Jean-Pierre NICOLAS – - Professeur Guy PETIET  
Professeur Luc PICARD - Professeur Michel PIERSON - Professeur Jacques POUREL  
Professeur Jacques ROLAND - - Professeur Michel STRICKER - Professeur Gilbert THIBAUT  
Professeur Paul VERT - Professeur Michel VIDAILHET

=====

### **DOCTEURS HONORIS CAUSA**

Professeur Norman SHUMWAY (1972)  
*Université de Stanford, Californie (U.S.A)*  
Professeur Théodore H. SCHIEBLER (1989)  
*Institut d'Anatomie de Würzburg (R.F.A)*  
Professeur Paul MICHIELSEN (1979)  
*Université Catholique, Louvain (Belgique)*  
Professeur Maria DELIVORIA-PAPADOPOULOS (1996)  
*Université de Pennsylvanie (U.S.A)*  
Professeur Charles A. BERRY (1982)  
*Centre de Médecine Préventive, Houston (U.S.A)*  
Professeur Mashaki KASHIWARA (1996)  
*Research Institute for Mathematical Sciences de Kyoto (JAPON)*  
Professeur Pierre-Marie GALETTI (1982)  
*Brown University, Providence (U.S.A)*  
Professeur Ralph GRÄSBECK (1996)  
*Université d'Helsinki (FINLANDE)*  
Professeur James STEICHEN (1997)  
*Université d'Indianapolis (U.S.A)*  
Professeur Mildred T. STAHLMAN (1982)  
*Wanderbilt University, Nashville (U.S.A)*  
Professeur Duong Quang TRUNG (1997)  
*Centre Universitaire de Formation et de Perfectionnement des*  
Harry J. BUNCKE (1989)  
*Université de Californie, San Francisco (U.S.A)*  
*Professionnels de Santé d'Hô Chi Minh-Ville (VIÊTNAM)*  
Professeur Daniel G. BICHET (2001)  
*Université de Montréal (Canada)*  
Professeur Marc LEVENSTON (2005)  
*Institute of Technology, Atlanta (USA)*  
Professeur Brian BURCHELL (2007)  
*Université de Dundee (Royaume Uni)*  
Professeur Mamish Nisbet MUNRO (1982)  
*Massachusetts Institute of Technology (U.S.A)*

# COMPOSITION DU JURY

## PRESIDENT

Monsieur le Professeur François-Noël Gilly

## MEMBRES

Monsieur le Professeur Richard Cohen

Madame le Docteur Odile Damour

Madame le Docteur Marie-Elisabeth Reverdy

# Remerciements

A mon président de thèse,

Monsieur le Professeur François-Noël Gilly

Au cours de mon externat, j'ai apprécié vos qualités pédagogiques et votre engagement pour vos étudiants.

Lors de mon internat, j'ai été très sensible à votre qualité d'écoute et votre soutien dans les moments difficiles.

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse et je vous en remercie.

Je vous assure de tout mon respect et de mon admiration.

A mes juges,

Madame le Docteur Odile Damour,

Vous avez eu la gentillesse de guider le présent travail. Vous avez su trouver la disponibilité pour le faire aboutir dans le temps (restreint) qui m'était imparti.

Vous m'avez fait découvrir une équipe de recherche dynamique et prolifique.

Je vous remercie d'avoir accepté d'encadrer et de juger ce travail.

Veillez croire en l'expression de ma profonde gratitude

Monsieur le Professeur Cohen,

J'ai apprécié vos qualités d'enseignant, notamment lors du DU de « Qualitologie ».

Je vous remercie également de donner de votre temps pour l'association Probioqual, élément essentiel pour l'évolution et la crédibilité de la Biologie Médicale.

Vous me faites l'honneur de faire partie du présent jury et de me rejurer une deuxième fois cette année.

Veillez croire en l'expression de ma respectueuse considération.

Madame le Docteur Marie Elisabeth Reverdy

Vous avez accepté de juger mon travail sans me connaître et malgré la précipitation.

Je tiens à vous remercier et à vous manifester mon profond respect.

A ma famille,

A Josette et Marcel, mes grands-parents qui m'auront inculqué la notion du travail et surtout du travail manuel. Merci de m'avoir fait comprendre qu'instruction ne rimait pas avec longueur des études. Merci pépé de m'avoir fait découvrir le monde fabuleux de l'aviation, quelle que soit sa forme, modélisme et grandeur.

A Danièle, ma maman, merci d'avoir cru en moi et de m'avoir permis de faire ces longues études. Merci pour ton aide discrète et efficace de tous les jours.

A Gilbert, mon papa, à qui je dois je crois mon esprit révolutionnaire, tu restes malgré tout à mes côtés.

A Joëlle, merci pour ton soutien depuis le départ. Tu remplis à merveille ton rôle de marraine et comme mère d'adoption.

A Raphael et Laurence, mon frère et ma sœur que j'aime. A Julien.

A Robin, mon frère d'adoption.

A Jacky, Annie, Julien, Lydie et Matthieu.

A Yves.

A Anne et Agathe, les deux femmes de ma vie, merci pour votre patience et votre soutien de tous les jours. Soyez certaines de mon amour.

A Rémi et Bernadette, mes beaux-parents, merci pour votre soutien et votre aide.

A mes beaux frères et belles sœurs. Merci Thomas pour ta coopération.

A mes amis,

A Julien, Grégoire, je vous remercie d'être mes amis, c'est bien agréable de penser à nos parties de coinches, nos soirées et révisions passés ensemble même si vous avez pris de l'avance sur moi. Vivement la prochaine Saint Vincent Tournante. Merci à Aline et Julie d'apprécier notre humour et de nous permettre de continuer à nous voir.

A Jean, Paul, Carine, Alain, Cyril, PTVC

A Arnaud, merci pour ces pauses déjeuners équilibrées et ces trajets St é-Lyon qui ont bien agrémenté ce mois d'août studieux.

A Cédric et Florence.

A Lyon Sud

A Monsieur M'Barek et Madame Rimoux, qui ont permis et facilité mon retour à Lyon Sud.

A l'AMEUSO, et à toutes les personnes que j'y ai rencontrées.

Au mois de Septembre qui aura vu tant de révisions, de pages se tourner dans la BU, et pour finir une thèse bien attendue.

A Nancy

A un frère d'armes, Stéphane Bozic avec qui nous avons combattu la Lorraine.

A M. Olivier et Mme Dousset de la Faculté de médecine de Nancy, je vous remercie pour votre dévouement à la réussite de mon cursus.

A Mademoiselle Badoinot de la DDRASS de la Lorraine, vous m'aurez montré l'aide que peut apporter l'administration à ses usagers.

Et enfin,

A Jesse Gregory James et Charles le Téméraire.

Aux deux Jean-Pierre du MACM

A tous ceux que j'ai oubliés.

# SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions.

J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me sont confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs. Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission.

Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité.

Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

# Liste des abréviations

AFSSaPS	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché
ATMP	Advanced Therapy Medicinal Product
BTC	Banque de Tissus et Cellules
CAOMECS	Cultured Autologous Oral Mucosal Epithelium Cell Sheet
CAT	Comité pour les médicaments de thérapie innovante
CE	Cellule épithéliale
UFC	Unité formant colonie
CSL	Cellule Souche Limbique
DCSL	Déficit en Cellules Souches Limbiques
EMA	Agence européenne du médicament (European Medicines Agency)
GMP	Good Manufacturing Practices
HCL	Hospices Civils de Lyon
Ig A	Immunoglobuline A
LAM	Laboratoire d'analyse médicale
<i>LP</i>	<i>Lamina Propria</i>
MO	Muqueuse Orale
MTI	Médicament de thérapie innovante
NIH	National Institutes of Health
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PTC	Produit cellulaire à finalité thérapeutique
PVDF	PolyVinylidene Fluoride
TC	Taux de croissance
TE	Trypsine 0,05% - EDTA 0,02%
UTC	Unité de Thérapie Cellulaire



# Table des matières

Remerciements .....	10
Liste des abréviations .....	14
Table des matières .....	15
Table des illustrations .....	16
Introduction .....	17
Première partie : Rappels .....	18
I.Rappels Anatomiques .....	18
1. La cornée.....	18
a. Généralités .....	18
b. Structure de la cornée .....	19
c. Fonctions de l'épithélium cornéen .....	22
d. Renouvellement de l'épithélium cornéen .....	23
2. La muqueuse orale .....	24
a. Présentation générale.....	24
b. Fonctions de la MO .....	26
c. Structure de la muqueuse orale.....	27
II.Implication en pathologies .....	30
1. Déficit en cellules souches limbiques.....	30
a. Causes.....	31
b. Mécanismes .....	31
c. Aspect clinique .....	32
2. Restauration de l'épithélium cornéen .....	33
a. Traitement du syndrome de DCSL unilatéral.....	35
b. Traitement du syndrome de DCSL bilatéral.....	37
III.Exigences réglementaires.....	38
IV.Le Bact/ALERT 3D .....	43
1. Présentation.....	43
2. Principe .....	43
3. Différents types de flacons .....	44
Deuxième Partie .....	46
I.Introduction.....	46
II.Article .....	48
III.Discussion .....	61
IV.Conclusions.....	63
Annexes .....	65
Bibliographie.....	69

# Table des illustrations

Tableau 1 : delay of detection for each laboratories.....	55
Tableau 2 : Percentage of identification for each strain with Vitek 2.....	57
Figure 1 : coupe sagittale de l'œil .....	18
Figure 2 : coupe schématique de la MO.....	24
Figure 3 : coupe histologique de la MO.....	27
Figure 4 : Conduite thérapeutique en cas de DCSL.....	34
Figure 5 : Principe du faisceau de lecture.....	43
Figure 6 : Changement de couleur de l'indicateur colorimétrique .....	43
Figure 7 : detection delay for strains in FA bottles .....	56
Figure 8 : detection delay for strains in SN bottles .....	56

# Introduction

Le présent travail s'attache à démontrer l'aptitude du système automatisé BacT/ALERT® 3D à mettre en évidence la contamination des milieux de culture de cellules épithéliales afin de s'assurer de l'innocuité microbiologiques des greffons de tissus épithéliaux destinés aux patients.

Cet automate, commercialisé par l'industriel lyonnais Biomérieux, est initialement destiné à la détection de bactériémies chez les patients. Il peut également servir pour la détection de microorganismes dans d'autres milieux biologiques. Cependant il convient de s'assurer de cette possibilité technique afin de garantir les résultats obtenus et rendus.

Dans ce but un protocole expérimental de contamination de flacons utilisés dans le BacT/ALERT 3 D a été réalisé, en contaminant volontairement ces flacons par des souches et un inoculum connus.

Ce protocole expérimental de validation a été monté par le laboratoire de l'AFSSAPS et la BTC pour répondre aux exigences des législations française et européenne.

Le point de départ de cette validation de l'automate est dicté par l'obligation de répondre à ces législations.

Cet automate est utilisé à la Banque de Tissus Cellulaires de l'Hôpital Edouard Herriot (HCL, Lyon) pour le contrôle microbiologiques des milieux notamment pour le remplacement de cellules de la cornée nous ferons dans une première partie de brefs rappels sur la cornée, et la muqueuse orale celle-ci servant d'épithélium de remplacement dans certains cas. Suivra des explications d'utilisations en pathologies humaines, puis un chapitre concernant la réglementation en vigueur se destinant aux produits de greffes puisque ces textes imposent la validation de l'automate.

Dans une deuxième partie viendra le travail original, celui-ci étant rédigé sous forme d'article, en langue anglaise.

# Première partie : Rappels

## I. Rappels Anatomiques

### 1. La cornée

#### a. Généralités

Le globe oculaire a un diamètre d'environ 23 mm. La présence de la cornée dans sa partie antérieure fait que celui-ci n'est pas une sphère parfaite. La cornée est la partie la plus antérieure de l'œil.

Sa fonction est à la fois de protéger l'œil des agressions externes, mais elle doit également laissé passer la lumière et doit donc être transparente.

La cornée a un diamètre moyen de 11,7 mm et un rayon de courbure de 7,8 mm [1]. Etant plus bombée que la sclère, la cornée apparaît proéminente à l'avant du globe oculaire. Son épaisseur varie de 0,5 mm au centre à 0,8 mm en périphérie.

L'œil est composé de trois tuniques. La plus interne, la rétine, est une tunique nerveuse en contact direct avec l'humeur vitrée. Vient ensuite la choroïde, composée de tissu conjonctif lâche, qui forme la tunique uvéale. Enfin, la tunique fibreuse externe est formée par la sclère et la cornée. La sclère, aussi appelée sclérotique, recouvre la majeure partie du globe oculaire en formant une coque opaque, alors que la cornée transparente est sur la face antérieure de l'œil.

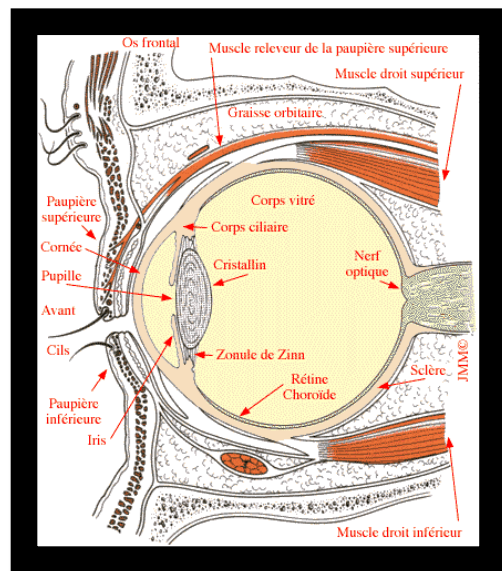


Figure 1 : coupe sagittale de l'œil  
([www.snof.org](http://www.snof.org)).

La cornée est un des organes de la vision puisqu'elle transmet la lumière vers l'intérieur du globe oculaire. En assurant 80% de la réfraction, c'est la principale lentille de l'œil [6]. L'absence de réseau vasculaire lui permet d'avoir un indice de réfraction homogène. Ses propriétés optiques sont étroitement liées à la présence du film lacrymal recouvrant la cornée.

Le film lacrymal est formé de trois couches superposées :

- une couche mucineuse en contact avec la surface de l'œil. Elle est produite par les cellules caliciformes de l'épithélium de la conjonctive. Le mucus est un gel très hydraté dont les principaux constituants sont les mucines ;
- une couche aqueuse ;
- une couche lipidique.

Ce film lacrymal permet la lubrification et la protection de l'œil. En formant une surface bien uniforme, il améliore la qualité de la transmission lumineuse et donc la qualité visuelle. Enfin, il retient les débris cellulaires régulièrement éliminés par les battements de cils.

La cornée est très richement innervée par le nerf trijumeau V [2], d'où son extrême sensibilité. Cela permet également le réflexe de clignement.

### **b. Structure de la cornée**

Au niveau de la partie visible de l'œil, la cornée transparente et avasculaire est encerclée par la conjonctive semi-opaque et vascularisée. La zone de transition entre la cornée et la conjonctive correspond au limbe. Celui-ci contient les cellules souches épithéliales, dites cellules souches limbiques, qui sont indispensables au renouvellement de l'épithélium.

La cornée est divisée en 3 assises cellulaires (épithélium, stroma, endothélium), séparées par 2 membranes (membranes de Bowman et de Descemet) [3] :

- L'épithélium

Comme tous les épithélia, l'épithélium est non vascularisé. En revanche, il présente des caractéristiques spécifiques, il est pavimento-squameux et non kératinisé [4]. Il est différencié en 5 à 7 couches de cellules. Son épaisseur est d'environ 50 µm. Composé à 90 % de cellules épithéliales, il comporte également quelques lymphocytes et en périphérie cornéenne, des cellules de Langerhans et des mélanocytes [5].

La différenciation des cellules épithéliales se fait de manière verticale des couches les plus profondes vers le film lacrymal. Les cellules épithéliales se répartissent en trois assises :

- les cellules basales, les moins différenciées disposées en monocouche.
- les cellules intermédiaires ou ailées ;
- les cellules superficielles présentent des microvillosités au niveau apical afin d'augmenter la surface de contact avec le film lacrymal. A travers cette surface étendue, la cornée est hydratée et de faibles échanges liquidiens se font du stroma vers les larmes. Ces cellules finissent par desquamer dans le film lacrymal.

Dans ces trois couches, les nombreuses jonctions intercellulaires, de type desmosomes, assurent une forte cohésion cellulaire, pour conséquence de jouer un rôle de barrière vis-à-vis des agents extérieurs.

Une lame basale, composée de collagène de type IV, permet d'ancrer l'épithélium à la membrane de Bowman. Elle maintient les extrémités de longues fibrilles d'ancrage qui forment des boucles autour des fibrilles de collagène de la membrane de Bowman.

- La membrane de Bowman

Cette membrane collagénique acellulaire d'une épaisseur de 8 à 16  $\mu\text{m}$  relie l'épithélium, par sa lame basale au stroma. Elle est constituée de fibres de collagène de différents types et de protéoglycanes. Cette couche ne se régénère pas, donc toute lésion située dans la membrane de Bowman entraîne la formation d'un tissu cicatriciel.

- Le stroma

Le stroma hautement organisé représente 90% de l'épaisseur de la cornée. Il est peu cellulaire, les cellules représentent seulement 2 à 3% du volume stromal. Il est essentiellement constitué de molécules de collagène et est rigoureusement agencé. Les molécules de collagène se regroupent en fibrilles pour former des fibres de collagène. Elles sont principalement constituées de collagène de types I et VI ; du collagène de types III et V est aussi présent mais en plus faible quantité. Ces fibres vont constituer de grandes lamelles superposées entre lesquelles des fibroblastes nommés kératocytes s'intercalent. Ces cellules synthétisent la matrice extracellulaire et prolifèrent en cas de blessure. Chaque couche de lamelles est orientée différemment, ce qui assure une résistance mécanique maximale. L'absence de vascularisation, la disposition régulière et parallèle du collagène ainsi que sa pauvreté cellulaire rendent la cornée transparente, permettant ainsi à la lumière de la traverser.

- La membrane de Descemet

Cette membrane collagénique acellulaire relie le stroma à l'endothélium. En microscopie électronique, on peut distinguer une partie antérieure striée d'une partie postérieure non striée. Elle est composée essentiellement de fibres de collagène de type IV produites par l'endothélium sous-jacent et de laminine. Elle n'est pas aussi résistante aux dommages que la membrane de Bowman, mais permet l'élimination passive de l'eau provenant du stroma vers l'endothélium, en créant un gradient osmotique.

- L'endothélium

Il est caractérisé par une monocouche de cellules qui ne se régénèrent pas. Cette densité cellulaire est d'environ 3000 cellules/mm<sup>2</sup> à la naissance. Le nombre de ces cellules par mm<sup>2</sup>, appelé capital endothélial, est donc un critère de qualité d'une cornée à greffer. Les cellules endothéliales reçoivent les nutriments nécessaires par l'intermédiaire de l'humeur aqueuse. L'endothélium joue un rôle de barrière sélective et perméable entre le stroma et l'humeur aqueuse grâce à un agencement cellulaire très serré. Il permet le passage des fluides du stroma vers l'humeur aqueuse, afin de réguler le volume et l'indice de réfraction du stroma [6]. Cette couche est donc indispensable au maintien des propriétés optiques de la cornée.

La cornée n'étant pas vascularisée, elle se nourrit par diffusion en suivant la voie trans-épithéliale, à partir des larmes, et la voie trans-endothéliale, à partir de l'humeur aqueuse.

L'endothélium, le stroma, l'épithélium et la présence du film lacrymal sont indispensables à la transparence de la cornée. Cette transparence est directement liée à la régularité et la finesse de l'épithélium, à l'absence de réseau vasculaire et lymphatique, ainsi qu'à l'organisation du stroma [7].

### **c. Fonctions de l'épithélium cornéen**

Un épithélium fonctionnel est indispensable au maintien de la transparence cornéenne puisqu'il évite l'envahissement conjonctival et la néo-vascularisation associée. Ces fonctions sont assurées par les cellules épithéliales. De plus, l'interaction entre l'épithélium et le film lacrymal forme une surface lisse réfractive permettant une bonne vision. Grâce à la résistance de ses jonctions intercellulaires, l'épithélium constitue une barrière physique face aux agents infectieux.



#### **d. Renouveaulement de l'épithélium cornéen**

Le renouvellement de l'épithélium cornéen a fait émerger plusieurs théories. Celle émise par Tseng en 1989 semble actuellement la plus probable [8]. Les cellules épithéliales cornéennes sont renouvelées en deux semaines grâce aux cellules souches limbiques (CSL). Ces CSL sont situées dans les palissades de Vogt au niveau de la couche basale de l'épithélium limbique [9]. La division d'une CSL donne naissance à deux cellules, une cellule souche qui maintient le pool de CSL, et une cellule qui entre en différenciation. Cette dernière migre en deux temps. Tout d'abord, la migration se fait de manière centripète, du limbe vers la couche basale de l'épithélium où elle forme une cellule amplificatrice transitoire, puis de manière verticale vers la couche superficielle de l'épithélium. Au cours de sa migration verticale, elle se transforme en cellule post mitotique puis en cellule de différenciation terminale avant de desquamer dans le film lacrymal. En quittant le limbe, les cellules commencent à exprimer le couple de cytokératines K3/K12, un marqueur spécifique de la différenciation de l'épithélium cornéen [10].

Le limbe forme un cercle entourant la cornée et s'épaississant à l'extrémité haute et basse selon un axe vertical pour former deux croissants de 2 mm d'épaisseur. L'épithélium limbique est constitué de 10 à 12 couches cellulaires. Cette couche avasculaire contient les CSL dans les cryptes des palissades de Vogt. Le réseau vasculaire sous-jacent dense assure le maintien des CSL. En plus des CSL, cette zone est également riche en mélanocytes et en cellules de Langerhans. En produisant la mélanine, les mélanocytes protègent les CSL des rayonnements UV. Contrairement à la conjonctive, ce tissu ne contient pas de cellules caliciformes [11].

## 2. La muqueuse orale

### a. Présentation générale

La cavité buccale est tapissée par une muqueuse buccale, également appelée muqueuse orale (MO). Cette dernière se développe au stade embryonnaire principalement à partir de l'ectoderme, alors que la langue dérive de l'endoderme [12].

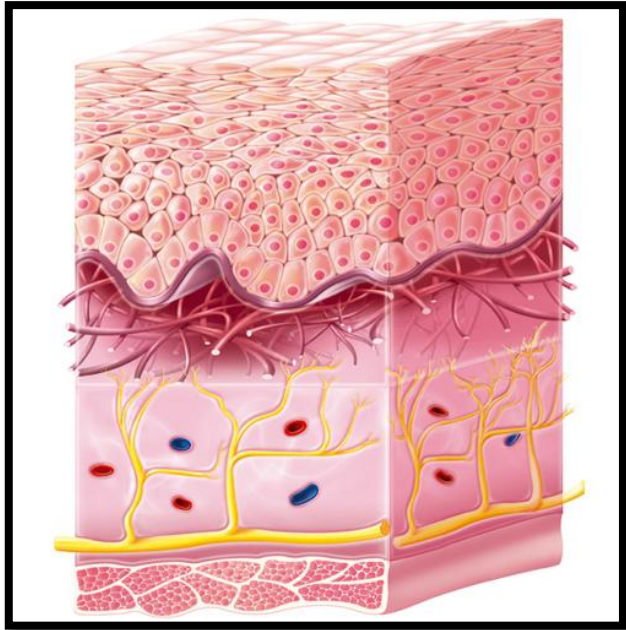


Figure 2 : coupe schématique de la MO.

Au stade mature, la MO se compose d'un épithélium malpighien ancré au tissu conjonctif, la *Lamina Propria* (LP), par l'intermédiaire de protéines jonctionnelles de la lame basale.

La MO s'étend de l'oropharynx jusqu'à la face postérieure des lèvres, en recouvrant également les palais dur et mou, l'intérieur des joues, la langue, et le plancher de la bouche. Selon la zone anatomique de la cavité buccale, la MO peut être kératinisée ou non kératinisée.

Au sein de la MO, deux zones sont distinguées [13] :

- Le vestibule externe bordé par les lèvres et les joues ;
- La cavité buccale proprement dite, séparée du vestibule par l'alvéole avec les dents et la gencive. En haut, la muqueuse revêt le palais dur et le palais mou ; en bas, elle tapisse le plancher buccal et la base de la langue.

En fonction des relations établies entre la MO et les structures osseuses ou musculaires sous-jacentes, plusieurs territoires sont individualisés :

- les lèvres, riches en muscles striés, ont un versant exo-buccal cutané et un versant interne muqueux. Entre les deux, la zone de transition s'appelle le vermillon ou zone de Klein ;
- au niveau de la muqueuse jugale, l'épithélium repose sur un tissu conjonctif et adipeux abondant ;
- la muqueuse de la langue repose sur une musculature constituée de faisceaux intercroisés en tous sens. Elle présente sur son dos de nombreuses papilles responsables de la perception du goût ;
- le plancher de la bouche où la MO revêt les glandes sublinguales ;
- Les gencives, la MO est étroitement liée à l'os alvéolaire et recouvre la base des dents jusqu'au collet ;
- le palais dur, en avant de la cavité buccale, est sillonné de plis transversaux. Sa MO est étroitement amarrée au tissu conjonctif et à l'os sous-jacent ;
- le palais mou, situé à l'arrière du précédent, est revêtu d'une muqueuse mince.

Au niveau des lèvres, des joues et du palais mou, une couche de graisse sépare la muqueuse de l'os ou des muscles sous-jacents. Cette couche graisseuse appelée sous-muqueuse contient également des glandes salivaires, des vaisseaux et des nerfs. Cette sous-muqueuse n'est pas présente au niveau du palais dur et des gencives.

La MO, de type malpighien, ressemble à la peau mais en diffère par l'absence d'annexes (bulbes pileux, glandes sudoripares, glandes sébacées) et le petit nombre de mélanocytes. De plus, elle tire son originalité d'une humidification permanente par la salive que sécrètent les nombreuses glandes salivaires accessoires qui lui sont annexées et du turn-over très rapide [14] des cellules de son épithélium (25 jours). La desquamation importante qui en

découle permet de limiter la colonisation et l'invasion de microorganismes qui pourraient adhérer à la surface de la muqueuse.

On distingue trois types de muqueuse orale selon leurs localisations et fonctions :

- la muqueuse masticatrice tapisse les gencives et le palais dur. Elle est kératinisée en surface afin de faire face aux forces mécaniques déployées lors de la mastication. Elle présente de longues crêtes épithéliales s'invaginant profondément dans le tissu conjonctif. Ce dernier est riche en fibres de collagène.
- la muqueuse bordante recouvre le versant muqueux des lèvres, les joues, le plancher de la bouche, la face ventrale de la langue et le palais mou. Elle est flexible, non kératinisée en surface et permet des mouvements amples. Elle ne présente que des crêtes épithéliales basales peu marquées. Son chorion, très vascularisé, est connecté aux muscles sous-jacents par une muqueuse de texture lâche. Le turnover des cellules de la muqueuse bordante est plus rapide que celui de la muqueuse masticatrice.
- la muqueuse spécialisée, recouvrant le dos de la langue, est kératinisée en surface. Sa spécificité est liée aux nombreux récepteurs du goût qui la composent, les papilles.

## **b. Fonctions de la MO**

La MO joue de multiples rôles :

- Protection des tissus profonds contre les forces mécaniques mises en jeu lors de la mastication. C'est également une protection contre les nombreux microorganismes de la cavité buccale grâce au système immunitaire local (organes lymphoïdes, lymphocytes et plasmocytes). Cette fonction est complétée par certains éléments de la salive, tels que l'immunoglobuline A (Ig A) sécrétoire, le lysozyme et la lactoferrine. Le lysozyme et la lactoferrine sont des facteurs bactériostatiques,

limitant la prolifération bactérienne, alors que l'Ig A sécrétoire inhibe l'adhérence des bactéries à la muqueuse.

- Fonction sensorielle assurée par de nombreux récepteurs (à la température, au tact, à la douleur, goût) disséminés dans la muqueuse.
- Fonction de régulation thermique, très importante chez les animaux (en particulier le chien), mais ne jouant qu'un rôle secondaire chez l'homme.

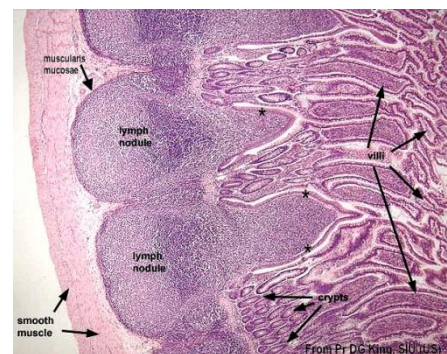
### c. Structure de la muqueuse orale

La muqueuse orale (MO) est composée de deux couches, un épithélium malpighien et la *lamina propria (LP)* ou chorion, reliés par l'intermédiaire des protéines jonctionnelles de la lame basale. La base de l'épithélium présente des irrégularités avec des crêtes épithéliales entourant les papilles conjonctives.

- L'épithélium

Comme tous les épithélia, celui de la MO n'est pas vascularisé. Quelle que soit sa localisation, il forme une barrière entre la cavité buccale et les tissus profonds. Il

est principalement constitué de cellules épithéliales nommées kératinocytes, étroitement liées les unes aux autres par des desmosomes. Ces nombreuses jonctions intercellulaires permettent de faire face aux forces importantes mises en jeu lors de la mastication. Comme dans la peau, le renouvellement permanent de cet épithélium est assuré par la division mitotique des cellules souches situées dans la couche de cellules basales, la plus profonde, puis par leur migration vers la surface s'accompagnant de leur différenciation jusqu'à leur desquamation.



**Figure 3 : coupe histologique de la MO (HPS X 40).**

L'ultrastructure en microscopie électronique en transmission (TEM) de l'épithélium de la MO est similaire à celui de l'épiderme. Cette structure varie cependant selon la kératinisation ou non de l'épithélium :

- le *stratum germinatum* (couche basale ou germinative) est constitué d'une ou deux couches de cellules cubiques ou cylindriques disposées en palissade. Les cellules basales sont attachées à la membrane basale par des hémidesmosomes, alors qu'elles sont reliées aux cellules voisines et aux cellules de la couche épineuse par des desmosomes.

D'une part, les cellules germinales ou cellules souches, peu nombreuses, sont caractérisées par un grand potentiel de prolifération avec un cycle cellulaire très lent. Elles sont regroupées en paquets le long de la jonction épithélio-mésenchymateuse. D'autre part, les cellules d'amplification transitoire ont un nombre limité de divisions avant d'entrer en différenciation terminale. Elles représentent la majorité des cellules basales.

A chaque division cellulaire, une cellule souche donne deux cellules. L'une, identique à la cellule mère, maintient le pool de cellules germinales. L'autre, plus différenciée que la cellule mère, est une cellule d'amplification transitoire qui se multiplie rapidement avant de former des cellules de différenciation terminale <sup>[26]</sup>.

Leur noyau est pourvu de plusieurs nucléoles. De plus, on y observe les structures propres aux cellules épithéliales de souche malpighienne comme les tonofilaments et les desmosomes. Au sein de cette couche, quelques cellules de Merkel et mélanocytes sont dispersés.

- le *stratum spinosum* (couche épineuse ou corps muqueux de Malpighi) est formé de 15 à 20 assises de cellules polyédriques accrochées les unes aux autres par de nombreux desmosomes. Ces jonctions intercellulaires caractéristiques donnent aux

kératinocytes un aspect épineux d'où le nom de cette couche. Le volume de ces cellules augmente et contient de plus en plus de filaments de kératine, dont l'expression est modifiée.

- La jonction épithélium - *lamina propria* : lame basale

Cette structure hautement organisée de 1 à 2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur permet d'ancrer l'épithélium à la *lamina propria*. On peut l'identifier après coloration par la technique du P.A.S. En microscopie électronique, on distingue trois zones :

- La lamina lucida, de 45 nm d'épaisseur, est transparente aux électrons. Elle renferme un réseau de molécules de laminine, reliées aux prolongements des intégrines de l'hémidesmosome ;
- La lamina densa, de 50 nm d'épaisseur, est opaque aux électrons. Elle est constituée d'une plaque médiane de collagène IV, accrochée au réseau de laminine d'un côté et aux fibrilles d'ancrage de l'autre côté.

Les fibrilles d'ancrage constituées de collagène VII forment des boucles autour du réseau de collagène de la matrice extracellulaire. Les deux extrémités des fibrilles d'ancrage sont insérées dans la lamina densa, ce qui permet l'ancrage de l'épithélium dans le tissu conjonctif sous jacent.

- La Lamina Propria

La LP est une couche riche en matrice extra cellulaire synthétisée par les fibroblastes. Elle assure les propriétés mécaniques aux tissus et soutient l'épithélium. Richement vascularisée, elle apporte les éléments nutritifs après filtration à travers la lame basale. Au stade embryonnaire, la LP dérive de l'ectomésenchyme, et plus particulièrement des cellules de la crête neurale.

La LP, ou chorion, est un tissu conjonctif constitué d'une matrice extracellulaire synthétisée par les fibroblastes. On la divise en deux zones :

- la couche papillaire, superficielle, dans laquelle l'épithélium ondule. Les crêtes épithéliales s'associent aux papilles de la *LP*. Les fibres de collagène y sont fines, peu serrées et entourées de nombreuses anses capillaires [15] ;
- la couche réticulaire, parallèle à la surface, forme un réseau enchevêtré de fibres de collagène organisées en faisceaux. Le composant principal de la matrice extracellulaire (MEC) est le collagène de type I. Ce chorion renferme surtout de la MEC faite de fibres enchâssées dans une substance fondamentale amorphe synthétisée par les fibroblastes. Il y a aussi des vaisseaux sanguins, des nerfs, des mastocytes responsables de réactions allergiques et des cellules participant aux défenses immunitaires (lymphocytes, plasmocytes, monocytes, macrophages).

On distingue deux types de fibres, les fibres de collagène et les fibres élastiques, enrobées dans une substance fondamentale riche en protéoglycanes, acide hyaluronique, protéines dérivées du sérum.

## **II. Implication en pathologies**

### **1. Déficit en cellules souches limbiques**

L'application en pathologie est pour palier au déficit en cellules souches limbiques de la cornée (DCSL) Le DCSL est dû à la destruction des cellules souches limbiques [16]. Le terme déficit est lié à l'incapacité des CSL à assurer le renouvellement normal de l'épithélium cornéen. Ce dernier n'assure plus ses fonctions, et un envahissement progressif par l'épithélium conjonctival se produit. Cet envahissement s'accompagne d'une néo-vascularisation et d'une opacification progressive.



## **a. Causes**

Les causes peuvent être regroupées en deux grandes catégories, les pathologies liées à une atteinte directe des CSL et celles liées à une souffrance indirecte des CSL.

- Pathologies liées à une atteinte directe des CSL :
  - Physiques : brûlures caustiques ou thermiques, traumatisme limbique étendu ;
  - Anoxie : complications liées au port prolongé de lentilles de contact ;
  - Infectieuses : trachome, herpès, kératite bactérienne sévère ;
  - Immunologiques et/ou inflammatoires : syndrome de Stevens-Johnson, pemphigoïde oculaire cicatricielle, rejet épithélial de greffon cornéen, pathologies inflammatoires du limbe.
  
- Pathologies liées à une souffrance indirecte des CSL, secondaire à une atteinte du stroma conjonctival limbique :
  - Tumorales bénignes : ptérygions ;
  - Tumorales malignes : carcinomes épidermoïdes du limbe ;
  - Hérités : aniridie ;
  - Endocriniennes : diabète, maladie d'Addison, hypoparathyroïdie ;
  - Idiopathiques.

## **b. Mécanismes**

Parmi toutes les étiologies possibles au DCSL, c'est l'étape commune d'inflammation qui va déclencher la destruction des CSL [9].

Suite à des brûlures thermiques ou chimiques, le tissu nécrosé va rapidement être infiltré par des polynucléaires neutrophiles afin d'éliminer les débris cellulaires. Ces cellules inflammatoires vont inhiber la cicatrisation tissulaire en libérant la collagénase I. Ceci aura

pour conséquence une destruction définitive des CSL, ainsi qu'une cicatrisation anormale de la surface oculaire.

Le même mécanisme se produit dans le cadre de maladies immunologiques et/ou inflammatoires conduisant à une atteinte nécrotique de plusieurs muqueuses pour le syndrome de Stevens-Johnson, et à une kératopatie cécitante pour la pemphigoïde oculaire [17].

Lorsque la zone épithéliale détruite est faible, la réparation du tissu se fait rapidement par glissement centripète des cellules épithéliales bordant la lésion. Si l'atteinte est plus importante, il faut attendre la division des cellules souches limbiques et l'amplification des cellules d'amplification transitoire. Si plus de 60% des CSL sont détruites, la cicatrisation se fait à partir des cellules conjonctivales, qui recouvrent progressivement la cornée. A la surface cornéenne, quelques cellules caliciformes, normalement absentes, sont retrouvées.

### **c. Aspect clinique**

D'un point de vue clinique, le DCSL se caractérise par une conjonctivalisation et une néo-vascularisation qui, à long terme, peut avoir un impact sur le stroma. Par ailleurs, des douleurs oculaires, liées aux ulcérations cornéennes épithéliales récidivantes, à l'irritation et à l'inflammation chroniques de la surface oculaire, apparaissent [15]. Le DCSL se manifeste aussi par un ensemble de gênes comme une photophobie, un blépharospasme, un larmoiement chronique et une sécheresse oculaire. L'envahissement cornéen par les cellules conjonctivales rend l'épaisseur de l'épithélium hétérogène et les néo-vaisseaux dévient les rayons lumineux, ce qui modifie la réfraction de la cornée. La vision est donc diminuée par deux phénomènes, l'opacité cornéenne et la modification des propriétés réfractives de la cornée. A un stade avancé, une cécité peut donc apparaître.

Le diagnostic du DCSL repose sur l'observation des manifestations cliniques et sur l'impression cytologique cornéenne. Cette technique permet l'étude histologique du tapis cellulaire prélevé. Une coloration au PAS met en évidence les mucines contenues dans les cellules caliciformes [18]. Ces cellules sont normalement retrouvées au sein de l'épithélium conjonctival, mais sont absentes de l'épithélium limbique et cornéen. Si des cellules caliciformes sont présentes au niveau de l'impression cytologique, le patient est alors atteint de DCSL, puisque la détection de ces cellules reflète la présence anormale de l'épithélium conjonctival au niveau cornéen. Cependant, à un stade précoce du DCSL, les cellules caliciformes peuvent ne pas être encore détectables sur la cornée [19].

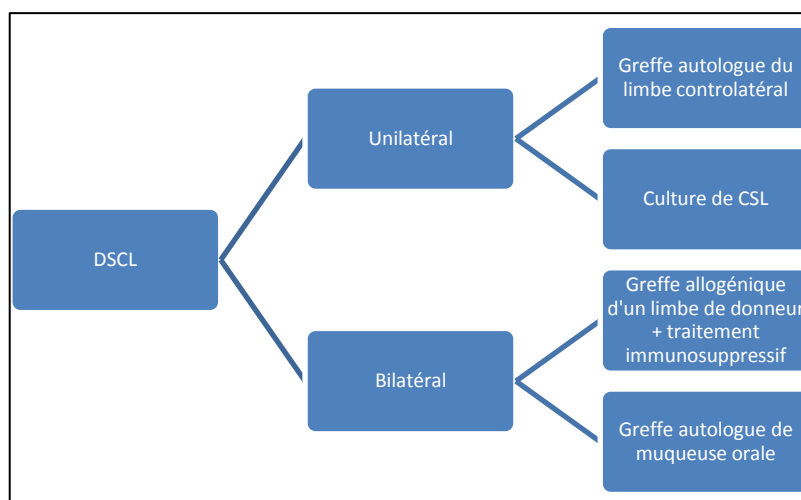
## **2. Restauration de l'épithélium cornéen**

La restauration de l'épithélium cornéen se fait principalement par greffe soit de CSL controlatéral si l'œil est sain. Si le risque de perte de capital de CSL sain est trop important on peut avoir recours à une allogreffe soit une greffe autologue.

La greffe de cornée, sur de tels terrains, est de mauvais pronostic à cause du risque important de rejet et de la mauvaise qualité de la ré-épithélialisation. En effet, la fréquence de rejet est proportionnelle à la néo-vascularisation de la cornée réceptrice. Le risque de rejet va de 3,5% si la cornée ne présente pas de néo-vascularisation à 65% en cas de néo-vascularisation importante [20]. Le rejet se manifeste par des hémorragies et une ischémie du greffon, suivies d'une néo-vascularisation qui envahit le greffon et la surface cornéenne.

Il est donc indispensable de rétablir un épithélium cornéen fonctionnel, afin d'éliminer le réseau vasculaire, avant d'envisager toute kératoplastie transfixiante (greffe de cornée entière). Pour cela, il faut dans un premier temps prévenir l'envahissement conjonctival, favoriser la prolifération, la migration et l'adhésion des cellules épithéliales cornéennes résiduelles avant de suppléer le manque en CSL.

Les premières tentatives de restauration de la surface oculaire, avant la théorie actuelle des CSL et la connaissance du limbe, consistaient à greffer de la conjonctive autologue [21].



**Figure 4 : Conduite thérapeutique en cas de DCSL.**

Cette greffe ne permet pas la cicatrisation de l'épithélium cornéen [22] mais calme les douleurs oculaires liées aux ulcères et évite des complications comme la perforation de la membrane de Descemet.

Tous ces traitements permettent de reconstruire la surface cornéenne en améliorant les signes fonctionnels, tels que les ulcérations chroniques, la photophobie, le blépharospasme et le larmoiement et/ou en stimulant les CSL viables résiduelles qui peuvent alors assurer la régénération d'un épithélium cornéen de phénotype normal. Une ré-épithélialisation cornéenne de bonne qualité rend possible la greffe de cornée allogénique secondaire.

Actuellement, les traitements se font à un stade avancé du DCSL, lorsque les signes cliniques sont visibles. Certaines équipes [23] préconisent une prise en charge plus précoce afin d'éviter les complications irréversibles d'opacification du stroma et de l'endothélium. En effet, ces complications exigent une kératoplastie transfixiante secondaire pour améliorer la vision alors qu'à un stade précoce, un simple apport en CSL suffit. Cette prise en charge, avant même l'apparition des complications, se ferait juste après les phénomènes inflammatoires initiaux.

Les travaux cités ci-dessous ont été réalisés au stade préclinique, souvent chez le lapin, ou au stade clinique, chez des patients souffrant de DCSL. Dans le cas des tests sur lapins, le DCSL a été induit [24] après kératectomie et excision du tissu conjonctival jusqu'à 5 mm

au-delà du limbe. L'épithélium cornéen et limbique, contenant les CSL, est donc complètement éliminé. Au bout de trois semaines, le tissu conjonctival avec vascularisation recouvre la totalité de la surface cornéenne, entraînant une opacité cornéenne sévère.

#### **a. Traitement du syndrome de DCSL unilatéral**

##### Autogreffe de limbe

En cas de déficience unilatérale, les CSL peuvent provenir du limbe controlatéral. Pour cela, un fragment du limbe controlatéral est prélevé puis greffé dans la zone limbique de l'œil déficient.

Cette greffe, réalisée depuis 1989, a l'avantage d'être autologue, ce qui élimine le risque de rejet et ne nécessite donc pas de traitement immunosuppresseur. Néanmoins, cette technique ne peut être réalisée que s'il existe un contingent limbique sain et suffisant sur l'œil controlatéral, dans le cas de déficits partiels et/ou unilatéral en CSL. De plus, elle nécessite un prélèvement de taille importante, pouvant atteindre les 60 mm<sup>2</sup> [25]. La fréquence des complications sur l'œil donneur controlatéral et le risque de voir apparaître une insuffisance limbique secondaire sont proportionnels à la taille du prélèvement. Sur un œil donneur sain, le risque est faible pour une taille de prélèvement n'excédant pas le ¼ de la circonférence limbique. Cette condition rend de nombreux patients réticents à ce geste chirurgical car l'opération peut endommager le limbe sain, ce qui entraînerait une insuffisance limbique secondaire. La conséquence serait une perte visuelle bilatérale [26].

L'autogreffe limbique occupe une place importante au sein de stratégies thérapeutiques plus complexes, en étant utilisée en préambule à une kératoplastie transfixiante ou couplée à une greffe de membrane amniotique. Dans le cas d'une kératoplastie transfixiante secondaire à

l'autogreffe de limbe, la ré-épithélialisation complète du greffon par les cellules du receveur se produit en 3 à 30 jours.

#### Culture et greffe de cellules souches limbiques

Initialement, c'est l'équipe de G. Pellegrini, en 1997, qui a transféré la culture des cellules souches cutanées selon Green à la culture de CSL, et qui les a utilisées pour le traitement du DCSL. Par rapport à l'autogreffe de limbe, cette technique a l'avantage de limiter la taille du prélèvement. Cependant, quelques micro-traumas ou légères inflammations sont régulièrement observés, conduisant à une opacité cornéenne.

Afin d'éviter des inconvénients techniques de cultures, l'équipe de K. Nishida a réalisé la greffe de cellules épithéliales de cornée sans support, grâce à une culture sur UpCell® Insert. Cet insert thermosensible permet un détachement facile du feuillet par abaissement de la température. La culture des cellules épithéliales de cornée, de même que toutes les cellules épithéliales, se fait selon la technique de Green. A partir d'un prélèvement de l'épithélium cornéen et limbique de lapins, les cellules épithéliales (limbiques et cornéennes) sont ensemencées dans des inserts de culture pour éviter le contact direct avec les cellules xénogéniques de la couche nourricière. Le détachement simple sans traitement enzymatique préserve la membrane basale et les jonctions intercellulaires donnant un feuillet plus résistant et adhérent. Le feuillet est greffé directement au contact du stroma, après élimination du tissu conjonctival par le chirurgien. Ce feuillet de cellules épithéliales s'attache rapidement à la surface cornéenne, ce qui ne nécessite pas de points de suture.

Le feuillet obtenu par l'équipe de K. Nishida est pluristratifié, robuste et transparent. Il est principalement constitué de cellules épithéliales différenciées et de quelques cellules souches dans la couche basale du feuillet. Les analyses biochimiques mettent en évidence les microstructures des cellules d'origine, comme les microvilli, les jonctions serrées, les desmosomes et une membrane basale.

## **b. Traitement du syndrome de DCSL bilatéral**

### **Allogreffe de limbe**

Lorsque le limbe sain n'est pas suffisant ou que l'autogreffe limbique n'est pas réalisable, le limbe à greffer peut provenir d'une banque de donneurs décédés ou d'un parent génétique. Cette technique, appelée allogreffe de limbe, serait une alternative intéressante si elle ne nécessitait pas d'immunosuppression.

Le plus bref délai possible doit être observé entre le prélèvement et la greffe ; 24 heures semble être le temps maximal pour la plupart des auteurs. Au cours de la même intervention chirurgicale, une kératoplastie transfixiante peut être réalisée. La greffe de limbe se fait alors dans un premier temps avant de greffer un centre de cornée.

L'équipe de H.-S. Dua a observé que deux semaines après l'allogreffe limbique, toute la surface cornéenne est ré-épithélialisée.

Cette technique nécessite cependant une thérapeutique immunosuppressive d'appoint, pour éviter le phénomène de rejet, inhérent à la greffe d'un tissu riche en cellules immunocompétentes, comme les cellules de Langerhans. Les corticoïdes prescrits, le sont en instillation locale et par voie générale est souvent administrée de la ciclosporine A. La prise constante de cet immunosuppresseur induit de nombreux effets secondaires, ce qui altère la qualité de vie des patients.

### **Grefe de muqueuse orale**

Avec les techniques précédemment détaillées, les patients atteints d'un DCSL bilatéral se retrouvent en impasse thérapeutique. A défaut de greffer des CSL, des équipes ont envisagé de remplacer l'épithélium cornéen non fonctionnel par un autre épithélium autologue. Tous les épithélia contiennent des cellules souches au niveau de leur couche basale, qui permettent leur régénération. Parmi les épithélia buccal, conjonctival, nasal, œsophagien, rectal, vaginal, c'est l'épithélium de la muqueuse orale qui a été retenu car ce tissu est facilement accessible, et n'exige pas de chirurgie trop invasive.

Initialement, cette greffe consistait à prélever une surface importante de muqueuse orale au niveau de la face postérieure de la lèvre, afin de recouvrir la surface cornéenne. Ce transfert se déroulait en un temps opératoire et il était impossible d'éliminer tout le tissu conjonctif sous-jacent. L'épaisseur hétérogène du greffon ne permettait pas une bonne réfraction du faisceau lumineux et le résultat était une mauvaise vision. A ces résultats peu satisfaisants, s'ajoutait le risque important d'infections. Cependant, cette technique limite les ulcères et les perforations cornéennes.

La culture des cellules épithéliales de muqueuse orale a été développée pour obtenir des greffons homogènes et de surface lisse. Elle a repris les mêmes procédés de culture que ceux utilisés pour les cellules souches limbiques. La culture s'est d'abord faite sur différents supports, tels que la membrane amniotique ou le gel de fibrine, avant d'être développée sur le procédé UpCell<sup>®</sup> Insert [27].

L'intérêt de cette technique repose sur l'apport de cellules souches épithéliales de MO qui produisent un épithélium transparent, renouvelable et fonctionnel, capable de repousser l'épithélium conjonctival.

### **III. Exigences réglementaires**

Aujourd'hui, les produits cellulaires doivent être conformes à la réglementation européenne et nationale.

Pour une utilisation de routine :

Lorsque ces produits sont des médicaments : ils doivent être conformes au règlement 1394/2007 sur les thérapies innovantes. La publication de ce règlement a modifié la directive européenne 2001/83/CE (modifiée par la directive 2003/63/CE) qui est maintenant remplacée par la directive 2009/120/CE



Lorsque ces produits sont des préparations de thérapie cellulaire, ils doivent être conformes à la directive européenne 2004/23/CE qui a été transposée en droit français par le décret n°2008-968 du 16 septembre 2008.

- Lorsqu'ils ne répondent pas à cette définition, ils sont considérés comme des préparations cellulaires. C'est notamment le cas lorsqu'il s'agit de produits préparés selon un procédé dit « simple » faisant appel aux opérations mentionnées dans l'annexe 1 du règlement. Ils devront être autorisés dans les conditions définies aux l'article L. 1243-2 et L1243-5 du code de la santé publique. Les modalités d'autorisation sont précisées dans le décret n°2008-968 du 16 septembre 2008. Ainsi, ils peuvent être fabriqués par une structure publique (unité de thérapie cellulaire située au sein d'un hôpital) ou une structure privée (start-up) autorisée par l'afssaps Ils sont qualifiés de préparations de thérapie cellulaire (PTC) et ne sont pas considérés comme des médicaments. Ces produits dépendent de la réglementation nationale En France, ils sont préparés dans les banques de tissus et cellules autorisées par l'AFSSaPS et doivent répondre aux « bonnes pratiques française » qui ont revues pour une mise en conformité à la réglementation européenne (directive 2004/23/CE). Elles sont actuellement en relecture publique avant d'être publiées au JO.

Ces préparations sont toujours soumises à une veille sanitaire (la biovigilance), afin de surveiller et de prévenir les risques liés à leur utilisation.

- Lorsqu'ils répondent à la définition de produits de thérapie cellulaire mentionnée dans le règlement, ils sont qualifiés de médicaments de thérapie innovante (MTI) ou « Advanced Therapy Medicinal Products » (ATMP). Ils sont produits de manière industrielle Ces médicaments sont définis dans le règlement n° 1394/2007 (CE) comme ayant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines, ou comme pouvant être utilisés chez l'homme ou administrés à celui-ci en vue de

restaurer, corriger ou modifier des fonctions physiologiques en exerçant une action principalement pharmacologique, immunologique ou métabolique, et constituent donc des médicaments biologiques au sens de l'annexe I de la directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001. « En conséquence, toute réglementation régissant leur production, leur distribution ou leur utilisation doit avoir comme objectif essentiel la sauvegarde de la santé publique »<sup>[93]</sup>.

Deux cas peuvent alors se présenter :

- Soit, ils sont soumis à une procédure centralisée d'autorisation qui prévoit une évaluation scientifique centralisée de la qualité, de la sécurité et de l'efficacité du produit par l'EMA (European Medicine Agency). Au sein de cette structure, le comité pour les médicaments de thérapie innovante (CAT) formule un avis scientifique qui est soumis au comité des médicaments à usage humain. Si la demande est autorisée, cette procédure centralisée permet la mise sur le marché simultanée de ce médicament dans tous les pays de l'Union Européenne. La production doit se faire dans un établissement pharmaceutique certifié GMP (Good Manufacturing Practices). Le produit est soumis à la pharmacovigilance.
- -soit ils sont soumis à une procédure nationale d'autorisation. On parle de médicaments de thérapie innovante « exemptés ». Ces produits sont préparés de façon ponctuelle pour les patients d'un hôpital, sous la responsabilité exclusive d'un médecin. Ils doivent être préparés dans une structure autorisée selon les principes des bonnes pratiques de fabrications des médicaments, ils suivent les mêmes exigences de traçabilité et ils sont soumis à la pharmacovigilance.

Pour les produits utilisés dans le cadre des essais cliniques :

Pour les essais cliniques réalisés avec des médicaments, la réglementation est harmonisée au sein de l'union européenne via la directive 2001/20/CE mais elle n'est pas harmonisée pour les préparations. En France, tous les essais cliniques réalisés avec un produit de santé sont régis par la loi n° 2004-806 du 9 août 2004 et son décret d'application n°2006-477 du 26 avril 2006. En France, qu'il s'agisse d'un médicament ATMP ou d'une préparation, tous les essais cliniques réalisés avec un produit cellulaire doivent être autorisés quelque soit leur statut. La procédure d'autorisation est la même, les critères d'autorisation sont les mêmes mais les dossiers de demandes sont légèrement différents. L'évaluation de la demande de l'essai clinique visant à s'assurer de la sécurité des patients est faite par deux organismes. Le comité de protection des personnes (CPP) qui émet un avis et l'AFSSAPS qui autorise l'essai clinique. Pour autoriser ou non, cette dernière s'appuie sur l'avis du groupe de travail de thérapie cellulaire. Dans le cadre des recherches biomédicales, tout produit de thérapie cellulaire, qu'il ait un statut de médicament ou de préparation de thérapie cellulaire, est soumis à la pharmacovigilance.

Concernant les critères d'évaluation, qu'il s'agisse d'une demande d'autorisation d'essai clinique ou d'AMM, et quel que soit le statut de ces produits, un dossier documentant la qualité, la sécurité, l'efficacité du produit doit être joint. Ceci afin d'apporter au patient qui va recevoir ces produits les mêmes garanties de qualité, de sécurité et d'efficacité du produit cellulaire.

Parmi les données de qualité le matériel de départ et le produit fini doivent être caractérisés, l'innocuité microbiologique du produit doit être prouvée. La composition qualitative et quantitative ainsi que la recherche des impuretés doivent être étudiés.

En tant que médicaments, ces produits cellulaires sont soumis au chapitre 2.6.27 de la Pharmacopée Européenne. Cette monographie impose des « contrôles microbiologiques des

produits cellulaires », 6<sup>ième</sup> édition en cours de validité, jusqu'au 31/12/2010. La septième version est en cours de réalisation.

Cela impose donc de réaliser pour la BTC des contrôles microbiologiques des milieux de cultures de cellules épithéliales (ECCM), afin de garantir l'innocuité microbiologique des greffons.

Dans ce cadre d'utilisation, chaque structure doit donc prouver qu'elle est capable de détecter une contamination microbiologique des ECCM. Il convient donc de valider sur site la méthode de détection conformément à la monographie 2.06.27. Cette validation est nécessaire, même si la méthode utilisée, l'est déjà dans d'autres laboratoires.

Ce cadre réglementaire concernant les produits cellulaires rejoint le cadre réglementaire récent imposé à la biologie médicale par l'Ordonnance n°2010-49 du 13 janvier 2010 relative à la biologie médicale.

Cette ordonnance impose aux laboratoires de se conformer à la norme NF ISO EN 15189 afin de s'inscrire dans une « démarche qualité ». Ceci dans un délai de 6 ans à partir de janvier 2010.

Cette norme internationale concernant les laboratoires de santé humaine, aussi bien publics que privés, comporte plusieurs chapitres dont un exigeant la validation des méthodes d'analyses sur site (chap. 5.6).

Insistons sur le fait que la BTC n'est pas un laboratoire de biologie médicale au regard de l'article L6212-1 de l'ordonnance n°2010-49.

Mais, dans le cadre du présent travail, on peut rapprocher cette démarche de validation du système automatisé BacT/ALERT<sup>®</sup> 3D à la BTC, de la validation de méthode sur site qu'impose la norme NF ISO EN 15189 (et NF ISO EN 17025) pour tous les LAM.

## IV. Le BacT/ALERT 3D

### 1. Présentation

Le BacT/ALERT<sup>®</sup> 3D est un système automatisé d'incubation de flacons d'hémocultures destiné à mettre en évidence des microorganismes dans le sang des patients suspects de bactériémies. C'est un automate développé par l'industriel français Biomérieux (Lyon, France).

Ce système est cependant capable de détecter la pousse de microorganismes dans d'autres types de liquides biologiques et est couramment utilisé dans ce but. Dans les laboratoires 'analyses médicales ce genre d'automates peut également servir à la détection de microorganismes dans des liquides tels que des liquides de ponctions pleurales, d'ascite, de genoux...

### 2. Principe

C'est une étuve incubant des flacons d'hémocultures, à 37°C, avec un mouvement d'agitation régulier, munie d'un système de lecture optique lisant toutes les 10 minutes. Le sang est mis dans les flacons au cours d'une prise de sang via les systèmes Vacutainer<sup>®</sup>.

Le volume de sang recueilli dans les flacons doit être compris entre 5 ml et 10 ml de sérum. Le principe de détection des microorganismes est basé sur la modification de couleur d'un indicateur colorimétrique.

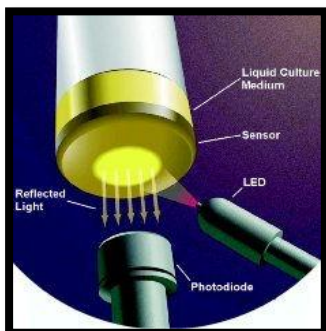


Figure 5 : Principe du faisceau de lecture.

Cet indicateur est situé à la base des flacons, séparé du liquide par une membrane perméable au dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>).

Le CO<sub>2</sub> est produit par le métabolisme des micro-organismes et passe à travers la membrane de manière passive, ce qui produit une réaction chimique acidifiant



Figure 6 : Changement de couleur de l'indicateur colorimétrique (Biomérieux).

l'indicateur colorimétrique. Ceci a pour effet de le faire changer de couleur (Figure 6).

A intervalles réguliers, toutes les 10 minutes, un faisceau lumineux est émis en direction de l'indicateur colorimétrique (Figure 5). La lumière réfractée par l'indicateur colorimétrique est captée par un capteur. Celui-ci reçoit le faisceau puis cette information est ensuite envoyée dans le logiciel de traitement. Le signal recueilli est ensuite analysé selon trois algorithmes (seuil, delta et pente). Puis selon l'analyse le flacon est détecté comme positif ou non. Si le flacon est analysé comme négatif, l'incubation est poursuivie jusqu'à ce qu'il soit positif ou jusqu'au terme du délai d'incubation préalablement défini et est rendu comme définitivement négatif.

Il existe de rares faux positifs et sont observés notamment chez les patients atteints de leucémies aigües avec de très forte leucocytoses. En effet les leucocytes consomment de l'oxygène et produisent en retour du CO<sub>2</sub> pouvant tromper l'automate.

### **3. Différents types de flacons**

Les différents types de flacons seront cités ci-dessous en exemple. Il existe plusieurs types de flacons afin de détecter différentes catégories de germes. Ces flacons contiennent un milieu de culture, sensé améliorer la pousse des germes à mettre en évidence ; et contiennent comme évoqué ci-dessus l'indicateur colorimétrique :

- Les flacons FA sont destinés à la mise en évidence et à la pousse des bactéries aérobies, ils permettent cependant également de détecter la présence de pathogènes non bactériens tels que les levures et fungi ;

Ces tubes contiennent du charbon destiné à neutraliser les antibiotiques contenus éventuellement dans le sérum des patients.

Le flacon contient un milieu nutritif à base de trypticase soja.

- Les flacons SN destinés à la mise en évidence des bactéries anaérobies. Ils permettent également aux bactéries non aérobies strictes d'être mise en évidence ;
- Les flacons MB/BacT plus adaptés pour la mise en évidence des levures et fungi.

# Deuxième Partie

## I. Introduction

Le système automatisé BacT/ALERT<sup>®</sup> 3D, commercialisé par Biomérieux (Lyon, France), est un automate destiné les bactériémies chez les patients cependant cette capacité à détecter des microorganismes est utiliser pour détecter des contaminations bactériennes et fongiques dans les milieux de cultures cellulaires utilisés à la Banque de tissus cellulaires (BTC) des Hospices civils de Lyon (Hôpital Edouard Herriot).

Il convient donc de s'assurer qu'il est capable de détecter le développement de microorganismes dans d'autres types d'échantillons biologiques, il a donc été réalisé un protocole de validation de cet automate conjointement au Laboratoire de contrôle de L'AFSSAPS (Paris) et à la BTC.

L'ingénierie tissulaire permet d'ouvrir de nouveaux horizons pour la médecine et la prise en charge de certaines pathologies telles que les brûlures étendues [28]. Des feuillets épidermiques sont d'ailleurs utilisés depuis longtemps dans cadre [29, 30, 31, 32] ainsi que des cellules souches limbiques de la cornée [33, 34, 35]. De tels tissus sont prélevés sur des patients ayant un certain environnement bactérien et ces tissus ne sont donc pas stériles.

Ces tissus doivent obéir à la réglementation française et européenne (directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil le 31 mars 2004), car ils sont considérés comme des médicaments. La sécurité de ces produits doit être prouvée et chaque étape de la production doit être validée. Depuis 1998, il existe en France des GMP concernant la préparation des tissus cellulaires.

La monographie 2.6.27 de la Pharmacopée Européenne donne une méthode de validation.



Comme nous l'avons dans la première partie (chap. 5 exigences réglementaires) la sécurité de ces produits est obligatoire pour la mise sur le marché.

A l'heure actuelle plusieurs méthodes (automatisées ou non) sont reconnues dans la Pharmacopée Européenne (Chap. 5.1.6 « méthodes alternatives pour le contrôle de la qualité microbiologique ») [36]. Pour ce qui concerne les méthodes automatisées trois en particulier sont disponibles sur le marché avec l'étiquetage CE :

- BacT/ALERT® 3D [37], (Biomérieux, France) ;
- eBDS (Pall Corporation, USA) [38] ;
- et le système d'analyse (Hemosystem, France).

La technique BacT/ALERT® 3D a été choisie comme méthode pour le contrôle microbiologique parce qu'elle présente l'avantage de fournir des résultats plus rapidement que la méthode conventionnelle, qui exige des temps d'évaluation 14 jours [36].

L'objectif de cette étude est de qualifier et valider l'utilisation de BacT/ALERT® 3D pour le contrôle microbiologique des milieux de cultures de cellules épithéliales (ECCM), ceci pour différentes espèces microbiologiques et à faible densité de contamination. Il a donc dans ce but étéensemencé des flacons avec des souches bactériennes référencées. Et ensuite une incubation c'est faite dans le BacT/ALERT afin de voir si ces souches sont retrouvées.

Ce protocole de validation est expliqué ci-dessous, sous forme d'article en anglais, puisque ce travail sera soumis à publication dans une revue de langue anglaise. Seule la discussion et la conclusion sont reprises en français.

## II. Article

### **Validation of the BacT/ALERT<sup>®</sup> 3D automated culture system for the detection of microbial contamination of « epithelial cell culture medium »**

E. Plantamura<sup>1</sup>, V. Langeron, G. Huyghe<sup>2</sup>, B. Panterne<sup>2</sup>, N. Delesalle<sup>2</sup>, A. Thépot<sup>3</sup>, M. E. Reverdy<sup>4</sup> and O. Damour<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Banque de Tissus et cellules, Hôpital Edouard Herriot, 69437 Lyon cedex 03, France

<sup>2</sup>Unité Microbiologie et Unité Produits Sanguins et Thérapie Cellulaire Direction des Laboratoires et des Contrôles, AFSSAPS, 143-147 Bd Anatole France, 93285 St Denis cedex, France

<sup>3</sup>CellSeed France S.A.R.L., 5 Place Charles Béraudier, 69428 Lyon, France

<sup>4</sup>Centre de Biologie et de Pathologie Est, Institut de microbiologie, 59 Bd Pinel, 69 677, Bron cedex, France

#### **Running head**

BacT/ALERT<sup>®</sup>3D validation for microbial detection

#### **Corresponding author**

Odile Damour, Banque de Tissus et cellules, Hôpital E. Herriot, Lyon, France.

Tel: +33472110618; Fax: +33472110619; E-mail: odile.damour@chu-lyon.fr

## **Abstract**

Regenerative medicine using tissue-engineering technology is expected to open a new area in medical science. Such living tissue cannot, therefore, withstand the usual pharmacopoeia methods of purification and terminal sterilization. For this reasons, these products must be manufactured in aseptic conditions on controlled facilities and microbiologically controlled. The aim of this study is the validation of BacT/ALERT<sup>®</sup>3D automated culture system for the microbial control of Epithelial Cell Culture Medium (ECCM).

Study design and methods: serial dilutions of 10 species of bacteria and fungi, according to the European Pharmacopoeia (Chap.2.6.27 : “Microbiological control of cellular products”), were prepared, and two negative controls. Dilutions and Bioballs<sup>™</sup> containing from 6 to 260 CFU/ml were inoculated into culture bottles FA and SN (Biomérieux, Lyon, France) and incubated 10 days at 37°C in a BacT/ALERT<sup>®</sup>3D automated culture system. For each species, 5 contaminations were realized for the reproducibility testing. One sample from each species was incubated in the AFSSAPS laboratory as a reference; the 4 others were incubated in the “Banque de Tissus et Cellules”, Lyon, France. Positive bottles were removed from the system and subcultured to insure the identity of bacterial growth.

Results: The BacT/ALERT<sup>®</sup>3D system detected 100% of micro organisms at low contamination. Detection delays were ranged from 3.84 to 69.12 hours depending on the species tested and of the inoculum. No false positive signal was detected on the negative controls.

Conclusion: our results are consistent with the recommendations of the monograph of European Pharmacopoeia 2.6.27. They show the specificity of the method BacT/ALERT<sup>®</sup>3D, since the germs seeded at low density have been detected in both site and that the uncontaminated medium ECCM remained negative at 7 days.

## **Key words**

BacT/ALERT<sup>®</sup>3D, epithelial cell sheet, microorganism, European Pharmacopoeia, FA and SN bottles.

## **Introduction**

Regenerative medicine using tissue-engineering technology is expected to open a new area in medical science [28]. Cultured epidermal sheets are used for a long time for extensive burn treatment [29, 30, 31, 32], limbal epithelial stem cells as well as oral mucosa epithelial cell sheet for limbal epithelial stem cell deficiency [33, 34, 35]. Such living tissue cannot, therefore, withstand the usual pharmacopoeia methods of purification and terminal sterilization. For this reasons these products must be manufactured in aseptic conditions on controlled facilities and microbiologically controlled. From 1998, in France, Good practices exist concerning tissues and cells preparation. Recently, European regulation (1394/2007/EC) defined tissue-engineering products as medicinal products, They follow European regulation (Directive 2004/23/EC and 2006/17/CE of European Parliament and Council of March 31<sup>st</sup> 2004) for their procurement. The safety of these products must be proved and every step of the production must be validated. The microbiological conditions are therefore controlled at well defined steps from procurement to administration to the patient.

Several methods are recognized as a valid method for this kinds of products in the European Pharmacopoeia (EurPh.), such as monography 2.6.27 “Microbiological control of cellular products” [36] and monography 5.1.6 “Alternative methods for control of microbiological quality” and different devices to implement these methods are available on the market with CE labelling: BacT/ALERT<sup>®</sup>3D [37], (Biomérieux, France) or Bactec (Becton Dickinson, USA) for automated culture system, eBDS (Pall Corporation, USA) [38] and Scan System (Hemosystem, France) [39]. Other methods by flow cytometry [40] or by PCR [41] have

also been validated for platelets and for diagnosis of some ophthalmology bacterial infections respectively but that are not still available everywhere. BacT/ALERT<sup>®</sup>3D, automated technology with real-time reading is widely used by the laboratories and has been shown to be more sensitive than traditional culture method [42]. The eBDS system is simple and detects the bacterial proliferation by measure of the consumption of oxygen. Therefore, it is not adapted to the detection of the anaerobic bacteria. Finally, the Scan System technique allows the direct detection in 70 minutes of bacteria by a cytometric method in solid phase. This technique requires an important technicity and complex equipment. For all these techniques, the level of detection depends on the volume of the sample and there is an important risk of defect of enrichment.

BacT/ALERT<sup>®</sup>3D test method has been chosen as microbiological testing because it has the advantage to provide results more rapidly than conventional method, which required 14 days evaluation time [36] and as validation for cell or tissue-engineering have already been provided [42, 43].

The aim of this study was to qualify and validate the use of BacT/ALERT<sup>®</sup>3D test for microbiological control of Epithelial Cells Culture Media (ECCM) medium used for the culture of the epithelial cell sheet by the detection of all the microbiological species seeded at low density in 2 sites, at Banque de Tissus et Cellules (BTC), Lyon, France and AFSSAPS, Paris, France.

## **Materials and Methods**

### Bacteria and fungi strains for contamination

Nine microorganisms, according to European Pharmacopoeia “Monography 2.6.27: Microbiological control of cellular products”, were selected to perform this study. These included *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 (*A. brasiliensis*), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*B. subtilis*), *Candida albicans* ATCC 10231 (*C. albicans*), *Clostridium sporogenes* ATCC 19404 (*C. sporogenes*), *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 (*P. acnes*),

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (*P. aeruginosa*), *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (*S. aureus*), *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 (*S. pyogenes*), *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610 (*Y. enterocolitica*). A strain of *Streptococcus oralis* wild strain AFSSAPS ref AM 176 (*S. oralis*) was included in the set of test because of its resistance to double surgical asepsis using Polyvidone-Iodine (data not shown).

#### ECCM medium

ECCM medium is a 3:1 mixture of DMEM and Ham's F12 (Invitrogen) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (HyClone Fetal Clone II), epidermal growth factor (EGF) (Austral Biologic, 10 ng /mL), insulin (Lilly, 0.12 IU/mL), hydrocortisone (UpJohn, 0.4 µg/mL), triiodo-L-thyronine (Sigma, 5 µg/mL), selenium (Aguettant, 0.033 µg/mL), isuprel (Abbott, 0.4 mg/mL), penicillin 100 UI/mL, streptomycin 100 µg/mL and fungizone 1µg/mL.

#### BacT/ALERT® media

BacT/ALERT® FA bottles for aerobics microorganism's growth, containing tryptic soy broth and charcoal, and SN bottles for anaerobics microorganim's growth, without charcoal. All bottles were purchased at Biomérieux (Lyon, France).

#### Preparation of bacterial suspensions:

For *A. brasiliensis*, *B. subtilis*, *C. albicans*, *C. sporogenes*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, Bioball™ were used. Bioball™ is freeze dried water soluble ball containing a precise number of bacteria (calibration 30 CFU/ml).

For *P. acnes*, *S. pyogenes*, *Y. enterocolitica*, *S. oralis*, a calibration of the inoculum was necessary. A 2 Mc Farland suspension, with a theoretic concentration of  $6 \times 10^8$  bacteria per ml, was prepared. From this suspension, serial dilutions were prepared to obtain  $10^3$  CFU/ml.

#### ECCM medium contamination prior to BacT/ALERT® seeding:

Contaminations of the ECCM were realized with 10 species of bacteria and fungi (8 strains of bacteria, one strain of fungus and one of yeast). The medium was tested in normal conditions of use (temperature and conservation time).

For each microorganism, one tube containing 9ml of ECCM was contaminated with 1 ml of contaminating suspension at density of  $10^3$  UFC/ml of germ suspension, or with 2 Bioballs™.

#### Fertility and sterility controls of batches of FA and SN BacT/ALERT® media

As recommended in the European Pharmacopoeia 2.6.27, fertility tests and sterility tests have been done. For fertility tests 1 bottle of each batch of FA and SN BacT/ALERT® medium was tested. For FA BacT/ALERT® medium was seeded with *B. subtilis*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* and for SN with *C. sporogenes*.

Sterility controls were performed on 3 FA and 3 SN bottles incubated without any contamination.

#### BacT/ALERT® seeding:

All BacT/ALERT® bottles were seeded by injection with 5 ml syringe supplied with a needle, in sterile conditions under flow cabinet.

For each microorganism, 5 FA and 5 SN BacT/ALERT® were inoculated with the 5ml contaminated ECCM, as recommended by Biomérieux (Lyon, France). A negative BacT/ALERT® medium control without bacteria was also inoculated in each 2 runs of inoculation.

#### Incubation:

After seeding, one pair of FA and SN, bottles was immediately incubated in the BacT/ALERT®3D of AFSSAPS laboratory (Paris, France). The four other pairs were sent to be incubated in the BacT/ALERT® 3D of BTC (Lyon, France) in less than 24h after

transport at controlled temperature of  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . All bottles were incubated until their positivity in BacT/ALERT<sup>®</sup> 3D automate and at least 7 days for negative controls.

### Identification control

To insure the identification and purity of the contaminating microorganisms, one pair of FA and SN BacT/ALERT<sup>®</sup> media contaminated with each germ was analyzed by Gram coloration and subculture on agar plates for identification with Vitek<sup>®</sup>2 Compact (Biomérieux, France) at AFSSAPS laboratory.

*A. brasiliensis* has been identified with subculture and optic microscopy observation.

## **Results**

### Fertility and negative controls

*B. subtilis*, *C. albicans*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* grown in contaminated FA bottles and *C. sporogenes* in SN anaerobic bottle confirm the batch fertility of FA and SN BacT/ALERT<sup>®</sup> media.

Negative controls (medium without bacteria) being always negative, proves their sterility and the absence of false positives results.

### BacT/ALERT<sup>®</sup> results in contaminated bottles

The figure 1a presents the results of the delays to detect the growth of each strain contaminating the 5 FA and SN BacT/ALERT<sup>®</sup> bottles in the both sites. The diagrams of figures 7 and 8 present the comparison of the positivity delay between the 2 sites, figure 7 for FA bottles (aerobic medium) and figure 8 for SN bottles (anaerobic medium).

Table 1 shows that most of the microorganisms incubated at the 2 sites grew in less than 24h. Only fungi detection was delayed but in less than 3 days (93h). For *A. brasiliensis* as well as *C. albicans*, they grew more quickly in BTC after transportation at  $20^{\circ}\text{C}$  than in



AFSSAPS controlled laboratory in which they were incubated at 37°C immediately after seeding.

Strains	AFSSAPS		BTC	
	FA Lot : 1024473	SN Lot : 1024499	FA Lot : 1024473	SN Lot : 1024499
Negative control 1	negative	negative	negative	negative
<i>Clostridium sporogenes</i> ATCC 19404	negative	27.2	negative	41.2
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	16.4	13.2	10.8	8.8
<i>Streptococcus pyogenes</i> ATCC 19615	14.8	12.3	8.5	7.0
<i>Streptococcus oralis</i> AFSSAPS ref AM 176	16.7	13.4	14.9	10.7
<i>Yersinia enterocolitica</i> ATCC 9610	17	15.2	5	4.1
Negative control 2	negative	negative	negative	negative
<i>Aspergillus niger</i> ATCC 16404	48	negative	39.4	negative
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12.2	13.2	7.7	12.5
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	93.6	36.6	27.8	21.9
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027	16.4	16.1	9.5	14.6
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	negative	62.4	negative	68.7

**Table 1 : delay of detection for each laboratories (hours).**

Figure 8 in anaerobic specific medium shows that the detection was less of 24h for most of micro organisms. Only some small differences were observed: most of anaerobic strains grew faster in BTC, probably because the zero point was taken after 24h of transport even if it was transferred at 20°C.

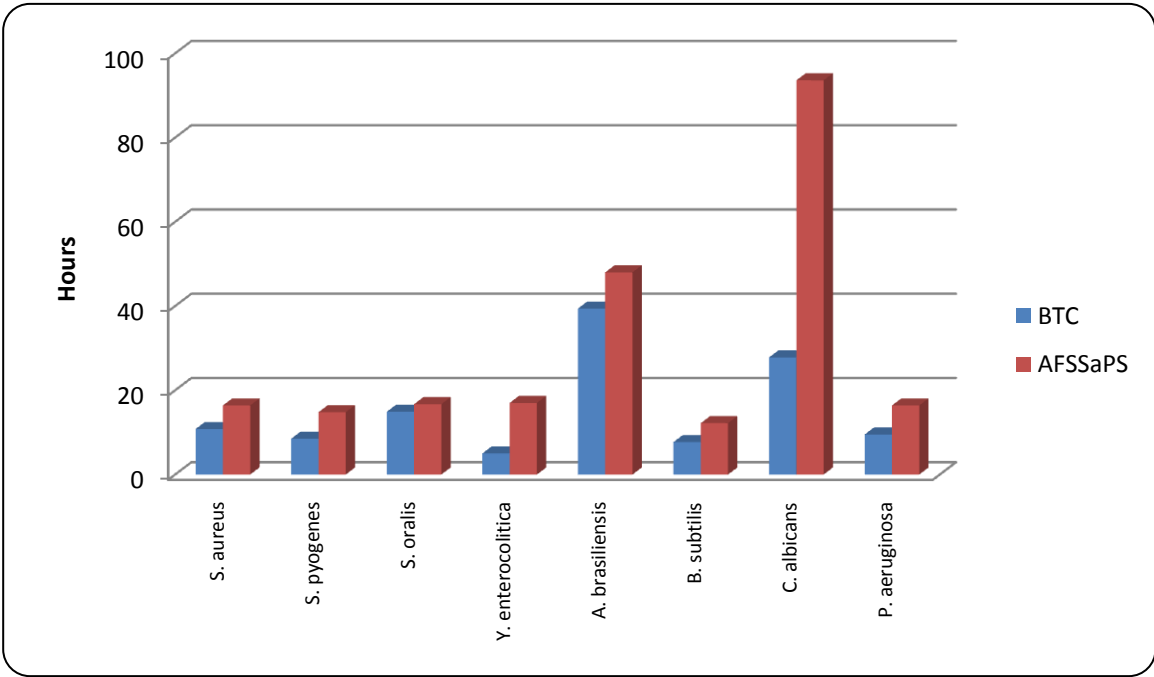


Figure 7 : detection delay for strains in FA bottles (hours).

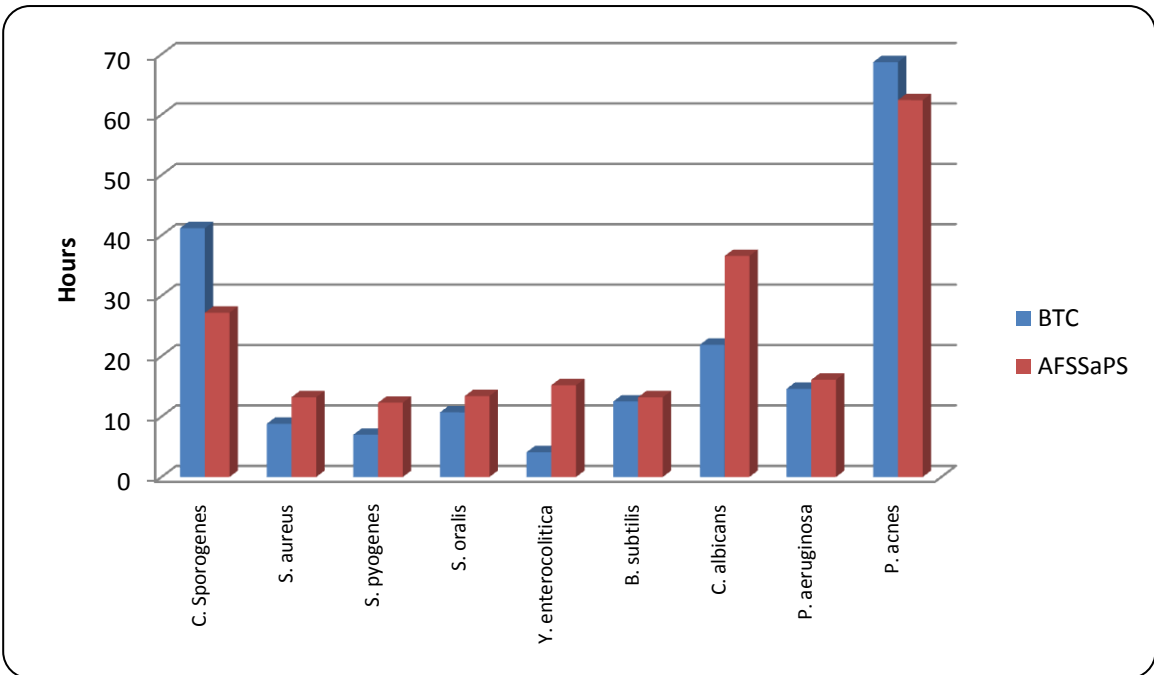


Figure 8 : detection delay for strains in SN bottles (hours).

### Strains identifications

Identification results of the strains contaminating BacT/ALERT<sup>®</sup> media after incubation are reported in the table 1. They show that the percentage of identification was always  $\geq 90\%$ , proving the identification of each contaminating strains and purity.

Strains	Percentage of identification
<i>Clostridium sporogenes</i>	99
<i>Staphylococcus aureus</i>	96
<i>Streptococcus pyogenes</i>	99
<i>Streptococcus oralis</i>	90
<i>Yersinia enterocolitica</i>	99
<i>Bacillus subtilis</i>	87
<i>Candida albicans</i>	99
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	99
<i>Propionibacterium acnes</i>	97

**Table 2 : Percentage of identification for each strain with Vitek 2.**

### **Discussion**

Among safety assays required by the drug regulation, such as viral contamination, tumorigenicity [46] microbiological assays are of particular importance to follow the sterility during all the process for ATMP. The aim of the study is to show that BacT/ALERT<sup>®</sup> 3D is validated to detect microorganisms in ECCM medium at low density, in order to ensure the security of epithelial cell sheet before transplantation. Our results clearly show that the BacT/ALERT<sup>®</sup> 3D system is validated to detect contaminations of organisms even when they are seeded at low density as it is required in the European Pharmacopoeia. Indeed, 100 % of contaminating bacteria were found in less than 2 days for 9 strains on 10 and 3 days for *C. albicans*. This time is consistent with a release of the finished product 4 days later. Our results confirm that 7 days incubation are sufficient corresponding to request of the 2.6.27 chapter of EurPh and is in agreement with results on

mononuclear cells [42]. This delay allows detecting micro-organisms with slow growth. Indeed, in this case, after identification and antibiogram realization, treatment may be administered to patients as soon as possible. The choice of this method is based on its rapidity to obtain results that is inherent to the needs of these products. Our results confirm the interest of BacT/ALERT<sup>®</sup> system, not only for blood culture, but for other type of samples such as cornea organoculture media closer to our culture media. The choice of BacT/ALERT<sup>®</sup> is based on the fact that the methodology provided has been validated for some cellular products and it is described in the 2.6.27 chapter of the European Pharmacopoeia. Comparing to eBDS (Pall Corporation, USA), it allows the detection of aerobic and anaerobic strains. Detection of the bacteria is sufficiently fast even if Scan System (Hemosystem, France) is much faster but with BacT/ALERT<sup>®</sup> operating costs are moderate (reliable and robust machine, limited maintenance). BacT/ALERT<sup>®</sup>3D does not require highly skilled staff because it is simple and easy to use. His software ensures traceability of results provided by a record every 15 minutes. Indeed, in principle, BacT/ALERT<sup>®</sup>3D, automated bacterial incubator and detector, allows the growth detection of aerobic and anaerobic microorganisms [35]. A sensor is located on the bottom of the culture bottle and is separated from the liquid medium by a membrane that is selectively permeable to CO<sub>2</sub>. CO<sub>2</sub> is produced by actively metabolizing microorganisms, causing acidification of the sensor, with a concomitant shift in the emission spectrum of a colorimetric dye. The change in signal intensity is proportionate to the emission shift of the sensor dye are recorded and transmitted to a computer.

The nine strains potentially contaminating were chosen because they are booked in the European Pharmacopoeia.

*S.oralis* (wild strain AFSSAPS ref AM 176) was added because a preliminary study on healthy volunteer persons shows that this bacterium was detected even after double surgical asepsis of oral mucosa using Polyvidone iodine.

Concerning fungi, *A. brasiliensis* and *C. albicans*, we were glad to confirm that they could be detected in these conditions 37°C instead of 21°C. If *C. albicans* could grow on both aerobic and anaerobic conditions and we confirm that *A. brasiliensis* can grow only in aerobic atmosphere. In BTC, both were detected in less than 2 days. But the difference observed with AFSSAPS could be due to the transport at 20±2°C that allows better growth of fungi. However, in AFSSAPS where bottles were incubated immediately after seeding at 37°C they were detected in less than 3 days. This result shows that BacT/ALERT® system is validated for fungi.

Whatever the seeded strains contaminating ECCM medium, 100% were found positive for low level of contamination, as they were incubated in the BacT/ALERT®3D system of AFSSAPS or in the BTC of Lyon. Six germs of ten were found in both aerobic and anaerobic media that confirm the results. *A. brasiliensis*, germ strictly aerobic, has been found only in aerobic bottles BacT/ALERT® FA. This fungus is known as strictly anaerobic such as *C. sporogenes*, and *P. acnes*. From the 10 *P. aeruginosa* infected bottles only one remained negative at BTC. But, 5 aerobic and the 4 anaerobic were positive. We suggest that the absence of *P. aeruginosa* in one bottle is due to one heterogeneous distribution and that anaerobic atmosphere is not favorable for these bacteria.

The sensitivity of the method was demonstrated by the rapid growth detection of all the microorganisms seeded at low density in ECCM which 5ml were inoculated in FA and SN bottles, according to the furnisher recommendation conditions. Indeed, their systematic detection after a minimum of 5h for *Y. enterocolitica* to maximum of 93.6h for *C. albicans*. Reproducibility was demonstrated since whatever the bottle and site, all the microorganisms were detected.

This medium has been validated without antibiotics because one week before transplantation they are removed of the medium in order to avoid allergy risks and latent infections.

In conclusion, our operating inoculation conditions of 5ml culture medium allow detecting 100% of aerobic and anaerobic bacteria and fungi in less than 48 hours except for *P. acnes* and *C. albicans*. *P. acnes* is detected in less than 3 days and *C. albicans* in less than 4 days. Because 8/10 microorganisms are detected in less than 2 days, an intermediate result of two days is very interesting before the release of fragile and not stable final products. The incubation period of 7 days is sufficient to eliminate the risk of bacterial and fungal contamination

In conclusion, our results are consistent with the recommendations of the monograph of European Pharmacopoeia 2.6.27. They show the specificity of the method BacT/ALERT®3D, since the germs seeded at low density have been detected in both site and that the uncontaminated medium ECCM remained negative until 7 days.

#### **Acknowledgments:**

We thanks Biomérieux for the lent of BacT/ALERT®3D system during all the study and Vincent Langeron for his help for writing.

#### **Conflicts of interest**

The material presented in this article is original research which has not been previously published and has not been submitted for publication elsewhere while under consideration. We certify that we have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the appropriateness of the experimental design and method, and the collection, analysis, and interpretation of the data. All authors have reviewed the final version of the manuscript and approve it for publication. All the authors declare no personal or financial conflict of

interest and have not entered into any agreement that could interfere with our access to the data on the research, or upon our ability to analyze the data independently, to prepare manuscripts, and to publish them.

### **III. Discussion**

Le but de cette étude était donc de valider le système BacT/ALERT<sup>®</sup> 3D pour détecter les contaminations microbiologiques des milieux de culture cellulaire avant la transplantation des greffons chez des patients receveurs.

Le fait que les témoins négatifs soient restés négatifs prouve qu'il n'y a pas eu de contamination lors de la validation de la méthode et que nous n'avons pas mis en évidence de faux positifs.

Les contrôles de stérilité et fertilité réalisés prouvent que les lots de flacons utilisés étaient qualifiés pour l'étude.

Les souches contaminantes ont été choisies du fait qu'elles sont référencées dans la Pharmacopée Européenne, comme contaminants potentiels. Une souche, *S. oralis* (souche sauvage AFSSAPS réf. AM 176) a été ajoutée car une étude locale à la BTC montre que celle-ci fait partie de la flore normale de la cavité orale [41] et qu'elle n'est pas éliminée après une double asepsie chirurgicale de la muqueuse orale utilisant de la povidone iodée (Bétadine<sup>®</sup>).

Le délai d'incubation a été fixé à 10 jours au maximum pour les flacons restant négatifs [42] ce qui permet de détecter les microorganismes à pousse lente.

Ce délai, fixé à l'origine par l'AFSSAPS est compatible à ce que recommande la monographie 2.6.27 de la Pharmacopée Européenne, qui recommande un délai de 7 à 14

jours d'incubation. Il permet d'avoir une marge de sécurité après l'émission d'un résultat, et de faire une identification bactérienne et un antibiogramme afin de traiter le receveur du greffon si toutefois le milieu devait se révéler contaminé.

L'identification microbiologique montre bien que les souches contaminantes initiales ont été retrouvées et la réalisation de coloration de Gram montre qu'il n'y a pas eu de contamination.

Plusieurs méthodes existent et sont reconnues par la Pharmacopée Européenne. Le choix de la méthode BacT/ALERT<sup>®</sup> a été basé sur sa rapidité pour obtenir des résultats fiables nécessités par le type de prélèvement traité. Les résultats confirment le choix et l'intérêt de la méthode BacT/ALERT<sup>®</sup>, pas seulement pour les hémocultures [43, 44] mais également pour d'autres types de liquides biologiques tels que les milieux de cultures cellulaires. Un autre argument de choix est que cette méthode est reconnue par la Pharmacopée Européenne. En comparaison au système tels que eBDS (Pall Corporation, USA), il permet la détection des microorganismes aérobies et ceux anaérobies. Le système de détection de BacT/ALERT est moins rapide que celui du système Scan System (Hemosystem, France) cependant il ne nécessite pas de personnel hautement qualifié, et ses coûts d'achat et de maintenance sont réduits (automate robuste avec maintenance limitée). De plus son système informatique est convivial et permet un enregistrement des données toutes les dix minutes, ce qui assure une bonne traçabilité [45].

Il est à noter qu'il existe sur le marché un appareil concurrent, le BACTEC 9240 (BD, USA).

Les résultats montrent clairement que le système automatisé BacT/ALERT<sup>®</sup> 3D est validé pour détecter les contaminations possibles des milieux de culture de cellules épithéliales par des microorganismes, même à de faible densité, comme le recommande la Pharmacopée



Européenne. En effet, 100 % des souches contaminantes ont été retrouvées en moins de deux jours pour neuf d'entre elles et moins de quatre jours pour *C. albicans*. Ce délai de détection est compatible avec le départ d'un produit fini de greffe quatre jours plus tard.

Ces résultats montrent également que le délai initial d'incubation fixé à dix jours peut vraisemblablement être diminué à 7 jours.

Quelles que soient les souches, 100 % de celles-ci ont été détectées. A propos de *A. brasiliensis* et *C. albicans*, nos résultats montrent que ces levures et champignons sont capable de pousser à 37°C au lieu de 21°C. Si *C. albicans* peut pousser à la fois dans les milieux aérobie et anaérobie nous confirmons que *A. niger* est bien strictement aérobie. A la BTC tous les deux ont été détectés en moins de deux jours, mais la différence observées avec l'AFSSAPS est peut être due au transport à  $20 \pm 2$  °C qui se rapproche de l'optimum de température de culture des fungi. En effet à l'AFSSAPS les flacons étaient incubés immédiatement après inoculation à 37 °C. Ils ont cependant été détectés en moins de quatre jours. Ce résultat montre que le système BacT/ALERT® est validé également pour la détection des levures et fungi, même sans utiliser de flacons spécifiques à ce type de germes.

Pour *P. aeruginosa* un seul flacon anaérobie sur les 5 ensemencés est resté négatif. Ceci est probablement du au fait que cette atmosphère n'est pas celle préférée par ce germe et au fait qu'étant à de faible concentration de microorganisme par millilitre la répartition des germes dans le milieu contaminant les flacons n'est pas homogène. Par conséquent ce flacon n'est pas un faux négatif de notre méthode, mais vraisemblablement ce flacon n'a pas été contaminé par la bactérie.

#### IV. Conclusions

Nos résultats sont conformes aux recommandations de la monographie 2.6.27 de la Pharmacopée Européenne. Ils montrent la spécificité, la sensibilité et la reproductibilité de la méthode BacT/ALERT<sup>®</sup> 3D, puisque tous germes ensemencés à faible densité dans les flacons ont tous été détectés et sur les deux sites identifiés au contaminant d'origine, et que les contrôles négatifs sont restés négatif.

Nos conditions d'inoculation par 5 ml de milieu de culture de cellules épithéliales contaminés par des microorganismes permettent la détection de 100 % des souches aérobies et anaérobies. Pour huit souches sur dix, le délai de détection est inférieur à 48 heures sauf pour *P. acnes* et *C. albicans* détectées en moins 4 jours. Comme huit souches sur dix sont détectées en moins de 48 heures, un résultat intermédiaire à deux jours permet la libération du produit fini. La période d'incubation de 10 jours est suffisante pour éliminer le risque de contamination bactérienne et fongique tardive par des germes à pousse lente. Le système automatisé BacT/ALERT<sup>®</sup> 3D est une technique robuste, fiable et reproductible. C'est également une technique rapide de détection.

## Annexes

### Annexe 1 : résultats détaillés de la BTC

Souche	N° essai	Densité (UFC/ml)	délai de détection		délai moyen en jours	Délai moyen en heures	% de positifs	Nombre de flacons (+)	Nombre de flacons (-)
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615									
FA	P1	90	0,36	8,64	0,355	8,52	100%	8	0
	P2	90	0,35	8,4					
	P3	90	0,35	8,4					
	P4	90	0,36	8,64					
SN	P5	90	0,28	6,72	0,2925	7,02			
	P6	90	0,29	6,96					
	P7	90	0,31	7,44					
	P8	90	0,29	6,96					
<i>Y. enterocolitica</i> ATCC 9610									
FA	Y1	49	0,22	5,28	0,21	5,04	100%	8	0
	Y2	49	0,21	5,04					
	Y3	49	0,21	5,04					
	Y4	49	0,2	4,8					
SN	Y5	49	0,19	4,56	0,1725	4,14			
	Y6	49	0,17	4,08					
	Y7	49	0,17	4,08					
	Y8	49	0,16	3,84					
<i>S. aureus</i> ATCC 6538									
FA	SA1	6	0,45	10,8	0,45	10,8	100%	8	0
	SA2	6	0,43	10,32					
	SA3	6	0,46	11,04					
	SA4	6	0,46	11,04					
SN	SA5	6	0,39	9,36	0,365	8,76			
	SA6	6	0,34	8,16					
	SA7	6	0,38	9,12					
	SA8	6	0,35	8,4					
<i>C. albicans</i> ATCC 10231									
FA	CA1	6	1,18	28,32	1,16	27,84	100%	8	0
	CA2	6	1,08	25,92					
	CA3	6	1,17	28,08					
	CA4	6	1,21	29,04					
SN	CA5	6	0,92	22,08	0,9125	21,9			

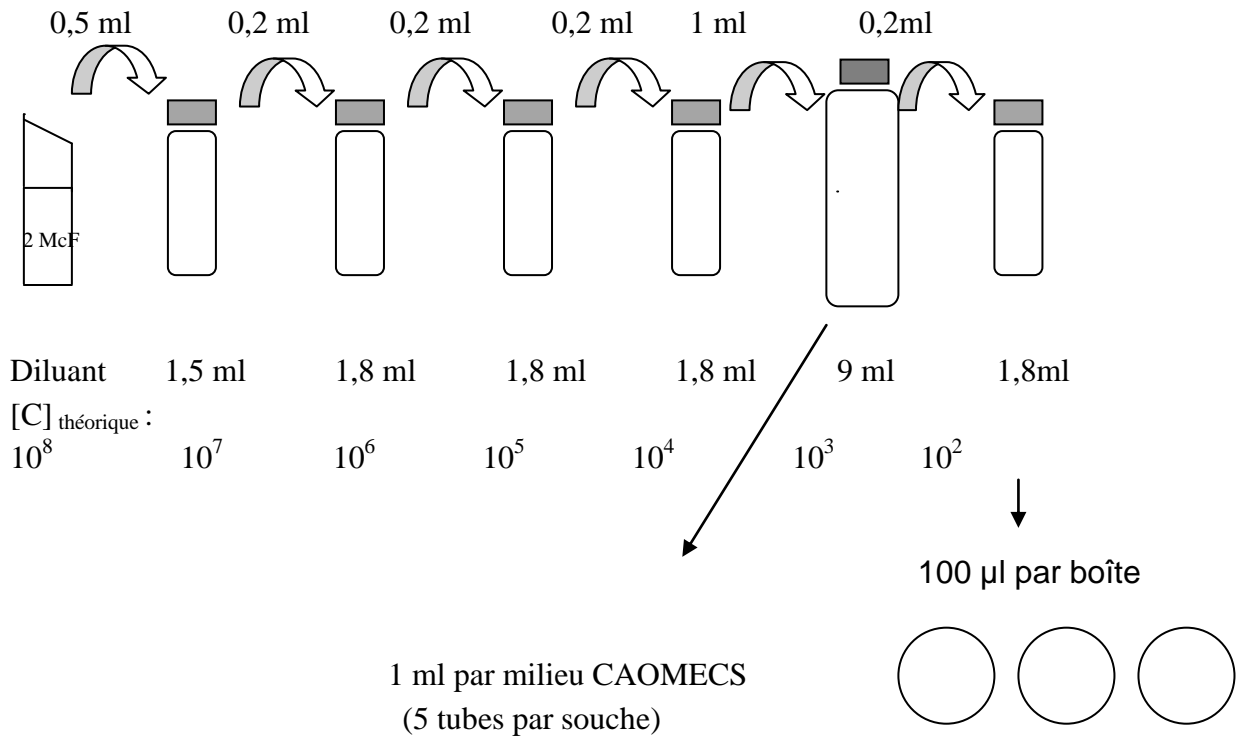
<i>A. niger</i> ATCC 16404									
FA	AN1	6	1,65	39,6	1,64	39,36	50%	4	4
	AN2	6	1,61	38,64					
	AN3	6	1,72	41,28					
	AN4	6	1,58	37,92					
SN	AN5	6	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif			
	AN6	6	Négatif	Négatif					
	AN7	6	Négatif	Négatif					
	AN8	6	Négatif	Négatif					
<i>P. acnes</i> ATCC 11827									
FA	PRA1	260	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	50%	4	4
	PRA2	260	Négatif	Négatif					
	PRA3	260	Négatif	Négatif					
	PRA4	260	Négatif	Négatif					
SN	PRA5	260	2,78	66,72	2,8625	68,7			
	PRA6	260	3,08	73,92					
	PRA7	260	2,71	65,04					
	PRA8	260	2,88	69,12					
Témoins négatifs 2									
FA	TN1	0	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	0%	0	8
	TN2	0	Négatif	Négatif					
	TN3	0	Négatif	Négatif					
	TN4	0	Négatif	Négatif					
SN	TN5	0	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif			
	TN6	0	Négatif	Négatif					
	TN7	0	Négatif	Négatif					
	TN8	0	Négatif	Négatif					
<i>C. sporogenes</i> ATCC 19404									
FA	C1	6	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	50%	4	4
	C2	6	Négatif	Négatif					
	C3	6	Négatif	Négatif					
	C4	6	Négatif	Négatif					
SN	C5	6	1,92	46,08	1,715	41,16			
	C6	6	1,75	42					
	C7	6	1,7	40,8					
	C8	6	1,49	35,76					
Témoins négatifs 1									
FA	T1	0	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif	0%	0	8
	T2	0	Négatif	Négatif					
	T3	0	Négatif	Négatif					
	T4	0	Négatif	Négatif					
SN	T5	0	Négatif	Négatif	Négatif	Négatif			
	T6	0	Négatif	Négatif					
	T7	0	Négatif	Négatif					
	T8	0	Négatif	Négatif					

<i>S. oralis</i> Afssaps ref AM 176									
FA	1	10	0,64	15,36	0,62	14,88			
	2	10	0,63	15,12					
	3	10	0,61	14,64					
	4	10	0,6	14,4					
SN	5	10	0,45	10,8	0,4475	10,74	100%	8	0
	6	10	0,45	10,8					
	7	10	0,44	10,56					
	8	10	0,45	10,8					
	CA6	6	1,02	24,48					
	CA7	6	0,81	19,44					
	CA8	6	0,9	21,6					
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633									
FA	BS1	6	0,32	7,68	0,3225	7,74	100%	8	0
	BS2	6	0,32	7,68					
	BS3	6	0,32	7,68					
	BS4	6	0,33	7,92					
SN	BS5	6	0,52	12,48	0,52	12,48			
	BS6	6	0,53	12,72					
	BS7	6	0,55	13,2					
	BS8	6	0,48	11,52					
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 9027									
FA	PSA1	6	0,39	9,36	0,3975	9,54	89%	7	1
	PSA2	6	0,4	9,6					
	PSA3	6	0,4	9,6					
	PSA4	6	0,4	9,6					
SN	PSA5	6	0,55	13,2	0,61	14,64			
	PSA6	6	0,82	19,68					
	PSA7	6	Négatif	Négatif					
	PSA8	6	0,46	11,04					

## Annexe 2 : Méthode de dilution :

### Préparation des suspensions calibrées et contamination des milieux :

#### Exemple pour la souche *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 :



## Bibliographie

- [1] Anatomie de l'œil : Massachusetts Eye & Ear Infirmary, Cornea Research Unit, Eye Research Institute, Boston, MA Kenyon, K R;
- [2] L'œil - CHU Pitié Salpêtrière. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/POLY.Chp.7.2.html>
- [3] Renard, Gilles, pp 12-20. Éd. scientifiques et médicales Elsevier, Paris. Encyclopédie médico-chirurgicale. La cornée. 2001. ISBN 2842992881.
- [4] Ocular surface reconstruction using autologous rabbit oral mucosal epithelial sheets fabricated ex vivo on a temperature-responsive culture surface. Hayashida Y, Nishida K, Yamato M, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, Kikuchi A, Okano T, Tano Y. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2005 May;46(5):1632-9.
- [5] [Limbal stem cell deficiency] Gatinel D, Hoang-Xuan T. J Fr Ophtalmol. 2000 Sep;23(7):718-28. Review. French.
- [6] Corneal epithelial wound healing. Lu L, Reinach PS, Kao WW. Exp Biol Med (Maywood). 2001 Jul;226(7):653-64.
- [7] L'œil - CHU Pitié-Salpêtrière. <http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/POLY.Chp.7.2.html>.
- [8] Tseng, S. Ophthalmology, May, vol. 5, p.709-22; discussion 722-3. Limbal autograft transplantation for ocular surface disorders 1989
- [9] Treatment of unilateral limbal stem cell deficiency syndrome by limbal autograft. Moldovan SM, Borderie V, Baudrimont M, Laroche L. J Fr Ophtalmol. 1999 Apr;22(3):302-9.
- [10] The human keratins: biology and pathology. Moll R, Divo M, Langbein L. Histochem Cell Biol. 2008 Jun;129(6):705-33. Epub 2008 May 7.
- [11] Limbal stem cell deficiency. Gatinel D, Hoang-Xuan T. J Fr Ophtalmol. 2000 Sep;23(7):718-28. Fondation ophtalmologique Adolphe de Rothschild, Service d'Ophtalmologie, 25 rue Manin, 75019 Paris, France. PMID: 10992070
- [12] Oral mucosal embryology and histology. Winning TA, Townsend GC. Clin Dermatol. 2000 Sep-Oct;18(5):499-511.
- [13] Histologie de la muqueuse buccale et des maxillaires. Auriol, M.-M.; Le charpentier, Y. Encyclopédie médico-chirurgicale. 2008.
- [14] The Structure and function of oral mucosa. Meyer, Julia; Squier, Christopher A; Gerson, S J. Pergamon Press, Oxford ; New York. ISBN 008028020X : 9780080280202 0080307787 : 9780080307787.
- [15] Institut national de la santé et de la recherche médicale (France), Les Editions INSERM, Paris, Expertise collective, Maladies parodontales : thérapeutiques et prévention : rapport établi à la demande de la Mutuelle Générale de l'Education nationale, 1999, ISBN 2855987091 9782855987095
- [16] Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S. Br J Ophthalmol. 2004 Oct;88(10):1280-4.
- [17] Atlas de poche en couleurs d'ophtalmologie : le guide de poche du Manhattan eye, ear and throat hospital . Mandava, Suresh; Sweeney, Tara; Guyer, David; Brémond-Gignac, Dominique. P 112-115. Flammarion médecine-sciences, Paris. 2001. ISBN 2257113268 9782257113269.
- [18] Histologie fonctionnelle. Young, Barbara; Heath, John W.; Wheeler, Paul R. p 92. De Boeck Université, Paris. 2001. ISBN 2744501263 9782744501265.

- [19] Corneal epithelial diseases related to limbal stem cell deficiency. Majo F, Barrandon Y, Othenin-Girard P, Toubblanc M, Hoang-Xuan T. *J Fr Ophtalmol*. 2006 Nov;29(9):1060-9.
- [20] Corneal graft rejection: donor and receiver implication. Trigui A, Smaoui M, Masmoudi J, Mhiri W, Maatoug S, Feki J. *J Fr Ophtalmol*. 2005 Jun;28(6):631-4.
- [21] Conjunctival transplantation. Thoft RA. *Arch Ophthalmol*. 1977 Aug;95(8):1425-7
- [22] Ocular burns. Merle H, Gérard M, Schrage N. *J Fr Ophtalmol*. 2008 Sep;31(7):723-34. Review.
- [23] Early limbal autograft after alkali burn of the ocular surface. Gatinel D, Nghiem MH, Chaine G. *J Fr Ophtalmol*. 1999 Feb;22(1):76-8.
- [24] Functional bioengineered corneal epithelial sheet grafts from corneal stem cells expanded ex vivo on a temperature-responsive cell culture surface. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Maeda N, Watanabe H, Yamamoto K, Nagai S, Kikuchi A, Tano Y, Okano T. *Transplantation*. 2004 Feb 15;77(3):379-85.
- [25] Long-term restoration of damaged corneal surfaces with autologous cultivated corneal epithelium. Pellegrini G, Traverso CE, Franzi AT, Zingirian M, Cancedda R, De Luca M. *Lancet*. 1997 Apr 5;349(9057):990-3.
- [26] Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E, Nagai S, Kikuchi A, Maeda N, Watanabe H, Okano T, Tano Y. *N Engl J Med*. 2004 Sep 16;351(12):1187-96.
- [27] Culture and characterization of oral mucosal epithelial cells on human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. Madhira SL, Vemuganti G, Bhaduri A, Gaddipati S, Sangwan VS, Ghanekar Y. *Mol Vis*. 2008 Jan 30;14:189-96.
- [28] Nolan, K.; Millet, Y.; Ricordi, C.; Stabler, C. L. *Tissue Engineering and Biomaterials in Regenerative Medicine*. *Cell Transplant*. 17(3):241-243; 2008.
- [29] Braye, F.; Pascal, P.; Bertin-Maghit, M.; Colpart, J. J.; Tissot, E.; Damour, O. Advantages of using a bank of allogenic keratinocytes for the rapid coverage of extensive and deep second-degree burns. *Med Biol Eng Comput*. 38(2):248-252; 2000.
- [30]. Braye, F.; Dumortier, R.; Bertin-Maghit, M.; Girbon, J. P.; Tissot, E.; Damour, O. Cultured epidermis for the treatment of severe burns. A 2-year study (18 patients). *Ann Chir Plast Esthet*. 46(6):599-606; 2001.
- [31] Braye, F.; Oddou, L.; Bertin-Maghit, M.; Belgacem, S.; Damour, O.; Spitalier, P.; Guillot, M.; Bouchard, C.; Gueugniaud, P. Y.; Goudeau, M.; Petit, P.; Tissot, E. Widely meshed autograft associated with cultured autologous epithelium for the treatment of major burns in children: report of 12 cases. *Eur J Pediatr Surg*. 10(1):35-40; 2000.
- [32] Gallico, G. G. 3<sup>rd</sup>.; O'Connor, N. E.; Compton, C. C.; Kehinde, O.; Green, H. Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium. *N Engl J Med*. 311:448-451; 1984.
- [33] Nakamura, T.; Endo, K.; Cooper, L. J.; Fullwood, N. J.; Tanifuji, N.; Tsuzuki, M.; Koizumi, N.; Inatomi, T.; Sano, Y.; Kinoshita, S. The successful culture and autologous transplantation of rabbit oral mucosa epithelial cells on amniotic membrane, *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 44(1): 106-116; 2003.
- [34] Nishida, K.; Yamato, M.; Hayashida, Y.; Watanabe, K.; Yamamoto, K.; Adachi, E.; Nagai, S.; Kikuchi, A.; Maeda, N.; Watanabe, H.; Okano, T.; Tano, Y. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *N Engl J Med*. 351(12):1187-1196; 2004.



- [35] Rama, P.; Bonini, S.; Lambiase, A.; Golisano, O.; Paterna, P.; De Luca, M.; Pellegrini, G. Autologous fibrin-cultured limbal stem cells permanently restore the corneal surface of patients with total limbal stem cell deficiency. *Transplantation*. 15;72(9):1478-1485; 2001
- [36] Monography 2.6.27 and Monography 5.1.6.European Pharmacopeia.  
<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:102:0048:0058:fr:PDF>
- [37] Morel, P.; Deschaseaux, M.; Naegelen, C.; Bardiaux, L.; Leconte des Floris, M. F. Pouthier F. De la détection bactérienne à l'inactivation des pathogènes, *Transfus Clin Biol*. 12 :142–149; 2005.
- [38] Morel, P. Vers la détection des bactéries dans les PSL. *Transfusion Clinique et Biologique*. 12:215–220; 2005.
- [39] Morel, P.; Deschaseaux, M. ; Bertrand, X. ; Naegelen C. ; Talon, D. Transfusion et bactéries: risque résiduel et perspectives de prévention, *Transfus Clin Biol*.10:192–200 ; 2003.
- [40] Mastronardi, C.; Perkins, H.; Derksen, P.; Denadmirant, M.; Ramírez-Arcos, S. Evaluation of the BacT/ALERT((R)) 3D system for the implementation of in-house quality control sterility testing at Canadian Blood Services. *Clin Chem Lab Med*. 2010.
- [41] Defining the normal bacteria flora of oral cavity *Jorn A J of clinical microbiology* nov 2005 p 5721-5732
- [42] Dunne, M.; Case, L. K.; Isgriggs, L.; Lublin, D. M. In-house validation of the BACTEC 9240 blood culture system for detection of bacterial contamination in platelet concentrates, *Transfusion*. 45:1138-1142; 2005.
- [43] Kin, T.; Rosichuk, S.; Shapiro, A. M.; Lakey, J. R. Detection of microbial contamination during human islet isolation. *Cell Transplant*.16 (1):9-13; 2007.
- [44] Mastronardi, C.; Perkins, H.; Derksen, P.; Denadmirant, M.; Ramírez-Arcos, S. Evaluation of the BacT/ALERT((R)) 3D system for the implementation of in-house quality control sterility testing at Canadian Blood Services. *Clin Chem Lab Med*. 2010.
- [45] Dunne, M.; Case, L. K.; Isgriggs, L.; Lublin, D. M. In-house validation of the BACTEC 9240 blood culture system for detection of bacterial contamination in platelet concentrates, *Transfusion*. 45:1138-1142; 2005
- [46] Thépot, A.; Morel, A. P.; Justin, V.; Dessanlis, A.; Thivillier, L.; Hoffman, E.; Till, M.; Accardi, R.; Tommasino, M.; Breton, P.; Hainaut, P.; Damour, O. Evaluation of tumorigenic risk of Tissue-Engineered Oral mucosal epithelial cells by using combinational examinations. *Cell Transplant*. Epub.