

**ACADÉMIE D'ORLÉANS-TOURS**

**UNIVERSITÉ DE TOURS**

**FACULTE DE PHARMACIE « Philippe MAUPAS »**

Année 2020

N°46

**MÉMOIRE DE DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES**

**Spécialité Pharmacie Hospitalière**

**TENANT LIEU DE THÈSE D'EXERCICE**

**pour le**

**DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

Par

Alexia JOUVANCE-LE BAIL, née le 12/06/91 à Vannes (56)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE 02 OCTOBRE 2020

« Nouvelles thérapeutiques et médicaments de thérapie innovante :  
quelles organisations à mettre en place à la PUI du CHU de Rennes ? »

JURY

Président : Mme FOUCAULT-FRUCHARD Laura, Maître de Conférences, Faculté de pharmacie – TOURS

Membres : Mme LESTER Marie-Antoinette, Pharmacien, Praticien Hospitalier, CHU – RENNES

Mme POTIN Sophie, Maître de Conférences, Faculté de pharmacie – RENNES

Mme GOUGEON Anne, Professeur, Faculté de pharmacie – RENNES

**ANNEE : 2019 - 2020**

**Directrice : Pr Véronique MAUPOIL**

**Directeur Adjoint : M. Hervé MARCHAIS**

**Assesseurs : Pr Daniel ANTIER, M. Matthieu JUSTE, Pr Karine MAHEO, Mme Audrey OUDIN**

## **ENSEIGNANTS**

### **17 PROFESSEURS**

ALLOUCHI	Hassan	CHIMIE PHYSIQUE
ANTIER	Daniel	PHARMACIE CLINIQUE
BARIN	Francis	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAND	Denys	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
CHEVALIER	Stéphane	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
CHOURPA	Igor	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
CLASTRE	Marc	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DIMIER-POISSON	Isabelle	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
EMOND	Patrick	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ENGUEHARD-GUEIFFIER	Cécile	PHARMACOGNOSIE
GIRAUDEAU	Bruno	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
LANOTTE	Philippe	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
MAHEO	Karine	PHYSIOLOGIE
MAUPOIL-DAVID	Veronique	PHARMACOLOGIE
POUPLARD	Claire	HEMATOLOGIE
THIBAUT	Gilles	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
VIAUD-MASSUARD	Marie-Claude	CHIMIE ORGANIQUE

### **2 PROFESSEURS EMERITES**

AGAFONOV	Vlatcheslav	CHIMIE PHYSIQUE
GUILLOTEAU	Denis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES

### **38 MAITRES DE CONFERENCES**

ALLARD-VANNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
ARLICOT	Nicolas	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
AUBREY	Nicolas	BIOCHIMIE GENERALE & BIOTHERAPIE
BAKRI	Françoise	HYGIENE SANTE PUBLIQUE & TOXICOLOGIE
BESSON	Pierre	PHYSIOLOGIE
BONNIER	Franck	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
BOUDESOCQUE-DELAYE	Leslie	PHARMACOGNOSIE
BOUVIN-PLEY	Mélanie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BRAIBANT	Martine	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
BREDELOUX	Pierre	PHARMACOLOGIE
DAVID	Stéphanie	PHARMACIE GALENIQUE
DEBIERRE-GROCKIEGO	Françoise	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE

DELAYE	Pierre-Olivier	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DENEVAULT	Caroline	CHIMIE THERAPEUTIQUE
DOUZIECH-EYROLLES	Laurence	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
DUMAS	Jean-François	BIOCHIMIE GENERALE ET BIOTHERAPIE
GERMON	Stéphanie	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
GLEVAREC	Gaëlle	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
HERVE-AUBERT	Katel	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
JUSTE	Matthieu	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
LAJOIE	Laurie	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE
LANOUE	Arnaud	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
MARC	Jillian	BIOMOLECULES ET BIOTECHNOLOGIES VEGETALES
MARCHAIS	Hervé	PHARMACIE GALENIQUE
MAVEL	Sylvie	CHIMIE THERAPEUTIQUE
MUNNIER	Emilie	PHARMACIE GALENIQUE
OMBETTA-GOKA	Jean-Edouard	CHIMIE ORGANIQUE
UDIN	Audrey	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
PASQUALIN	Côme	PHARMACOLOGIE
PRIE	Gildas	CHIMIE ORGANIQUE
RESPAUD	Renaud	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
SOUCE	Martin	CHIMIE ANALYTIQUE & HYDROLOGIE
TAUBER	Clovis	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VELGE-ROUSSEL	Florence	IMMUNOLOGIE PARASITAIRE
VERCOUILLIE	Johnny	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
VERGOTE	Jackie	AFFAIRE REGLEMENTAIRE ET MANAGEMENT DE LA QUALITE
VIERRON	Emilie	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
ZHANG	Bei-Li	PHARMACOLOGIE

### 1 DIRECTEUR DE RECHERCHE

CHALON	Sylvie	INSERM
--------	--------	--------

### 2 CHARGES DE RECHERCHE

MEVELEC	Marie-Noëlle	INRA
MOIRE	Nathalie	INRA

### 1 PRAG

WALTERS-GALOPIN	Susan	ANGLAIS
-----------------	-------	---------

### 3 AHU

FOUCAULT	Amélie	HEMATOLOGIE
FOUCAULT-FRUCHARD	Laura	PHARMACIE CLINIQUE
MARLET	Julien	MICROBIOLOGIE-IMMUNOLOGIE-BIOEPIDEMIOLOGIE

### 4 ATER

BILLET	Kevin	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE
DRIOUCH	Abderrazzak	BIOPHYSIQUE & MATHEMATIQUES
LAKHRIF	Zineb	FORMATIONS BIO3 INSTITUTE
VERGES	Valentin	BIOLOGIE CELLULAIRE & BIOCHIMIE VEGETALE



## SERMENT DE GALIEN

*En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :*

*D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances ;*

*D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;*

*De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité ;*

*En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels ;*

*De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession ;*

*De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens ;*

*De coopérer avec les autres professionnels de santé ;*

*Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.*

*Date : 02/10/2020*

*L'étudiant*

*Mme Jouvance-Le Bail*

*Le Doyen de la Faculté*

*Mme Véronique Maupoil*



## REMERCIEMENTS

A ma directrice de thèse,

Madame Marie-Antoinette Lester,

Pour m'avoir confié ce sujet passionnant, pour la confiance que tu m'as accordée, pour le temps que tu m'as dédié et pour m'avoir soutenue toutes ces années.

Merci, du fond du cœur.

A ma présidente de jury de thèse,

Madame Laura Foucault-Fruchard,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider le jury de cette thèse et de juger mon travail. Veuillez recevoir l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

A mes juges,

Madame Anne Gougeon

Pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse et pour votre implication dans la mise en place de la phagothérapie au CHU de Rennes. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Madame Sophie Potin

Pour avoir également aimablement accepté de faire partie de mon jury de thèse, et pour avoir permis la préparation des premiers MTI sous AMM du CHU de Rennes. Soit assurée de ma considération et de ma gratitude.

A toutes les équipes avec qui j'ai eu le plaisir et le privilège de travailler au cours de mon internat, et qui m'ont toutes tant appris.

Remerciements personnels,

A mon Chéri, pour commencer,

Merci infiniment pour ton soutien et ta patience depuis le tout début et jusqu'à ces dernières semaines, je te promets que nos vacances ne serviront plus à apprendre des cours ou à rédiger des mémoires. Ce chapitre se termine enfin et il me tarde de découvrir le prochain à tes côtés !

A mes parents, ensuite,

Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir soutenue, même quand je ne savais plus ce que je voulais faire. Merci d'avoir cru en moi et de m'avoir appris à ne rien lâcher, même quand je ne pensais pas être à la hauteur. Merci pour les valeurs que vous m'avez inculquées, j'y resterai fidèle dans tous les aspects de ma vie.

A mes amis, également,

Merci d'avoir été là pour entendre le récit de mes aventures et mésaventures tout au long de mes études et de mon internat. Merci pour tous les supers moments passés avec vous et désolée pour tous ceux que j'ai raté, faute à la distance, aux gardes, aux cours ou aux mémoires... On va vite rattraper ça !

A mes co-internes, pareillement,

Julia, Stefan, Jihad, Lucie, Pauline et tous les internes que j'ai rencontré au CHRU de Brest et au CHU de Rennes. Merci pour les équipes que nous avons formées, qui ont finalement contribué à faire passer ces 4 années extrêmement vite. J'espère sincèrement que nos chemins se recroiseront. Dans tous les cas, je n'ai jamais accordé de crédit à l'expression « loin des yeux, loin du cœur ».

Et enfin...

A ma béquille, évidemment,

Merci de m'avoir permis de faire équipe avec toi pour surmonter toutes ces années de cours et de concours. Je te revois partant de chez moi à 3h00 du matin, et moi sonnante à 5h00 chez toi. Je nous revois aussi faire les ouvertures ET fermetures de la BU, avant de rentrer travailler chez nous pour l'avoir, ce satané concours. On était dingues, mais on était deux. Avec la fin de mon internat, mes études s'achèvent et nous ne sommes plus binômes. Mais qui sait, peut-être réussiras-tu à m'embarquer dans un autre improbable projet ? Dans tous les cas il restera toujours le principal, l'amitié que je te porte. Merci, Claude.

## **TABLE DES MATIERES**

<b>TABLE DES FIGURES.....</b>	<b>10</b>
<b>TABLE DES TABLEAUX.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTE DES ABREVIATIONS.....</b>	<b>12</b>
<b>INTRODUCTION.....</b>	<b>14</b>
<b>PARTIE 1 - LES MEDICAMENTS DE THERAPIE INNOVANTE.....</b>	<b>16</b>
<b>I. Classification .....</b>	<b>17</b>
A. Les Médicaments de Thérapie Génique .....	17
1. Les deux voies de la thérapie génique .....	18
2. Les techniques de transfection .....	19
3. Vers une correction génétique in situ ? .....	22
4. Conséquences liées à la classification OGM .....	23
B. Les Médicaments de Thérapie Cellulaire Somatique.....	25
C. Les Produits Issus de l'Ingénierie Cellulaire ou Tissulaire .....	26
D. Les Médicaments Combinés de Thérapie Innovante.....	26
<b>II. Cadre réglementaire .....</b>	<b>27</b>
A. Définitions et statuts .....	27
B. Essais cliniques.....	29
C. Autorisation de mise sur le marché .....	30
D. Fabrication et préparation .....	31
E. Décret PUI relatif aux MTI.....	32
<b>III. Essais cliniques et mises sur le marché.....</b>	<b>32</b>
A. Suppléer un gène défectueux .....	32
B. Conférer de nouvelles propriétés aux cellules.....	35
1. Oncologie .....	35
2. Hors oncologie .....	39
<b>IV. Place de la pharmacie hospitalière française.....</b>	<b>40</b>

<b>PARTIE 2 - LES BACTERIOPHAGES.....</b>	<b>43</b>
<b>I. Biologie des bactériophages.....</b>	<b>44</b>
A. Structure .....	44
B. Cycle infectieux.....	44
1. Cycle lytique.....	45
2. Cycle lysogénique.....	46
3. Cycles chroniques et pseudolysogéniques.....	48
C. Rôle et place des phages dans la nature.....	49
<b>II. Découverte et redécouverte .....</b>	<b>50</b>
<b>III. Cadre réglementaire .....</b>	<b>52</b>
A. Règlementation française et européenne .....	52
B. Règlementation nationale belge.....	55
<b>IV. Obtention de bactériophages à usage thérapeutique .....</b>	<b>56</b>
A. Production de solution de bactériophages.....	56
B. Approvisionnement .....	58
C. Qualification.....	59
<b>V. Pharmacologie .....</b>	<b>60</b>
A. Pharmacocinétique .....	60
B. Pharmacodynamie .....	61
1. Action sur la charge bactérienne .....	61
a. Seuil de répllication .....	61
b. Effets sur le biofilm.....	61
2. Interaction avec le système immunitaire.....	63
C. Résistances bactériennes.....	64
1. Résistance aux phages .....	64
2. Impact de la phagothérapie sur l'antibiorésistance.....	65
D. Posologie.....	65
E. Composition : sur-mesure ou prêt-à-porter ? .....	66
F. Voies d'administration.....	67
<b>VI. Utilisations et études de la phagothérapie.....</b>	<b>68</b>
A. Etudes <i>in vivo</i> chez l'animal .....	68
B. Utilisation à des fins thérapeutiques.....	69
1. Usages compassionnels .....	69
2. Essais cliniques.....	71
a. Essais terminés.....	72
b. Essais arrêtés.....	73
c. Essais en cours ou en projet.....	74
3. Autres perspectives de recherche biomédicale .....	75
4. Tolérance .....	76
C. Utilisation à des fins non thérapeutiques chez l'Homme .....	77

<b>PARTIE 3 - LA PHARMACOTECHNIE DU CHU DE RENNES FACE A CES NOUVELLES THERAPIES.....</b>	<b>78</b>
<b>I. Les MTI et les phages vis-a-vis du circuit en PUI .....</b>	<b>79</b>
A. Réception .....	80
B. Stockage.....	82
C. Transport vers la zone de préparation.....	84
D. Préparation .....	85
1. Manipulation.....	85
2. Environnement et équipements .....	86
E. Décontamination .....	90
F. Transport vers le service de soin .....	91
G. Déchets .....	92
1. Inactivation .....	92
2. Elimination .....	93
<b>II. Equipements disponibles et évolutions à mettre en place .....</b>	<b>94</b>
A. Stockage.....	94
1. Température positive.....	94
2. Température négative .....	94
a. Congélateur .....	94
b. Cuve cryoconservation sèche .....	94
B. Transport .....	95
1. Température positive.....	95
2. Température négative .....	96
C. Préparation .....	96
D. Déchets .....	100
<b>III. La phagothérapie compassionnelle au CHU de Rennes .....</b>	<b>101</b>
A. Patient éligible à la phagothérapie .....	101
B. Bactériophages à usage compassionnel .....	103
C. Gestion des risques en pharmacotechnie.....	104
1. Risques pour le patient .....	105
a. Risques liés à la matière première .....	107
i. Risque d'inefficacité .....	107
ii. Risque infectieux .....	107
iii. Risque d'intolérance locale ou systémique .....	111
b. Risques liés au circuit du médicament .....	112
i. Réception et stockage .....	112
ii. Préparation.....	113
iii. Transport .....	114
2. Risques pour le manipulateur .....	114
3. Risques pour l'environnement.....	115
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>116</b>
<b>CONCLUSION.....</b>	<b>118</b>
<b>ANNEXES.....</b>	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>147</b>



## **TABLE DES FIGURES**

Figure 1 : Principe de la thérapie génique.....	18
Figure 2 : Les deux voies de la thérapie génique .....	18
Figure 3 : Caractéristiques des vecteurs viraux utilisés en thérapie génique .....	21
Figure 4 : L'édition génomique à l'aide du complexe CRISPR-Cas9 .....	22
Figure 5 : Cadre réglementaire pour les produits thérapeutiques constitués de cellules viables .....	28
Figure 6 : Indications visées par les essais cliniques de thérapie génique entre 1989 et 2017 .....	35
Figure 7 : Les étapes de la production de CAR-T cells.....	37
Figure 8 : Nombre d'essais cliniques dans le monde concernant les CAR-T cells .....	37
Figure 9 : Autorisations de mise sur le marché des CAR-T cells en Europe et aux Etats-Unis .....	38
Figure 10 : Caractéristiques des MTI-PP et expérimentaux fabriqués en France par des établissements publics).....	40
Figure 11 : Centres hospitaliers qualifiés pour les différents traitements par CAR-T cells en 2019.....	41
Figure 12 : Etapes de la prise en charge hospitalière d'un traitement par CAR-T cells .....	41
Figure 13 : Morphologie des principaux bactériophages.....	44
Figure 14 : Liaison et infection de la bactérie par un bactériophage.....	44
Figure 15 : Cycle lytique .....	45
Figure 16 : Cycle lysogénique .....	46
Figure 17 : Cycles chronique et pseudolysogénique .....	48
Figure 18 : Nombre de publications internationales concernant les bactériophages et la phagothérapie entre 1967 et 2011 .....	51
Figure 19 : Dégradation du biofilm bactérien .....	62
Figure 20 : Présentation de différentes préparations dénommées « Pyophage » .....	66
Figure 21 : Système à triple emballage pour le transport des médicaments OGM.....	80
Figure 22 : Dry Shipper et son conteneur de transport .....	81
Figure 23 : Signalétique « risque biologique » .....	82
Figure 24 : Dispositif de décongélation à sec Plasmatherm® .....	88
Figure 25 : Schéma des futures unités de pharmacotechniques .....	89
Figure 26 : Cuves azotes disponibles pour les MTI.....	95
Figure 27 : Biotainer® .....	95
Figure 28 : Cryopod™ Carrier et sa station de remplissage .....	96
Figure 29 : Plan ZPI Pontchaillou .....	97
Figure 30 : Possibilités de chargement dans l'isolateur Qube® .....	98
Figure 31 : Etapes de la prise en charge compassionnelle d'un patient par phagothérapie .....	102
Figure 32 : Contrôles d'une préparation de bactériophages issus d'une matière première non pharmaceutique au CHU de Rennes.....	106
Figure 33 : Montage du test du point de bulle.....	109
Figure 34 : Principe de la méthode du point de bulle .....	109
Figure 35 : Etiquette emplacement de stockage.....	112
Figure 36 : Etiquette d'une préparation magistrale de bactériophages à usage compassionnel.....	113

## TABLE DES TABLEAUX

Tableau I : Statuts applicables aux produits issus de tissus et cellules .....	28
Tableau II : Cadres réglementaires applicables aux essais cliniques de produits issus de tissus ou cellules .....	29
Tableau III : Cadres réglementaires applicables à la mise sur le marché de produits issus de tissus ou cellules .....	30
Tableau IV : Essais cliniques multicentriques publiés avec cellules CAR-T pour les LNH-B chez l'adulte .....	38
Tableau V : Méthodes de détection des bactériophages.....	57
Tableau VI : Traitement des infections orthopédiques chez l'animal.....	69
Tableau VII : Etudes cliniques interventionnelles concernant la phagothérapie déclarées sur ClinicalTrial.gov en juillet 2020 .....	71
Tableau VIII : Différentes modalités de conservation et de préparation des MTI .....	79
Tableau IX : Caractéristiques du système d'emballage des matières infectieuses .....	80
Tableau X : Groupes de risques des agents biologiques naturels .....	81
Tableau XI : Outils de sécurité pour le personnel et le produit cryoconservé .....	83
Tableau XII : Dommages potentiels lié à la cryoconservation des cellules .....	84
Tableau XIII : Mesures de confinement et de protection en laboratoire .....	87
Tableau XIV : EPI préconisés selon la classification des agents biologiques manipulés .....	90
Tableau XV : Locaux et équipements de préparation de médicaments stériles du CHU de Rennes ....	96
Tableau XVI : Différences entre les PSM de classe I, II et III .....	97
Tableau XVII : Spécifications du DPBS sans calcium ni magnésium .....	104
Tableau XVIII : Configuration du circuit analysé.....	104
Tableau XIX : Documentation qualité relative à la préparation de bactériophages à usage compassionnel au CHU de Rennes .....	105
Tableau XX : Quantités minimales de préparation à utiliser pour réaliser un essai de stérilité .....	108
Tableau XXI : Tension de surface d'une solution aqueuse de chlorure de sodium en fonction de sa concentration et de la température .....	110

## LISTE DES ABREVIATIONS

AAV : Adeno-Associated Virus  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
AFMPS : Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé  
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché  
ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament  
ARN : Acide RiboNucléique  
ARS : Agence Régionale de Santé  
ASMR : Amélioration du Service Médical Rendu  
ATMP : Advanced Therapy Medicinal Product  
ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation  
BMR : Bactérie Multi-Résistante  
BPC : Bonnes Pratiques Cliniques  
BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication  
BPL : Bonnes Pratiques de Laboratoire  
BPP : Bonnes Pratiques de Préparation  
BPPH : Bonnes Pratiques de Pharmacie Hospitalière  
BSDAS : Bordereau de Suivi des Déchets d'Activité de Soins  
CAR-T cells : Chimeric Antigen Receptor T cells  
CAT : Committee for Advanced Therapies  
CRB : Centre de Ressources Biologiques  
CE : Commission Européenne  
CHMP : Committee for Medicinal Products for Human Use  
CHU : Centre Hospitalier Universitaire  
CHRU : Centre Hospitalier Régional Universitaire  
CML : Concentration Minimale de Lyse  
CNHIM : Centre National Hospitalier d'Information sur le Médicament  
CNRS : Centre National de la Recherche Scientifique  
CRIOGO : Centre de Référence des Infections Ostéoarticulaires du Grand Ouest  
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats  
CSP : Code de la Santé Publique  
CSST : Comité Scientifique Spécialisé Temporaire  
DASRI : Déchets d'Activités de Soins à Risques Infectieux

DMSO : Diméthylsulfoxyde  
DOC : Désoxycholate de sodium  
DPBS : Dulbecco's Phosphate Buffer Saline  
EMA : European Medicine Agency  
EFS : Etablissement Français du Sang  
FDA : Food and Drug Administration  
GERPAC : Groupe d'Évaluation et de Recherche sur la Protection en Atmosphère Contrôlée  
HAS : Haute Autorité de Santé  
HCB : Haut Conseil des Biotechnologies  
INRS : Institut National de Recherche et de Sécurité  
LPS : Lipopolysaccharide  
MCTI : Médicament Combiné de Thérapie Innovante  
MESR : Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche  
MTCS : Médicament de Thérapie Cellulaire Somatique  
MTG : Médicament de Thérapie Génique  
MTI : Médicament de Thérapie Innovante  
MTI-PP : Médicament de Thérapie Innovante Préparés Ponctuellement  
OGM : Organisme Génétiquement Modifié  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PES : Polyéthersulfone  
PFU : Plaque-Forming Unit  
PIIC/PIIT : Produit Issu de l'Ingénierie Cellulaire / Produit Issu de l'Ingénierie Tissulaire  
PTC : Préparation de Thérapie Cellulaire  
PSM : Poste de Sécurité Microbiologique  
PUI : Pharmacie à Usage Intérieur  
SAMS : *Staphylococcus aureus* méticilline sensible  
SFPO : Société Française de Pharmacie Oncologique  
SMR : Service Médical Rendu  
URCC : Unité de Reconstitution Centralisée des Cystostatiques  
UTC : Unité de Thérapie Cellulaire  
VIH : Virus d'Immunodéficience Humaine  
ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée  
ZPI : Zone de Préparations Injectables

## INTRODUCTION

Avec l'avancée de la recherche, l'arsenal thérapeutique à disposition des patients ne cesse de s'élargir. Parmi les nouvelles thérapies disponibles, une nouvelle classe a récemment émergée : les médicaments de thérapie innovante (MTI). Ces médicaments - constitués de matériel génétiquement modifié, de cellules ou de tissus - imposent toutefois un certain nombre de contraintes, en particulier pour les unités de pharmacotechnie amenées à les préparer. Bénéficiant désormais d'un cadre légal adapté, il est désormais nécessaire pour les pharmacies hospitalières d'obtenir une autorisation expresse concernant cette activité, comme spécifié par le décret du 21 mai 2019 relatif aux pharmacies à usage intérieur.

Si la pharmacie du CHU de Rennes est déjà engagée dans l'activité des Car-T cells, il lui est dorénavant nécessaire d'obtenir l'autorisation à la préparation de MTI. En plus de permettre de pérenniser l'activité déjà développée, cela lui permettra de pouvoir préparer d'autres types de MTI, comme les vecteurs viraux de thérapie génique. Cette mise en conformité devra intégrer le projet immobilier du futur CHU qui donnera lieu à la création d'un plateau de pharmacotechnie au sein de l'Institut Régional de Cancérologie (IRC).

A l'inverse, la phagothérapie est une ancienne approche de la thérapie antibactérienne, antérieure même aux antibiotiques. Après avoir été oubliée en Occident, un retour sur le devant de la scène anti-infectieuse semble s'amorcer pour cette thérapie. Si les bactériophages utilisés à visée thérapeutique répondent à la définition de médicament, ils ne bénéficient toutefois pas d'une réglementation adaptée au niveau français ou européen, bloquant leur développement pharmaceutique. La phagothérapie peut donc actuellement être utilisée uniquement dans le cadre d'un usage compassionnel, à partir d'une matière première non pharmaceutique. Au vu de leur intérêt potentiel dans le traitement des infections par bactéries multi-résistantes, et du nombre croissant de patients en situation d'impasse thérapeutique, la pharmacie hospitalière se retrouve aujourd'hui confrontée à un dilemme : faut-il attendre une évolution de la réglementation pour pouvoir utiliser des spécialités pharmaceutiques de bactériophages ou est-il possible de proposer à nos patients une préparation magistrale, en ultime recours ?



Au CHU de Rennes, le Centre de Référence des Infections Ostéoarticulaires du Grand Ouest (CRIOGO) a sollicité la pharmacie afin de pouvoir traiter un patient par bactériophages.

Les MTI et les bactériophages ont donc des statuts et des indications différents, mais il s'agit toutefois bien de médicaments issus du vivant, dont la nature ou l'origine potentiellement virale implique des contraintes potentiellement similaires en pharmacotechnie.

L'objectif de ce travail est donc d'abord de définir la nature des produits, ainsi que les contraintes techniques et réglementaires qui s'appliquent aux MTI et aux bactériophages. Puis, une solution permettant leur prise en charge par la pharmacotechnie du CHU de Rennes sera exposée.

## **PARTIE 1**

-

### **LES MEDICAMENTS DE THERAPIE INNOVANTE**

## **I. CLASSIFICATION**

La réglementation européenne a défini les médicaments de thérapie innovante (MTI) comme étant des médicaments biologiques (1) répondant à la définition de « médicament de thérapie génique » (MTG), « médicament de thérapie cellulaire somatique » (MTCS) ou de « produit issu de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire » (PIIC/PIIT). Dans le cas où le MTI incorpore un dispositif médical, il est alors appelé « médicament combiné de thérapie innovante » (MCTI). (2)

### **A. LES MEDICAMENTS DE THERAPIE GENIQUE**

Les médicaments de thérapie génique ont été définis par la directive européenne 2001/83/CE comme des médicaments biologiques dont la substance active « contient ou constitue un acide nucléique recombinant administré à des personnes en vue de réguler, de réparer, de remplacer, d'ajouter ou de supprimer une séquence génétique ». Leur effet « thérapeutique, prophylactique ou diagnostique dépend directement de la séquence d'acide nucléique recombinant qu'il contient ou du produit de l'expression génétique de cette séquence ». (1)

Le principe de la thérapie génique repose sur l'insertion d'un gène d'intérêt directement au sein des cellules à traiter. La figure 1 ci-après illustre l'introduction d'ADN au sein du noyau à l'aide d'un vecteur viral de type adénovirus.

Un produit répondant à la définition de médicament de thérapie génique doit être considéré comme tel, même s'il répond également à la définition de médicament de thérapie cellulaire somatique ou de produit issu de l'ingénierie tissulaire. (2) Les exigences relatives à la qualité des médicaments de thérapie cellulaire somatique et des produits issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire doivent toutefois également lui être appliquées. (1)

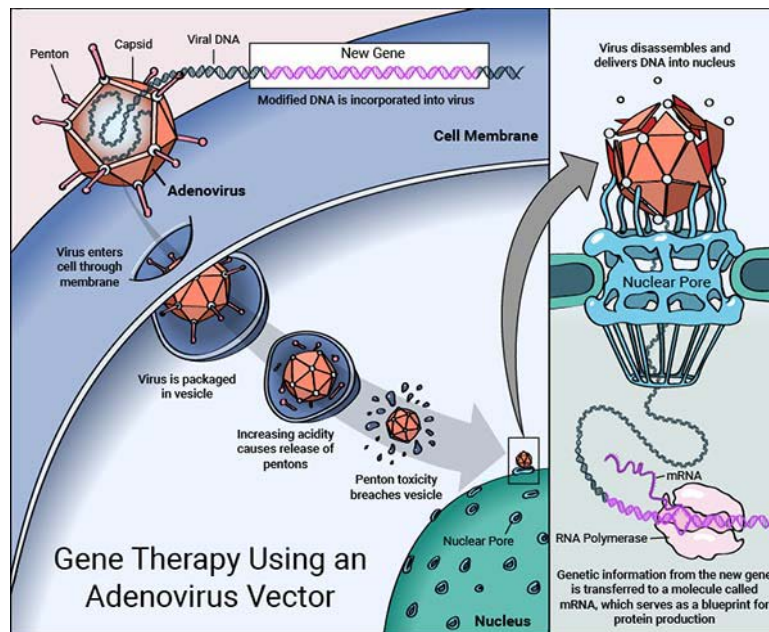


Figure 1 : Principe de la thérapie génique (U.S. National Library of Medicine)

## 1. LES DEUX VOIES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE

La thérapie génique regroupe plusieurs approches de mise en œuvre, lesquelles peuvent être classées selon qu'elles utilisent la voie « *in vivo* » ou la voie « *ex vivo* », comme le montre la figure 2.

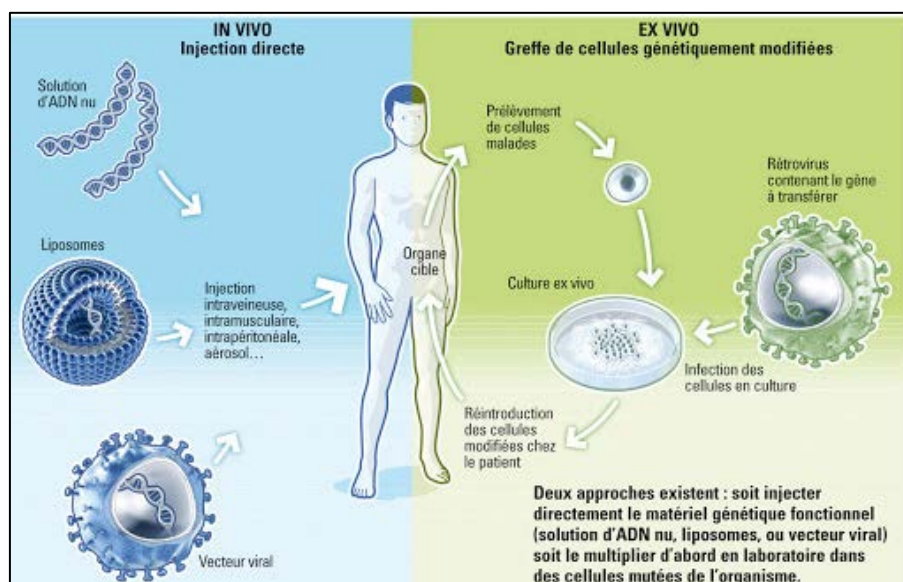


Figure 2 : Les deux voies de la thérapie génique  
(A. Dagan pour le Journal du CNRS, d'après Catherine Caillaud)

### **Médicament de thérapie génique *in-vivo***

Lorsque le prélèvement et la ré-administration des cellules n'est pas possible, par exemple dans le cas de cellules cardiaques ou des neurones, le gène d'intérêt peut être administré directement au patient, via différentes voies et vecteurs. Cette méthode peut être utilisée pour traiter de nombreuses affections, dont la mucoviscidose ou l'hémophilie. (3)

### **Médicament de thérapie génique *ex-vivo***

Dans les techniques *ex vivo*, les cellules du patient sont prélevées puis mises en culture avec un vecteur contenant le gène d'intérêt. Les cellules exprimant le gène thérapeutique sont ensuite administrées au patient. Cette approche permet de cibler spécifiquement une population de cellules à traiter par le vecteur, généralement viral. Cette technique est particulièrement bien adaptée au traitement des pathologies hématologiques, pour lesquelles il est relativement facile de prélever les cellules d'intérêt. (3) C'est pourquoi nous assistons à l'essor des traitements par CAR-T cells, où les lymphocytes T du patient sont prélevés puis manipulés génétiquement afin d'exprimer des récepteurs antigéniques chimériques (CAR) spécifiques aux cellules tumorales.

## **2. LES TECHNIQUES DE TRANSFECTION**

Les premiers essais de thérapie génique ont rapidement montré les risques de cancer et de décès, lors de l'insertion du gène thérapeutique dans les séquences dites « pro-oncogènes » de l'ADN du patient ou dans des organes non-cibles. De nombreuses recherches ont donc été menées afin d'améliorer la sécurité et l'efficacité des vecteurs utilisés en diminuant le risque d'insertion aléatoire dans le génome de l'hôte. (3)

### **Les vecteurs viraux**

Du fait de leur capacité à pénétrer les cellules, les virus ont rapidement été utilisés dans le domaine de la thérapie génique. Plusieurs types de virus ont ainsi été étudiés.



- **Les vecteurs viraux intégratifs**

En intégrant le gène thérapeutique dans la cellule cible, celui-ci se retrouve transmis aux cellules filles lors de la division cellulaire, sans dilution de l'information génétique. Cette approche est donc idéale dans le cas où l'effet recherché doit être permanent. Ces virus ne peuvent toutefois pas transporter de séquences génétiques de plus de 8 kb. On retrouve deux types de vecteurs viraux intégratifs : le type *Rétrovirus* et le type *Lentivirus*.

Les vecteurs de type *Rétrovirus* sont dérivés du virus de la leucémie murine, et permettent l'insertion de matériel génétique uniquement dans les cellules en division. Ils semblent donc idéaux pour la modification de cellules souches. Ils sont toutefois de moins en moins utilisés suite aux leucémies qu'ils ont provoquées dans les années 2000.

Les vecteurs de type *Lentivirus*, dérivés du virus du VIH, semblent être préférables car ils présenteraient un profil d'intégration génomique plus sûr. En étant capables de pénétrer et de modifier des cellules qui ne se divisent pas, ils élargissent également le champ d'application de la thérapie génique.

- **Les adénovirus**

Ces virus à ADN double brin peuvent transporter de grandes séquences d'ADN (30 kb). Ils pénètrent bien les cellules qui ne sont pas en division (foie, muscles, neurones) mais ils ne sont pas intégrés dans l'ADN de la cellule hôte, ce qui rend leur expression transitoire. Selon la pathologie traitée, cela implique de devoir répéter régulièrement leur administration. Or l'organisme du patient peut développer une réaction immunitaire contre le vecteur, compromettant l'efficacité de ses administrations ultérieures.

- **Les virus adéno-associés (AAV)**

Ces virus à ADN simple brin, appartenant à la famille des *Parvovirus*, sont très répandus chez l'Homme. Peu inflammatoires, non pathogènes, ils sont capables d'infecter des cellules en dehors de leur division cellulaire. Selon le sérotype viral, la capside peut présenter différents tropismes (AAV8 présente par exemple un tropisme fort pour les tissus hépatiques). Il est ainsi possible de cibler spécifiquement certains tissus. Ils ne permettent toutefois que le transfert de séquences génétiques inférieures à 4,8 kb. On retrouve également dans la population générale de nombreux anticorps contre ces vecteurs (10 à 20% dans le cas du vecteur AAV5).

- **Les autres vecteurs viraux**

Afin de repousser les limites imposées par les vecteurs viraux précédemment décrit, et d'améliorer la sécurité de leur utilisation, d'autres vecteurs font l'objet d'études. On retrouve parmi eux le virus de l'herpès simplex, les poxvirus, les virus animaux apparentés au VIH ou encore le virus de la grippe.

La figure 3 ci-dessous résume les informations relatives à chaque vecteur viral.

Désignation	Rétrovirus	Adénovirus	AAV	Herpes	Lentivirus
Taille maximale du transgène	8 kb	35 kb	4,8 kb	30 kb	10 kb
Cellules cibles	Division active	Division active et quiescentes	Division active (± quiescentes)	Division active et quiescentes	Division active et quiescentes
Mode d'administration	<i>Ex vivo</i> <i>In situ</i>	<i>Ex vivo</i> <i>In situ</i>	<i>Ex vivo</i>	<i>Ex vivo</i> <i>In situ</i>	<i>Ex vivo</i> <i>In situ</i>
Expression du transgène	Stable	Transitoire	(± stable)	Transitoire	Stable
Taux d'expression	Modéré	Elevé	Modéré	Modéré	Modéré
Risques	Intégration mutagène	Inflammation Immunogénicité	Intégration mutagène	Neurotoxique Intégration mutagène	Intégration mutagène Recombinaison VIH sauvage
Immunité préexistante	Non	Oui	Oui	Oui	Non

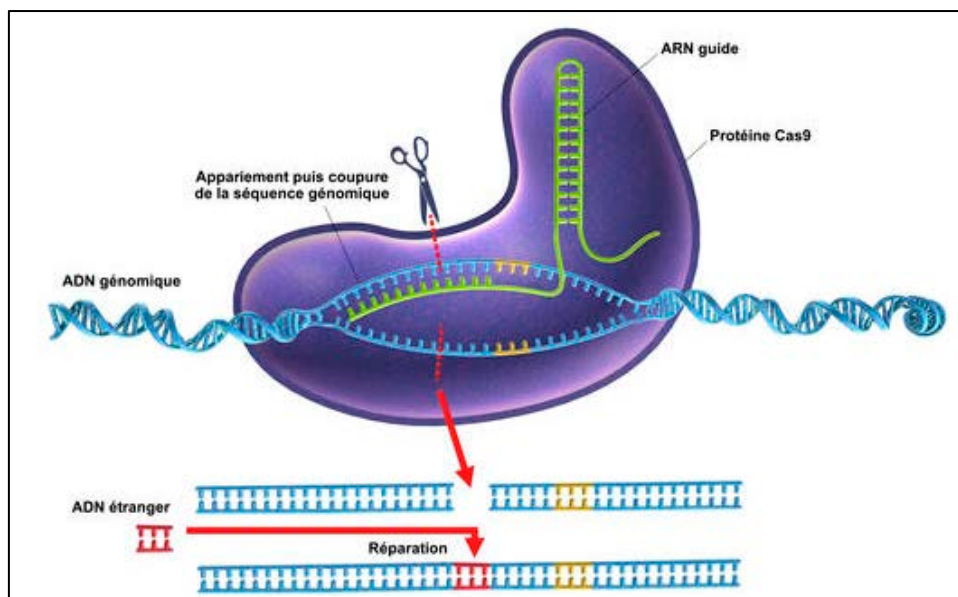
*Figure 3 : Caractéristiques des vecteurs viraux utilisés en thérapie génique (Cordelier et Buscail, 2005)*

**Les vecteurs non viraux**

L'autre solution pour éviter les limites et dangers imposés par les virus est de développer des vecteurs non viraux. Il est alors possible d'utiliser directement des molécules d'ADN ou d'ARN, que ce soit sous forme « nue » ou intégrée dans un plasmide. On les retrouve alors principalement sous forme de liposomes, et constituent des vecteurs non virulents plus faciles à produire, manipuler et stocker que les vecteurs viraux. Bien qu'ils puissent empaqueter des milliers de paires de bases, ils restent très inefficaces au transfert d'information et peuvent potentiellement être à risque de toxicité. Après leur injection intraveineuse ils s'agrègent rapidement en particules de grandes tailles. Il faut ainsi plus de 100 000 molécules d'ADN pour pénétrer le noyau d'une seule cellule cible.

### 3. VERS UNE CORRECTION GENETIQUE IN SITU ?

Si les techniques de thérapie génique utilisées aujourd'hui visent à introduire un gène thérapeutique au sein des cellules du patient, il sera peut-être bientôt possible de modifier directement les gènes défectueux au sein du génome des cellules malades. Le système CRISPR/Cas est en effet un outil permettant aux bactéries de lutter contre les infections à bactériophages en excisant et remplaçant une zone spécifique de l'ADN, grâce à un ADN guide, comme montré dans la figure 4 ci-dessous. En synthétisant une section d'ARN correspondant au brin d'ADN à retirer (un « CRISPR » : Clustered Regularly Interspaced Palindromic Repeats), il est possible d'indiquer à l'endonuclease Cas9 où couper l'ADN, qui pourra ensuite être remplacé par un brin d'ADN non défectueux. Cette méthode a déjà révolutionné le domaine de la biologie moléculaire et il est probable que son utilisation dans divers domaines thérapeutiques fasse rapidement l'objet d'études. L'administration des CRISPR pourrait se faire avec les mêmes vecteurs que la thérapie génique classique. (3,4)



*Figure 4 : L'édition génomique à l'aide du complexe CRISPR-Cas9  
(Gunilla Elam / Science Photo Library / Cosmos)*

#### **4. CONSEQUENCES LIEES A LA CLASSIFICATION OGM**

Du fait de l'utilisation de techniques de recombinaison de l'acide nucléique, les produits de thérapie génique sont tous des organismes génétiquement modifiés (OGM). Ils doivent alors répondre aux exigences de ceux-ci, notamment en termes de confinement. Le Haut Conseil aux Biotechnologies (HCB) doit donc être sollicité par le promoteur du médicament OGM pour obtenir le classement du produit via le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (MESR), puis par l'Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de santé (ANSM) lors de l'évaluation du dossier d'essai clinique.

L'utilisation d'un médicament OGM dans le cadre de la recherche ou du développement nécessite une demande d'agrément d'utilisation confinée d'OGM au MESR. Le dossier doit être rempli conjointement par l'industriel, le pharmacien et l'investigateur principal. Dans le cas d'un médicament de confinement C1, une déclaration d'utilisation suffit. Le MESR transmet ensuite le dossier au HCB pour information dans le cas d'une déclaration d'utilisation ou pour avis dans le cas d'une demande d'agrément. L'agrément ou la déclaration d'utilisation est valable pour une durée maximale de 5 ans, uniquement pour l'utilisation agréée. (5)

#### **Classification**

L'annexe II.1 du manuel du HCB de 2019 reprend les critères de classement des micro-organismes établis par l'European Federation of Biotechnologies. Selon leur pathogénicité pour l'Homme, ils sont répartis entre quatre classes, pour lesquelles les exigences de confinement vont croissantes :

- La première classe (C1) contient « les micro-organismes qui n'ont jamais été décrits comme agents causaux de maladies chez l'Homme et qui ne constituent pas une menace pour l'environnement ».
- La deuxième classe (C2) contient ceux « qui peuvent provoquer des maladies chez l'Homme, et qui peuvent donc constituer un danger pour le personnel de laboratoire ». La dissémination dans l'environnement est toutefois peu probable et il existe des moyens prophylactiques et/ou des traitements efficaces.

Il n'est *a priori* pas envisageable de faire appel à des stratégies thérapeutiques nécessitant un confinement de type C3 ou C4.

Dans le cas de la thérapie génique, le classement est effectué « au cas par cas en fonction du vecteur, du matériel génétique transporté, de la voie et de la technique d'administration ». Ainsi, un produit issu d'une manipulation de thérapie génique *ex vivo* présentera moins de risque de dissémination qu'un vecteur viral destiné à une utilisation *in vivo*. (6)

### **Préparation**

En attendant de possibles recommandations propres aux pharmacies hospitalières, il est possible de s'appuyer sur l'annexe III.1 du manuel du HCB qui décrit les recommandations relatives aux différents niveaux de confinement pour l'utilisation d'OGM en laboratoire de recherche. Les principales contraintes applicables à la production de MTI-OGM sont reprises dans l'Annexe 1.

### **Confinement du patient**

Selon le classement des produits utilisés, des recommandations de confinement s'appliquent au produit mais aussi au patient. L'annexe IV.1 du manuel du HCB décrit en effet les mesures de confinement à appliquer dans le cas d'administration d'un produit de thérapie génique.

### **Inactivation des déchets**

L'annexe V.1 du manuel du HCB précise les conditions relatives au traitement des déchets, selon le classement des produits, comme indiqué dans l'Annexe 2. Ainsi la décontamination des déchets se fait, selon les cas, par un traitement chimique ou par un traitement thermique. (6)



## **B. LES MEDICAMENTS DE THERAPIE CELLULAIRE SOMATIQUE**

Un médicament de thérapie cellulaire somatique est un médicament biologique qui contient, ou consiste en, des cellules ou des tissus. D'après la réglementation européenne, ceux-ci doivent soit avoir subi une « manipulation substantielle modifiant leurs caractéristiques biologiques, leurs fonctions physiologiques ou leur propriétés structurelles », soit « ne pas être destinés à être utilisés pour les mêmes fonctions essentielles chez le receveur et le donneur ». Il doit en outre être « présenté comme possédant des propriétés permettant de traiter, de prévenir ou de diagnostiquer une maladie à travers l'action métabolique, immunologique ou pharmacologique de ses cellules ou tissus, ou est utilisé chez une personne ou administré à une personne dans une telle perspective. » Les préparations de thérapie cellulaire pour lesquelles aucune manipulation substantielle n'est réalisée et qui ont la même fonction chez le donneur et chez le receveur ne sont donc pas des médicaments de thérapie innovante. (2)

L'annexe I du règlement européen CE 1394/2007 liste les manipulations qui ne sont pas considérées substantielles : découpage, broyage, façonnage, centrifugation, trempage dans des solutions antibiotiques/antimicrobiennes, stérilisation, irradiation, séparation, concentration ou purification de cellules, filtration, lyophilisation, congélation, cryoconservation, vitrification. Parmi les manipulations considérées comme substantielles, sont généralement retrouvées : la manipulation génétique (transfert de gènes, modification du génome), l'altération du phénotype, la culture *ex vivo* et l'expansion / activation *ex vivo*. (7)

Ainsi les cellules sanguines triées à des fins de transfusion ou les cellules souches hématopoïétiques sélectionnées pour la greffe ne sont pas des médicaments de thérapie innovante, ni même des médicaments, mais des préparations de thérapie cellulaire (PTC). Les Etats membres établissent les réglementations applicables à ces produits, qui ne relèvent donc au niveau européen que des directives relatives aux tissus et cellules. (8)

### **C. LES PRODUITS ISSUS DE L'INGENIERIE CELLULAIRE OU TISSULAIRE**

La réglementation européenne a défini les produits issus de l'ingénierie tissulaire comme contenant ou étant constitués « de cellules ou tissus issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire » et qui sont « présentés comme possédant des propriétés leur permettant de régénérer, réparer ou remplacer un tissu humain, ou qui sont utilisés chez l'être humain ou administrés à celui-ci dans ce but ».

Les cellules ou tissus sont considérés comme issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire si « ils ne sont pas destinés à être utilisés pour les mêmes fonctions essentielles chez le receveur et chez le donneur » ou s'ils ont subi « une manipulation substantielle, de façon à obtenir des caractéristiques biologiques, des fonctions physiologiques ou des propriétés structurelles utiles à la régénération, à la réparation ou au remplacement recherchés. » Les manipulations jugées non substantielles sont les mêmes que celles des médicaments de thérapie cellulaire somatique.

Un produit issu de l'ingénierie tissulaire peut contenir des cellules ou tissus d'origine humaine et/ou animale, viables ou non. Lorsqu'un produit peut répondre à la définition de produit issu de l'ingénierie tissulaire et à celle de médicament de thérapie cellulaire somatique, il doit être considéré comme un produit issu de l'ingénierie tissulaire. (2)

### **D. LES MEDICAMENTS COMBINES DE THERAPIE INNOVANTE**

Un MCTI est un MTI qui, à ses cellules ou tissus, « incorpore comme partie intégrante un ou plusieurs dispositifs médicaux ». Les dispositifs médicaux concernés doivent répondre à l'article 1er, paragraphe 2, point a), de la directive 93/42/CEE ou à l'article 1er, paragraphe 2, point c), de la directive 90/385/CEE dans le cadre de dispositifs médicaux implantables actifs. Les cellules ou tissus, s'ils ne sont pas viables, doivent être susceptibles « d'avoir sur le corps humain une action qui peut être considérée comme essentielle par rapport à celle des dispositifs précités ». (2) Quel que soit le rôle du dispositif médical, l'action des cellules ou tissus doit être considérée comme le mode d'action principal du produit combiné, qu'il soit pharmacologique, immunologique ou métabolique. Ainsi tout produit pouvant relever de la définition de médicament combiné de thérapie innovante doit être considéré comme tel. (2)

## **II. CADRE REGLEMENTAIRE**

### **A. DEFINITIONS ET STATUTS**

L'annexe I de la directive 2001/83/CE (1), modifiée par la directive 2009/120/CE (9), a permis de définir les médicaments de thérapie génique et les médicaments de thérapie cellulaire somatique, tels qu'ils ont été décrits précédemment. Elle spécifie également les exigences relatives à la traçabilité ainsi qu'aux matières de départ, substances actives et produits finis. Elle établit aussi les spécificités de la documentation des études, cliniques et non cliniques, et des procédés de fabrication, caractérisation et contrôle des médicaments de thérapie innovante.

Le règlement CE n° 1394/2007 a créé le statut d'Advanced Therapy Medicinal Product (ATMP) et classifie les différents MTI afin de leur appliquer une réglementation établissant le niveau de qualité adapté aux pratiques pharmaceutiques les concernant. Il décrit en effet des lignes directrices concernant les aspects non-cliniques, la production et le contrôle qualité de ces produits. Ce texte définit également les produits issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire et les médicaments combinés de thérapie innovante. Enfin, il établit la création d'un Comité des thérapies innovantes au sein de l'Agence européenne des médicaments (EMA). (2) Ce texte a été transposé dans le droit français par l'article 8 de la loi n° 2011-302 du 22 mars 2011 (10), le décret n° 2012-1236 du 6 novembre 2012 (11) et l'article L. 4211-9-2 de la loi n° 2016-41 du 26 janvier 2016 (12).

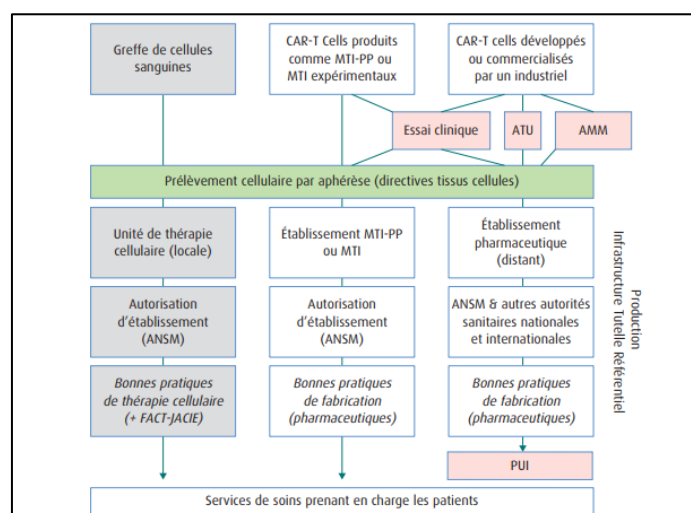
Ce règlement est toutefois uniquement destiné à réglementer les MTI destinés à être mis sur le marché dans les Etats membres, qui sont donc préparés de façon industrielle. Il exclut donc de son champ d'application les médicaments de thérapie innovante qu'il définit comme « préparés de façon ponctuelle » (MTI-PP). Pour un tel produit, des normes de qualité spécifiques à l'Etat membre dans lequel il sera utilisé devront être appliquées. Leur utilisation doit alors se faire « dans un hôpital, sous la responsabilité professionnelle exclusive d'un médecin, pour exécuter une prescription médicale déterminée pour un produit spécialement conçu à l'intention d'un malade déterminé, tout en veillant à ce qu'il ne soit pas porté atteinte aux règles communautaires applicables en matière de qualité et de sécurité ». (2) Ainsi en France les autorisations liées à ces produits sont régies par l'Arrêté du

04 février 2013. (13) Conformément à l'article R4211-32 du CSP, des structures comme l'Etablissement français du sang peuvent être autorisés par dérogation à procéder à la préparation, conservation, distribution et cession de MTI-PP. (7,14) Le Tableau I ci-dessous résume les différences entre les MTI, MTI-PP et préparations de thérapie cellulaire (15).

Manipulation et usage			Application	Statut	Réglementation
Non substantielle	et	Homologue	Restreinte ou large	PTC	Nationale
Substantielle	ou	Non homologue	Large	MTI	Européenne
			Restreinte (1 patient dans 1 état)	MTI-PP	Nationale

*Tableau I : Statuts applicables aux produits issus de tissus et cellules*

Bien que les MTI destinés à un usage autologue soient par définition destinés un seul patient, ils ne relèvent pas du statut de MTI-PP lorsque leur fabrication suit un processus développé et qualifié de manière industrielle, comme illustré ci-dessous par la figure 5. (16)



*Figure 5 : Cadre réglementaire pour les produits thérapeutiques constitués de cellules viables (Chabannon et Larghero, 2018)*

Lorsqu'un médicament de thérapie innovante contient des cellules ou des tissus humains, la directive 2004/23/CE doit s'appliquer en ce qui concerne leur don, obtention et contrôle. Dans le cas d'utilisation de sang humain, les normes décrites dans la directive 2002/98/CE doivent donc être respectées pour sa collecte, contrôle, transformation, conservation et distribution. Les autres aspects sont régis par le règlement n°1394/2007. (2,8,17)

## B. ESSAIS CLINIQUES

Le règlement CE 1394/2007 rappelle que la directive 2001/20/CE doit s'appliquer concernant les bonnes pratiques relatives à la conduite d'essais cliniques de médicaments à usage humain. Elle souligne toutefois que les lignes directrices fixées par la directive 2005/28/CE devraient faire l'objet de règles particulières pour permettre la prise en compte des caractéristiques spécifiques des MTI. (2,18,19)

Conformément à ce qui a été établi dans l'article 4 du règlement CE 1394/2007, la Commission Européenne a publié en 2019 les lignes directrices détaillées concernant les Bonnes Pratiques Cliniques (BPC) à appliquer aux médicaments de thérapie innovante. (20)

Afin de permettre la consultation d'experts, le règlement européen 536/2014 a également permis de prolonger la durée d'évaluation des dossiers d'essais cliniques portant sur des médicaments expérimentaux de thérapie innovante. (21)

Le Tableau II ci-dessous synthétise les différentes réglementations applicables aux essais cliniques de MTI, MTI-PP et PTC.

	MTI	MTI-PP	PTC
Base législative de l'autorisation d'essai clinique	Au niveau européen Directive 2001/20/CE conduite d'essais cliniques de médicaments à usage humain Règlement européen n°536/2014 (applicable en 2016)  Au niveau français Loi n° 2004-806 relative à la politique de santé publique		Législation française Loi n° 2004-806 relative à la politique de santé publique
Autorisation de lieu de recherche	L'autorisation de RBM vaut autorisation de lieu de recherche (article L.1125-1 du CSP)		L'autorisation de RBM vaut autorisation de lieu de recherche (article L.1125-1 du CSP)
Site de production	Etablissement pharmaceutique		Etablissements et organismes autorisés par l'ANSM (unités de thérapie cellulaire)
Autorisation requise pour le site de production	Autorisation d'ouverture d'établissement (obtenue préalablement à la demande d'autorisation de RBM).		L'autorisation de RBM vaut autorisation de préparation. Le site de fabrication n'a pas l'obligation d'être autorisé avant la demande d'autorisation d'essai clinique.
Distribution du produit	Distribution par l'établissement pharmaceutique en charge de sa production. Distribution par la PUI possible.		Distribution par l'unité de thérapie cellulaire en charge de sa préparation.
Obligation d'enregistrement de la RBM dans la base de données européenne (Eudract)	Oui		Non

*Tableau II : Cadres réglementaires applicables aux essais cliniques de produits issus de tissus ou cellules (Dossier du CNHIM 2017, XXXVIII, 1)*

### C. AUTORISATION DE MISE SUR LE MARCHÉ

La mise sur le marché des médicaments de thérapie innovante se fait obligatoirement en suivant la procédure centralisée pour les MTI définis par le règlement (CE) n°1394/2007. (2,22) L'autorisation est donc donnée par la Commission Européenne (CE) après évaluation par l'EMA à partir de l'avis du Comité du médicament (CHMP), lui-même basé sur l'avis du Comité des médicaments de thérapie avancée (CAT). Une vigilance particulière sera portée sur la traçabilité, ascendante et descendante, ainsi que sur le suivi à long terme de l'efficacité et de la sécurité des produits.

Concernant les MTI-PP, leur mise sur le marché peut être autorisée au niveau national par les Etats membre. Cela est rendu possible en France grâce à la loi n° 2011-302 du 22 mars 2011 modifiant le Code de la Santé Publique, et en particulier l'article L.5121-1. Ainsi la mise sur le marché nationale peut être accordée pour cinq ans par l'ANSM, conformément à l'arrêté du 04 février 2013, et après avis de l'Agence de Biomédecine. (10,13) L'ANSM a également autorité pour renouveler ou modifier les autorisations données aux établissements ou organismes préparant des MTI-PP. Le Tableau III ci-dessous synthétise les différentes réglementations applicables à la mise sur le marché de MTI, MTI-PP et PTC.

	MTI	MTI-PP	PTC
Cadre réglementaire	Aux niveaux européen et français Règlement européen n°1394/2007	Spécificité française Loi n° 2011-302 du 22 mars 2011 dont article L.5121-1 du CSP Décret n° 2012-1236	Au niveau européen Directive 2004/23/CE Au niveau français Article L.1243-1 du CSP
Statut réglementaire	Médicament	Médicament	Produit de santé
Autorité régulatrice	EMA ANSM pour la France	Autorisation de l'ANSM, après avis de l'ABM concernant : préparation, conservation, distribution, cession (Décret n° 2012-1236)	Autorisation de l'ANSM, après avis de l'ABM concernant : préparation, conservation, distribution, cession (Article L1243-2 du CSP)
Dépôt d'AMM	Procédure européenne centralisée Règlement européen n°726/2004 Evaluation du dossier par l'EMA (expertise du CHMP sur avis du CAT)	Procédure nationale Règlement européen n°1394/2007 ANSM pour la France	Procédure nationale Décret 2008-968 du 16 décembre 2008 Arrêté du 27 octobre 2011 ANSM pour la France
Importation/Exportation	Oui	Non	Oui
Règlement pédiatrique 1901/2006/CE	Oui	Non	Oui
Bonnes pratiques de fabrication	BPF des médicaments (Directive 2003/94/CE et Article L. 5121-5 du CSP)	BPF des médicaments établissements pharmaceutiques (Directive 2003/94/CE et Article L. 5121-5 du CSP) ou BPF des médicaments établissements autorisés n'étant pas établissement pharmaceutique (Article L. 5121-5 du CSP)	Bonnes pratiques « tissus cellules » (Article L. 1245-6 du CSP)
Etablissement gérant	Etablissement pharmaceutique pour la fabrication, l'importation, l'exportation et la distribution en gros (Articles L. 5124-1 et L. 5124-9-1 du CSP)	Etablissement pharmaceutique (Articles L. 5124-1 et L. 5124-9-1 du CSP) ou Etablissement autorisé par l'ANSM pour la préparation, la conservation, la distribution et la cession de MTI-PP (Article L. 4211-9-1 du CSP)	Etablissements et organismes autorisés par l'ANSM (Unités de thérapie cellulaire) pour la préparation, la conservation, la distribution et la cession (Article L.1243-2 du CSP)
Vigilance post AMM	Pharmacovigilance	Pharmacovigilance	Biovigilance

*Tableau III : Cadres réglementaires applicables à la mise sur le marché de produits issus de tissus ou cellules (Dossier du CNHIM, 2017, XXXVIII, 1)*

#### **D. FABRICATION ET PREPARATION**

Le règlement CE n°1394/2007 établi que les médicaments de thérapie innovante doivent être fabriqués conformément aux principes des bonnes pratiques de fabrication définis dans la directive 2003/94/CE. Il admet toutefois qu'il « convient de définir des lignes directrices spécifiques aux médicaments de thérapie innovante, de manière à refléter correctement la nature particulière de leur processus de fabrication ». (2,23)

Au-delà des documents relatifs aux biomédicaments (24), la Commission Européenne a publié en 2017 les recommandations relatives aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) spécifiques aux médicaments de thérapie innovante. (25) En 2019 l'ANSM a également ajouté une partie spécifique aux médicaments de thérapie innovante dans ses Bonnes Pratiques de Fabrication, en plus de l'annexe 2 relative aux médicaments biologiques. (26) Les exigences concernant le personnel, les locaux et équipements, les matières premières, la production, la qualification et validation, ainsi que la libération et le contrôle y sont notamment détaillées.

Dans le cas de médicaments de thérapie génique, la classification donnée par le HCB impose également différentes contraintes de confinement. (6)

Les médicaments de thérapie innovante n'étant pas présentés sous forme directement administrable doivent toutefois faire l'objet d'une préparation. En attendant une mise à jour des Bonnes Pratiques de Préparation (27) qui devrait définir un cadre à la préparation des MTI, certaines sociétés savantes, comme la Société Française de Pharmacie Oncologique, émettent des recommandations sur le circuit à établir en milieu hospitalier. (28)

Concernant les traitements par CAR-T cells, les centres hospitaliers doivent répondre aux exigences de l'arrêté du 28 mars 2019 et être préalablement qualifiés, notamment au niveau de leur PUI, par l'industriel commercialisant le traitement. (29)

## **E. DECRET PUI RELATIF AUX MTI**

Prenant en compte le règlement CE n°1394/2007, l'article R. 5126-9.-I du décret n°2019-489 du 21 mai 2019 relatif aux Pharmacies à Usage Intérieur (PUI) (30) établit que celles-ci doivent désormais disposer d'une autorisation pour les activités de reconstitution de spécialités pharmaceutiques mentionnant expressément la reconstitution de MTI et la mise sous forme appropriée des MTI-PP, y compris expérimentaux. Cette autorisation est délivrée pour cinq ans par l'autorité compétente.

L'article 4 de ce décret prévoit que les PUI exerçant déjà une ou des activités désormais soumises à autorisation préalable devront obtenir cette autorisation au plus tard le 31 décembre 2021. Pour les PUI déjà engagées dans l'activité des CAR-T cells, il est donc possible de poursuivre en attendant d'en obtenir l'autorisation expresse avant ladite date.

L'article R. 5126-25 précise que pour ces médicaments une convention peut être établie, entre une PUI et un établissement ou organisme autorisé, pour organiser leur conservation, leur reconstitution ou leur mise sous forme appropriée, conformément à la notice ou au protocole de recherche. Une fois signée, la convention est transmise au directeur général de l'agence régionale de santé. (31)

## **III. ESSAIS CLINIQUES ET MISES SUR LE MARCHÉ**

### **A. SUPPLÉER UN GÈNE DÉFECTUEUX**

Les premiers essais de thérapie génique ont été conçus afin de suppléer le gène défectueux de maladies monogéniques provoquant des syndromes d'immunodéficience et des pathologies hématologiques ou neurologiques graves. (3,32,33)

#### **Syndromes d'immunodéficience congénitaux ou héréditaires**

##### **Déficit immunitaire combiné sévère par déficit en adénosine désaminase (ADA-DICS)**

En 1995 une enfant de 3 ans souffrant d'ADA-DICS a pu être traitée par le premier essai clinique de thérapie génique au monde, afin de restaurer ses défenses immunitaires par l'injection de cellules souches et lymphocytes génétiquement modifiés. Le Strimvelis®, un traitement par cellules CD34+ autologues exprimant le gène ADA, a été le tout premier



médicament combinant thérapie génique et cellulaire à avoir été autorisé au monde lorsque l'Europe l'a approuvé en 2016.

#### Syndrome d'immunodéficience combiné sévère lié à l'X (SCID X1) : « bébés bulles »

La thérapie génique a permis de rétablir l'immunité chez quasiment tous les patients « bébés bulles » traités par thérapie génique en 1999. L'insertion aléatoire du gène thérapeutique déclencha toutefois de nombreuses leucémies, entraînant la suspension de plusieurs essais cliniques dans le monde afin d'améliorer les vecteurs viraux utilisés.

#### Hémophilie

L'hémophilie B est causée par un défaut du facteur IX codé par le gène F9, un gène de petite taille. En 1996 un essai de ré-implantation transdermique de fibroblastes modifiés par vecteur rétrovirus a permis une expression de facteur IX, faible mais surtout transitoire. En 2010 l'utilisation unique d'un vecteur AAV8 a permis à tous les patients d'atteindre un taux de FIX entre 2 et 5%, et ainsi diminuer ou arrêter l'injection de facteur IX exogène. Plus récemment, l'adjonction d'un promoteur spécifique reconnu par les cellules du foie au gène du FIX, contenu dans un vecteur génétiquement modifié, a permis d'atteindre et maintenir un taux de 20 à 40% de FIX pendant plusieurs mois.

L'hémophilie A, dont le facteur VIII est codé par une séquence supérieure à 7 kb, nécessite toutefois une approche de développement différente, combinant lentivirus et modification par génie génétique de la molécule du FVIII. En 2015 un essai clinique a montré des premiers résultats très encourageants en termes de sécurité et d'efficacité.

#### Drépanocytose

Un patient de 13 ans souffrant d'une forme sévère de la maladie a été traité par des équipes française et américaine au sein d'un essai clinique de phase I/II. Les cellules souches hématopoïétiques du patient ont été prélevées au niveau de la moelle osseuse, puis modifiées génétiquement à l'aide d'un vecteur lentiviral et réinjectées par voie veineuse. Ce traitement a permis d'obtenir une rémission complète après un suivi de 15 mois.

### **Bêta-thalassémie**

En 2007, un patient atteint d'une forme grave de bêta-thalassémie a pu bénéficier d'un essai clinique visant à modifier *ex vivo* ses cellules souches hématopoïétiques CD34 pour exprimer un transgène bêta-globine. Trois ans après, plus de 10% des cellules souches de la moelle contenaient le gène modifié, permettant au patient de se passer de transfusion. Cependant, dans la moitié des cellules modifiées le vecteur lentivirus s'était inséré dans le gène codant une protéine de la régulation de la prolifération et de la différenciation cellulaires. Bien que sans dommage apparent, cela suggéra que la sécurité de cette thérapie n'était pas complètement assurée.

### **Déficit familial en lipoprotéine lipase**

L'alipogene tiparvovec (Glybera®), vecteur contenant le variant du gène humain de la lipoprotéine lipase (LPL) LPLS447X injectable par voie intramusculaire, a été le premier médicament de thérapie génique approuvé en Europe, fin 2012. Cette maladie étant très rare, la demande fut cependant trop faible, entraînant son retrait du marché.

### **Amaurose congénitale de Leber**

En 2008 le transfert *in vivo* (intraoculaire) d'une copie fonctionnelle du gène RPE65 par des vecteurs AAV a permis d'améliorer significativement la vue des douze enfants traités. Le voretigène neparvovec (Luxturna®) a été approuvé aux Etats-Unis fin 2017 dans la dystrophie rétinienne liée à la mutation RPE65. En Europe il dispose d'une AMM depuis 2018 et d'un SMR et ASMR jugés importants en 2019 par la Commission de la Transparence française.

### **Amyotrophie spinale infantile (SMA)**

L'altération du gène SMN1 est à l'origine de la maladie génétique la plus fréquente menant à la mortalité infantile. Le défaut quantitatif de protéine Smn dans le système nerveux central des malades est en effet à l'origine de la dégénérescence des neurones moteurs. En 2017, une AMM a été accordée au nusinersen (Spinraza®), un oligonucléotide antisens administré par voie intrathécale répétée afin d'augmenter le taux de protéine Smn.

Un autre traitement est également disponible dans le traitement de la SMA : l'onasemnogene abeparvovec (Zolgensma®), un vecteur AAV9 contenant une copie du gène

SMN1 sain. En administration unique, il bénéficie d'une AMM aux Etats-Unis depuis 2019 et d'une ATU de cohorte en France depuis 2020.

### **Adrénoleucodystrophie liée à l'X**

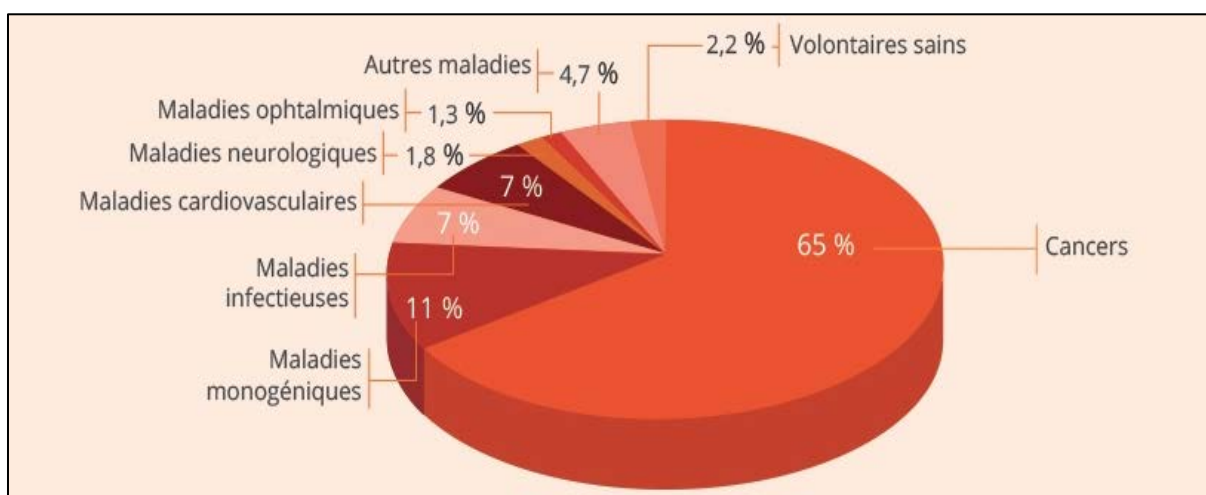
Quatre enfants atteints de cette maladie démyélinisante du système nerveux central, à l'évolution fatale, ont bénéficié de la réinjection intraveineuse de leurs cellules souches mésenchymateuses modifiées à l'aide d'un lentivirus, permettant de stopper l'évolution de la maladie.

D'autres maladies neurologiques plus fréquentes, telles que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer, pourraient également faire l'objet de traitement par thérapie génique.

## **B. CONFERER DE NOUVELLES PROPRIETES AUX CELLULES**

### **1. ONCOLOGIE**

L'évolution rapide des connaissances dans le domaine de la thérapie génique a également permis de s'intéresser à d'autres types de pathologies que les maladies monogéniques. Comme le montre la figure 6, parmi les 2000 essais de thérapie génique en cours en 2017, 65% concernaient en effet la cancérologie. (3)



*Figure 6 : Indications visées par les essais cliniques de thérapie génique entre 1989 et 2017 (Inserm, d'après The Journal of Gene Medicine Clinical)*

### **Tumeurs solides**

Plusieurs techniques d'induction de l'apoptose des cellules tumorales ont été envisagées. Parmi celles-ci, se trouve la méthode du « gène suicide » qui consiste à transférer *in vivo* dans les cellules tumorales un gène codant une enzyme qui va ensuite pouvoir activer la forme inactive d'un cytotoxique administré par voie systémique. Le gène codant la thymidine kinase du virus *Herpes simplex* de type 1, transfecté via un adénovirus dans les cellules tumorales, permet par exemple de rendre ces cellules sensibles au ganciclovir. Celui-ci, après avoir subi une phosphorylation par la thymidine kinase virale, s'incorpore dans l'ADN en élongation, induisant ainsi l'apoptose des cellules transfectées, qui infecteront à leur tour les cellules tumorales voisines. Plusieurs essais sont en cours, en particulier dans le traitement du glioblastome. (3) Les résultats seraient toutefois décevants dans le traitement des cancers digestifs, entraînant l'interruption d'essais cliniques. (34)

L'utilisation de virus oncolytique est également une voie de recherche intéressante pour infecter et éliminer les cellules tumorales de façon sélective. Outre l'effet du virus, la lyse des cellules tumorales induit la production de lymphocytes T dirigés contre la tumeur. Le talimogène laherparepvec (Imlygic®) a ainsi été approuvé en 2015 aux Etats-Unis et en Europe, dans le traitement des adultes atteints de mélanome non résecable. (33)

### **Hématologie**

Le traitement des cancers hématologiques est particulièrement propice à la thérapie génique *ex vivo* que représentent les CAR-T cells. Après le prélèvement des lymphocytes T du patient par leucaphérèse, ceux-ci sont modifiés génétiquement grâce à un vecteur viral afin d'exprimer des Récepteurs d'Antigène Chimériques (CAR) capables de se lier spécifiquement au récepteur CD19 des lymphocytes B. Après leur administration, elles vont donc détruire spécifiquement les cellules tumorales dans les leucémies lymphoblastiques de type B. La figure 7 ci-après récapitule les différentes étapes de la production de cette nouvelle thérapie. (3,35)

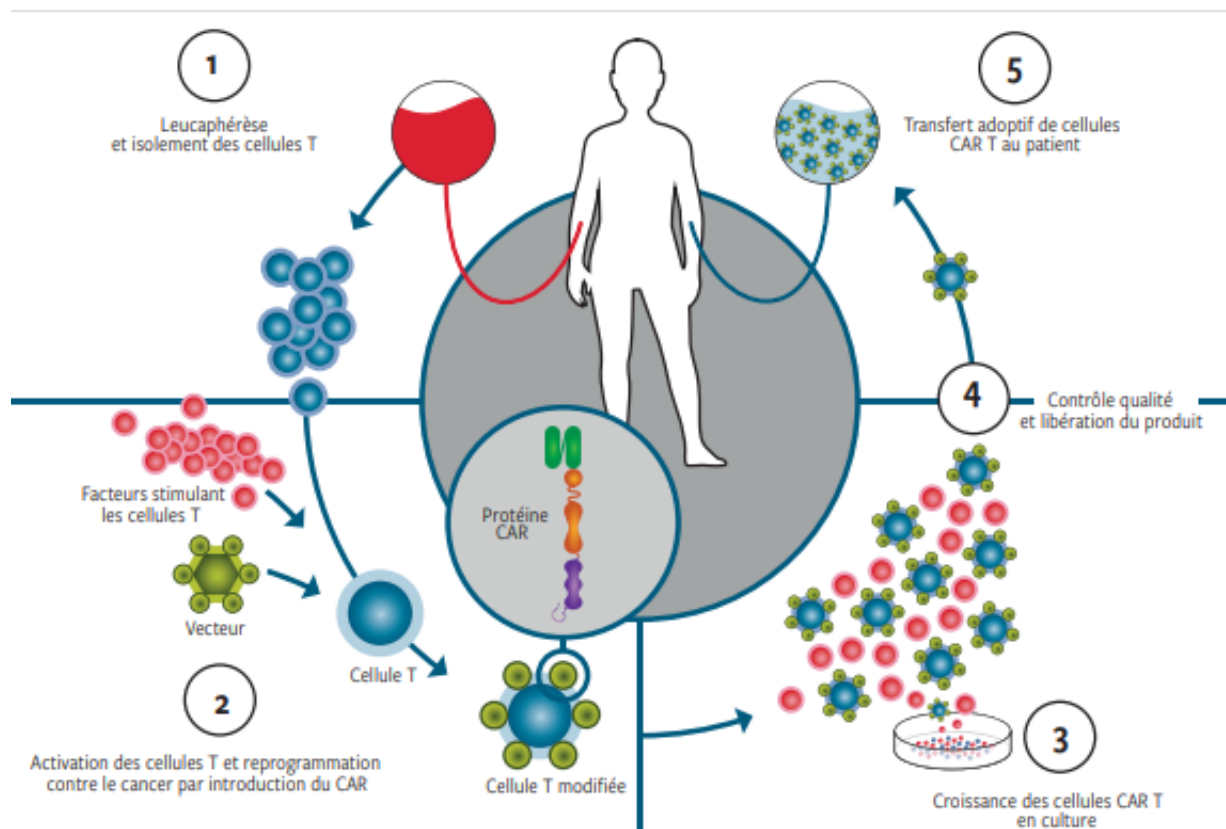


Figure 7 : Les étapes de la production de CAR-T cells (Ceppi et al, 2019)

L'engouement autour du développement de cette thérapie, dont la répartition des essais cliniques dans le monde est détaillée dans la figure 8, s'explique par les premiers succès observés dans le traitement des hémopathies lymphoïdes B.

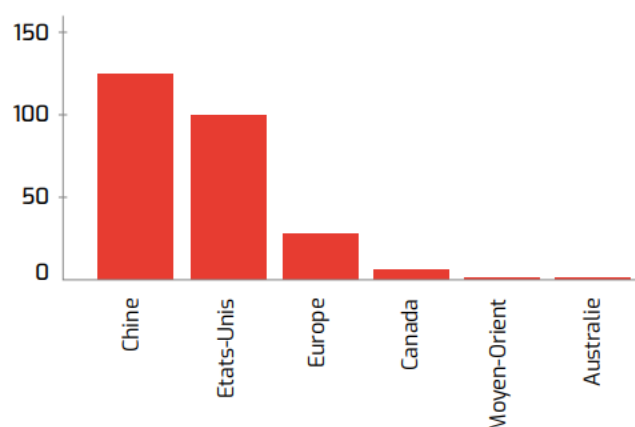


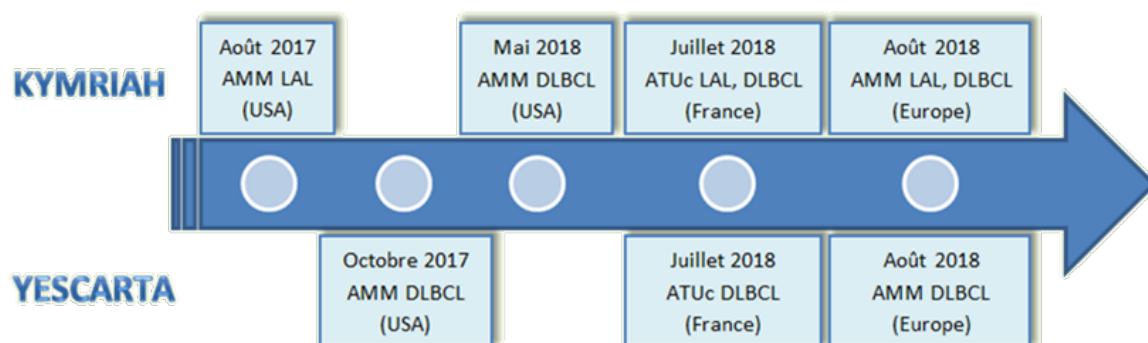
Figure 8 : Nombre d'essais cliniques dans le monde concernant les CAR-T cells (LEEM "Santé 2030" 2020 - d'après une présentation de Wells Fargo d'avril 2018)

Si de nombreux antigènes peuvent être ciblés pour le développement de CAR-T cells, les résultats dans le traitement des lymphomes non hodgkiniens de type B (LNH-B) présentés dans le Tableau IV sont liés à l'expression de l'antigène CD19 par les clones B tumoraux, mais pas par les cellules souches hématopoïétiques. (35,36)

ORR: Overall response rate (taux de réponse global); RC: rémission complète; F/U: follow up (suivi); OS: Overall survival (survie globale).									
Etudes/sponsors	Produits	N	Meilleur ORR	Meilleur % RC	F/U mois	ORR durable	RC durable	OS à 12 mois	Références
ZUMA1/kite	CD19/ CD3 $\zeta$ / CD28	108	82%	58%	12	42%	40%	59%	Neelapu, et coll., NEJM 2017
JULIET/ Novartis	CD19/ CD3 $\zeta$ / 4-1BB	93	52%	40%	12	34%	29%	49%	Borchmann, et coll., EHA 2018
TRANSCEND/ Juno	CD19/ CD3 $\zeta$ / 4-1BB	73	80%	59%	6	47%	41%	N/A	Abramson, et coll., ASCO 2018

*Tableau IV : Essais cliniques multicentriques publiés avec cellules CAR-T pour les LNH-B chez l'adulte (Ceppi et al, 2019)*

Ces résultats ont permis à deux traitements, tisagenleucel (Kymriah® de Novartis) et axicabtagene ciloleucel (Yescarta® de Kite/Gilead), d'être rapidement été approuvés aux Etats-Unis et en Europe, suivant la chronologie présentée dans la figure 9 ci-dessous.



*Figure 9 : Autorisations de mise sur le marché des CAR-T cells en Europe et aux Etats-Unis*

A noter qu'un autre traitement, le Zalmoxis®, impliquant la modification génétique de cellules T allogéniques avec un vecteur rétroviral, dispose d'une autorisation de mise sur le

marché depuis 2016 en Europe. Utilisé en adjuvant de greffe de cellules souches hématopoïétiques, il introduit un gène de sensibilité au ganciclovir dans les cellules greffées, permettant de détruire ces cellules en cas de maladie du greffon contre l'hôte. Le SMR de ce traitement a toutefois été jugé insuffisant par la Commission de la Transparence (avis du 9 janvier 2019), ne permettant pas sa prise en charge par la solidarité nationale.

## **2. HORS ONCOLOGIE**

Les MTI, et en particulier la thérapie génique, sont également source d'espoir dans d'autres pathologies fréquentes dont la survenue n'implique pourtant pas, *a priori*, de phénomène lié au génome. (33)

### **Maladies cardiovasculaires**

Ainsi la thérapie génique fait l'objet d'études dans la régénération des tissus vasculaires en cas d'ischémie artérielle, ou pour lutter contre la resténose après l'implantation d'un stent. Dans le traitement de l'insuffisance cardiaque chronique, un vecteur adéno-associé a montré des résultats positifs mais qui n'ont pas été confirmés par des études ultérieures. L'amélioration du tropisme cardiaque des vecteurs est une piste possible pour rendre cette thérapie efficace.

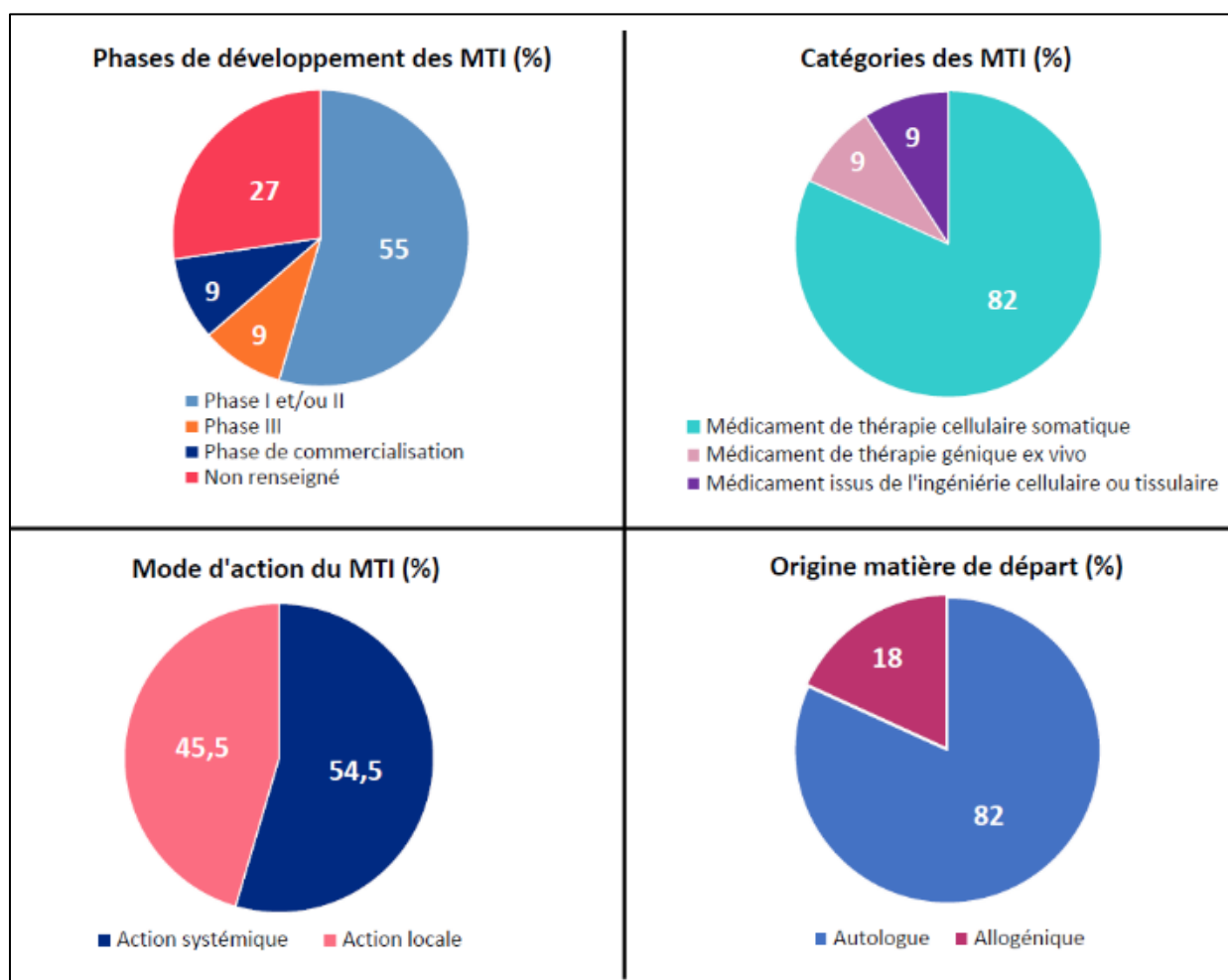
### **Maladies infectieuses**

La thérapie génique pourrait également être une réponse dans la recherche d'un traitement contre le VIH. Parmi les approches à l'étude, il est envisagé de rendre les lymphocytes T CD4 des patients infectés résistants au virus. L'édition génomique à l'aide de nucléases à doigts de zinc pourrait altérer le gène codant pour le récepteur de surface CCR5 des cellules souches hématopoïétiques prélevées. Une fois ré-injectées, ces cellules se multiplieraient et se différencieraient en cellules immunitaires ne présentant pas de récepteur permettant l'entrée du virus. Afin d'évaluer si cette technique pourrait permettre la restauration du système immunitaire du patient, un essai clinique est en cours aux Etats-Unis.

#### IV. PLACE DE LA PHARMACIE HOSPITALIERE FRANÇAISE

La pharmacie hospitalière française est un acteur clef dans le développement et l'accès aux médicaments de thérapie innovante, ce qui nécessite qu'elle s'adapte aux contraintes spécifiques qu'ils entraînent à toutes les étapes de leur circuit.

Une enquête réalisée par l'ANSM rapporte qu'en 2019 au moins 7 établissements de santé ou autres établissements publics autorisés, tels que l'EFS, fabriquaient des MTI-PP ou MTI expérimentaux en France. La figure 10 ci-dessous dresse le profil de ces MTI.



*Figure 10 : Caractéristiques des MTI-PP et expérimentaux fabriqués en France par des établissements publics (ANSM, février 2019)*



Toutefois tous les centres impliqués dans les MTI n'interviennent pas au niveau de leur fabrication. Ainsi dans le domaine des CAR-T cells, de nombreux centres hospitaliers se sont rapidement engagés dans la voie de la qualification de leurs établissements à cette nouvelle activité, comme le montre la figure 11 ci-dessous.

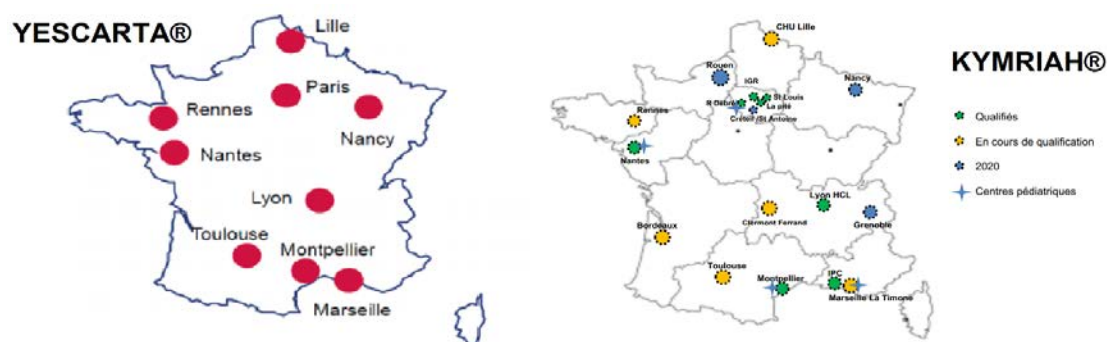


Figure 11 : Centres hospitaliers qualifiés pour les différents traitements par CAR-T cells en 2019

Bien qu'il ne s'agisse pas de produire les CAR-T cells, cette activité nécessite tout de même de recourir à de nombreuses ressources hospitalières, comme l'illustre la figure 12.

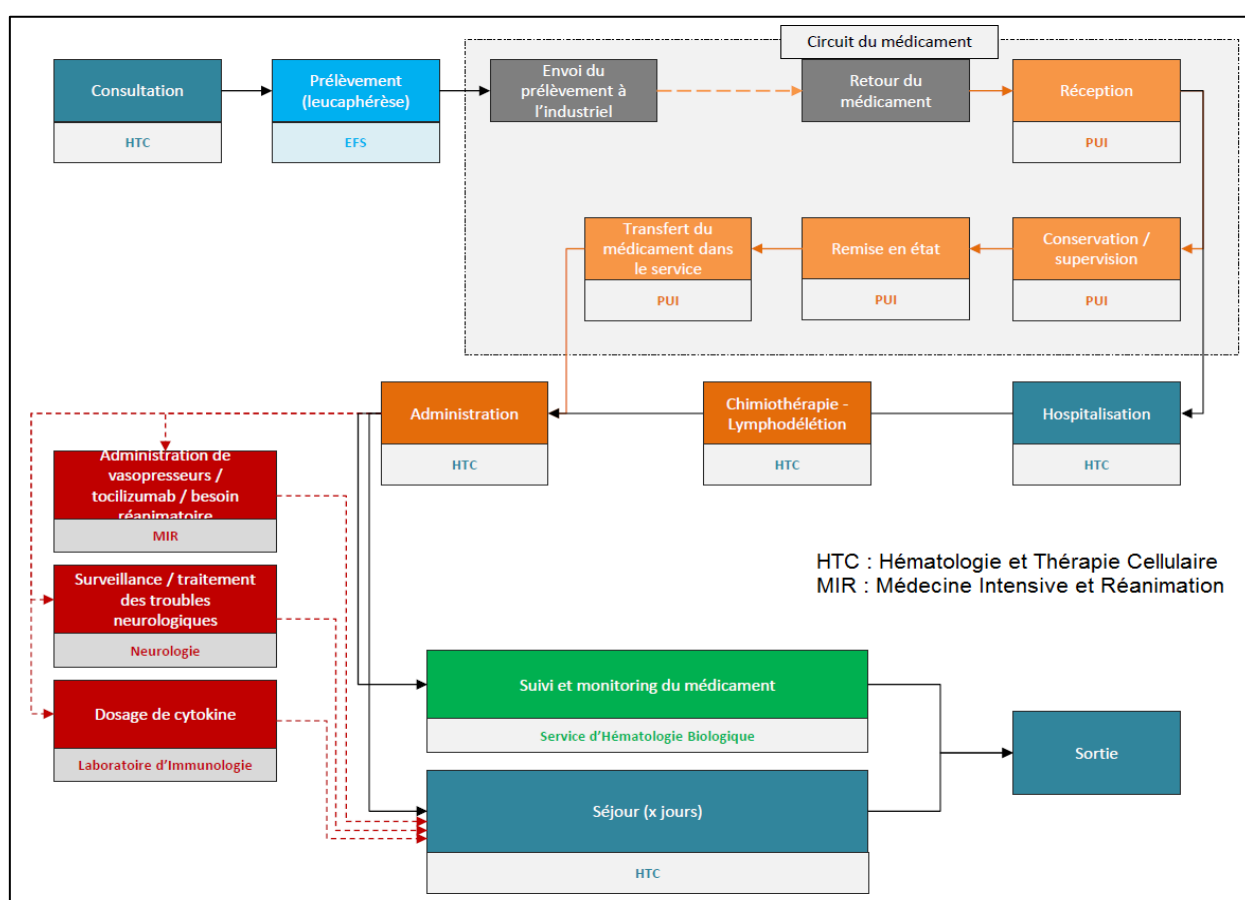


Figure 12 : Etapes de la prise en charge hospitalière d'un traitement par CAR-T cells (CHU de Tours)

Si les missions de réception, stockage, manipulation et transport de médicaments sont des activités quotidiennes dans une PUI, celles-ci doivent toutefois savoir adapter leur circuit à la prise en charge des MTI. Les CAR-T cells doivent par exemple être livrés et stockés dans l'azote liquide avant d'être décongelés. Cela nécessite non seulement de revoir nombre de procédures qualités internes afin d'intégrer ce nouveau circuit, mais également de se former et de s'équiper en cuves azotes, jusqu'à présent non utilisées en PUI. Une convention avec une unité de thérapie cellulaire peut être autorisée par les ARS, afin qu'elle puisse mettre une cuve azote à disposition de la PUI. Il est enfin nécessaire de s'intéresser au confinement de la préparation et au traitement des déchets des MTI, en particulier ceux relevant du statut OGM.

Selon les MTI et les préparations à réaliser, adapter les équipements préexistants des PUI peut ne pas être possible ou suffisant. Ainsi certains centres se dotent de moyens conséquents pour développer cette activité, comme le CHRU de Brest qui a notamment attribué de nouveaux locaux à sa PUI pour permettre la création d'une unité dédiée à la préparation de médicaments de thérapie génique. (37)

Au CHU de Rennes, le stockage et la décongélation de CAR-T cells en essais cliniques ou AMM sont déjà réalisés depuis 2018. L'enjeu est maintenant de définir les actions à mettre en place afin d'obtenir l'autorisation de préparation de MTI conformément au décret du 21 mai 2019 relatif aux PUI, afin de pérenniser cette activité tout en ouvrant la voie à la possibilité de préparation de MTI autres que les CAR-T cells.

## **PARTIE 2**

-

## **LES BACTERIOPHAGES**

## I. BIOLOGIE DES BACTERIOPHAGES

### A. STRUCTURE

Les bactériophages (ou « phages ») sont des virus qui infectent naturellement et spécifiquement les cellules procaryotes. D'une taille moyenne de 25 à 200 nm, ils sont dans l'immense majorité constitués d'une capsidie protéique protégeant leur génome (généralement constitué ADN) ainsi que d'une queue, de longueur variable. Les fibres de queue assurent la reconnaissance et l'arrimage sur l'hôte spécifique. La figure 13 ci-dessous illustre la morphologie des principaux bactériophages étudiés.

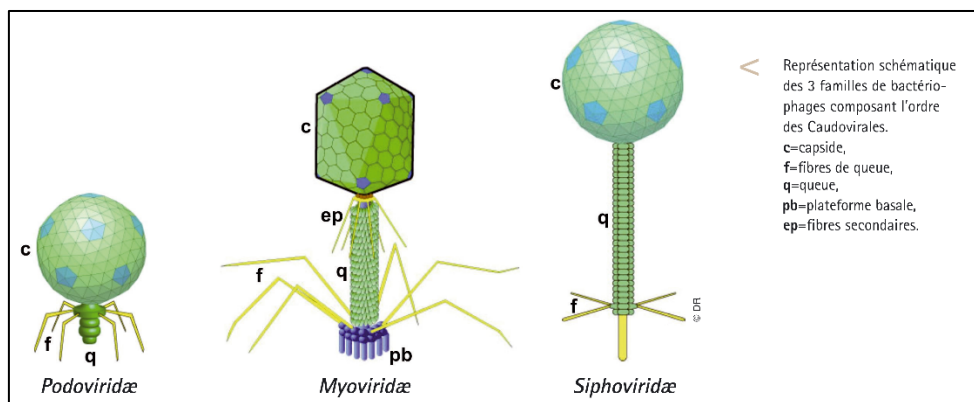


Figure 13 : Morphologie des principaux bactériophages (D'après Dufour et al, 2016)

### B. CYCLE INFECTIEUX

Après perforation enzymatique de la paroi et de la membrane bactérienne, l'acide nucléique viral transite via la queue vers le cytoplasme de la bactérie, le plus souvent à l'aide des molécules contractiles du fourreau, comme illustré dans la figure 14 ci-dessous. (38,39)

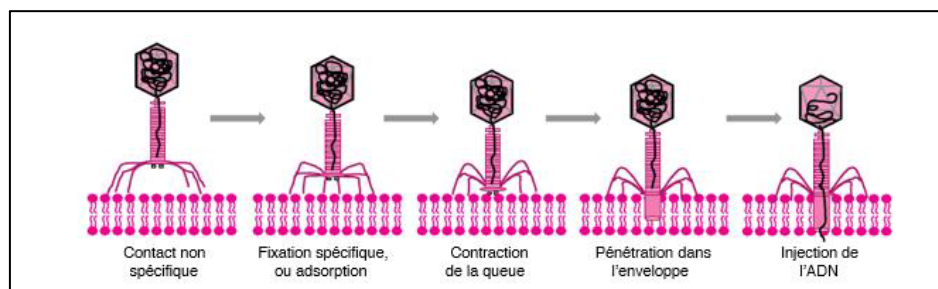


Figure 14 : Liaison et infection de la bactérie par un bactériophage (Paolozzi et Liébart, 2015 – Edition Dundod)

En dehors de leurs différences morphologiques, les bactériophages se distinguent en fonction de leur cycle infectieux. Après l'injection du matériel génétique viral dans le cytoplasme bactérien, quatre types de cycles sont possibles.

### 1. CYCLE LYTIQUE

Dans le cycle lytique, l'ADN bactérien est fragmenté et l'ADN viral utilise la machinerie bactérienne pour être transcrit, traduit et copié. Cet ADN est ensuite introduit dans les capsides lors de l'assemblage des particules virales. Aidée par les lysines produites par les phages, la désorganisation de la paroi bactérienne que cela crée provoque la lyse de la bactérie, permettant la libération des nouveaux phages. Ce mécanisme est illustré dans la figure 15 ci-dessous. Dans le cas de bactéries à croissance rapide, placées dans des conditions optimales, la durée d'un cycle infectieux varie de 9 à 45 minutes, libérant 30 à 300 phages par cellule lysée. Le cycle lytique produit ainsi un phénomène d'amplification d'autant plus important que le nombre de bactérie (inoculum) est élevé. Le processus de division bactérienne étant plus long que le cycle lytique, la destruction des populations bactérienne est plus rapide que leurs capacités de renouvellement. (38,39)

Ce sont ces phages, dits « virulents », qui sont utilisés à des fins thérapeutiques.

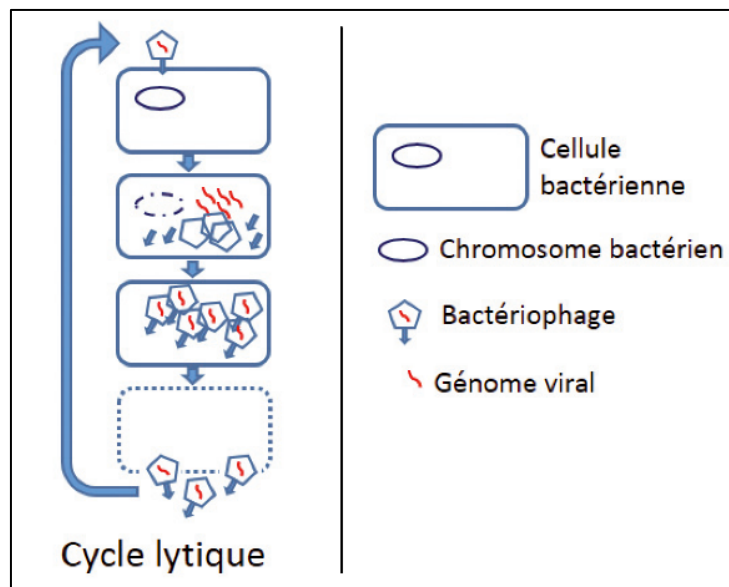


Figure 15 : Cycle lytique (D'après Dufour et al, 2016)

## 2. CYCLE LYSOGENIQUE

Après l'injection du matériel génétique dans le cytoplasme, l'ADN viral des phages dits « tempérés » peut être intégré par transduction dans le chromosome de la bactérie infectée, comme montré dans la figure 16. Cette capacité est rendue possible grâce à des enzymes spécifiques que ne portent pas les phages virulents. Les phages tempérés ont un cycle lysogénique : les gènes phagiques sont réprimés et le virus est dupliqué avec le reste du matériel génétique de la bactérie lorsqu'elle se divise. On parle alors de prophage, qui reste ainsi en dormance dans la bactérie, dite « lysogène ».

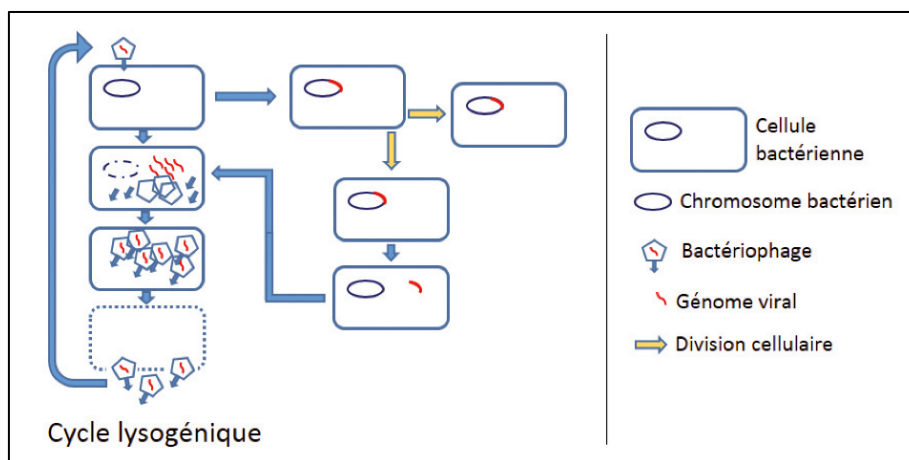


Figure 16 : Cycle lysogénique (D'après Dufour et al, 2016)

Sous l'effet d'un stress, le phage tempéré peut ensuite entrer dans un cycle lytique. Ce changement d'état est relativement rare en dehors de toute induction produite par des rayons ultra-violet, des rayons X ou un stress oxydatif, notamment provoqué par l'inflammation. Ces signaux provoqueraient des dommages dans l'ADN phagique conduisant à la destruction d'une protéine réprimant le cycle lytique, et aboutissant à l'excision du prophage. Certains antibiotiques, comme les quinolones ou les bêta-lactamines, déclenchent l'induction de prophages d'*Escherichia coli*, de *Clostridium difficile*, d'*Enterococcus faecalis* ou de *Staphylococcus aureus*. Dans des conditions de laboratoire, il a également été observé que le cycle lytique serait privilégié chez les bactéries à croissance rapide, alors que la lysogénie serait favorisée lorsque les bactéries infectées sont en croissance lente. (40–42)

Ces phages ont un rôle important dans l'évolution des bactéries car ils peuvent emporter, par erreur, du matériel génétique bactérien lors de l'encapsidation, et le transférer à une autre bactérie. On parle alors de « transduction ». Selon les gènes qu'il transporte, le prophage peut alors conférer de nouvelles propriétés à la bactérie. On parle alors de « conversion lysogénique », qui peut notamment permettre l'introduction des gènes de la toxine cholérique, de la leucocidine de Panton-Valentine, de la toxine diphtérique et de la Shiga-toxine. Les toxines des prophages peuvent être produites par les bactéries au cours de la lysogénie, ou alors exclusivement après l'induction de la phase lytique du prophage (par ex : Shiga-toxine d'entérobactérie ou protéine de liaison de plaquettes de *Streptococcus mitis*). L'intégration de certains prophages peut également modifier l'expression de gènes bactériens adjacents. D'autres caractères apportés par les prophages peuvent augmenter la pathogénicité des bactéries infectées, comme l'augmentation de la colonisation de l'hôte, la résistance aux antibiotiques, la résistance au stress oxydatif et aux sels biliaires, ou l'augmentation de la production de biofilms. Il a également été montré que les prophages peuvent modifier l'antigène O des LPS bactériens, permettant à ces dernières, potentiellement pathogènes, d'échapper au système immunitaire.

Au cours des divisions bactériennes, les prophages peuvent muter et perdre les protéines nécessaires à leur excision. La bactérie acquiert alors définitivement les caractères apportés par le prophage. Il est d'ailleurs possible pour une bactérie d'être infectée par plusieurs souches de bactériophages tempérés, le chromosome bactérien pouvant alors être constitué jusqu'à 10% de matériel génétique prophagique. Chez ces bactéries polylysogènes, on peut on peut alors observer toute une gamme de phénotypes. (38–42)

Chez l'humain, la majorité des bactériophages du microbiote intestinal seraient tempérés. Pour autant, il est indispensable de s'assurer de l'absence de phages tempérés dans les préparations de bactériophages à usage thérapeutique, puisqu'ils pourraient être vecteurs de gènes dangereux pour le malade (gène de virulence ou gène de résistance par exemple).

### 3. CYCLES CHRONIQUES ET PSEUDOLYSOGENIQUES

Ces deux cycles, illustrés par la figure 17 ci-dessous, sont les moins répandus et aussi les moins étudiés.

Dans le cycle pseudolysogénique, le matériel génétique n'est pas intégré au chromosome bactérien mais reste quiescent sous forme plasmidique. N'étant donc pas répliqué, il ne se transmet qu'à une seule des cellules filles lors de la division bactérienne avant de se disperser via un cycle lytique.

Dans le cycle chronique, le bactériophage est répliqué à bas bruit. Son excrétion ne déstabilise pas suffisamment la paroi bactérienne pour en entraîner la lyse. Les phages sont alors libérés dans l'environnement tout en étant transmis à la descendance de la bactérie infectée. Ce type de phage est très utilisé en biotechnologie, mais pas en thérapeutique. (42)

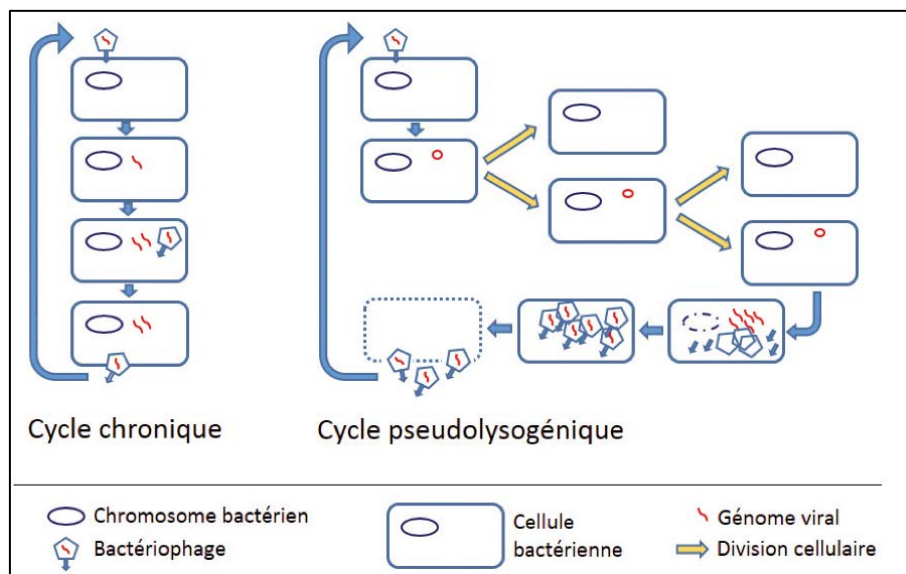


Figure 17 : Cycles chronique et pseudolysogénique (D'après Dufour et al, 2016)



### **C. ROLE ET PLACE DES PHAGES DANS LA NATURE**

On estime qu'il existe environ  $10^{30}$  phages différents, ce qui en fait la forme de vie la plus variée sur la planète, et donc autant de potentiels agents anti-microbiens. Pour chaque bactérie connue, il existe au moins un phage identifié (10 à 100 en moyenne). Présents dans tous les écosystèmes, on les retrouve dans les milieux aquatiques ( $10^7$  phages/ml), les sédiments ( $10^9$  phages/ml), mais également chez l'Homme, en particulier dans le tube digestif. Il y en aurait au minimum  $10^9$  à  $10^{10}$  par gramme de fèces. Les phages tolérant des conditions physico-chimiques bien plus contraignantes que celles supportées par les bactéries, ils semblent survivre dans les milieux naturels même après la disparition de leur bactérie-hôte. (38,39)

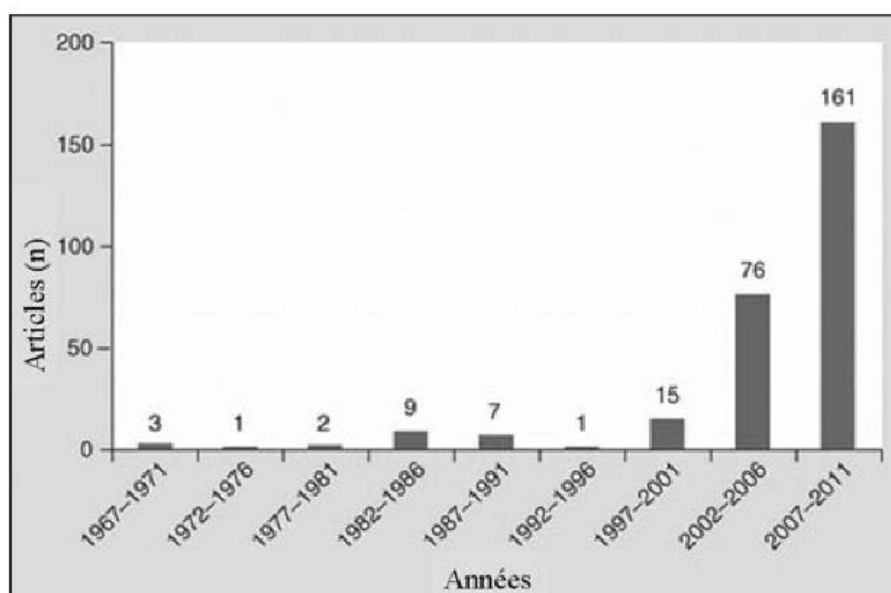
Bien que leur rôle soit encore mal connu, il est cependant certain qu'ils participent à l'évolution des populations bactériennes (cas des phages tempérés) ainsi qu'à leur régulation et renouvellement (cas des phages lytiques). Il a été observé que l'apparition et l'arrêt d'une épidémie de choléra correspondaient à une modification de l'équilibre entre les populations bactériennes et les populations de phages spécifiques. Ainsi la faible quantité de bactériophages dans les eaux provoquerait une explosion démographique de *Vibrio cholerae* au-delà du seuil infectant, alors que l'accroissement des populations de phages mettrait fin à l'épidémie. (38) Il a également été montré que les modifications dans l'abondance relative des bactéries du tractus digestif humain étaient associées à une modification du nombre et de la diversité des bactériophages qui s'y trouvent. (40)

## **II. DECOUVERTE ET REDECOUVERTE**

Quelques références, disponibles dans l'Annexe 3, permettent de supposer que l'effet des bactériophages a été observé dès la fin du 19<sup>ème</sup> siècle. (43) Mais c'est en 1917 que le franco-canadien Félix d'Hérelle, biologiste à l'Institut Pasteur, émit l'hypothèse que les plages claires observées au sein d'une culture de bactérie sur gélose pouvaient être due à un microbe qu'il appela « bactériophage ». Il isola rapidement plusieurs phages et les utilise dès 1919 pour traiter avec succès des enfants hospitalisés à l'hôpital Necker de Paris pour dysenterie bacillaire. L'utilisation réussie de phages contre la peste en Egypte en 1925 et contre le choléra en Inde en 1926 donna un essor mondial à la phagothérapie. En 1923 « L'institut du bactériophage » voit le jour à Tbilissi grâce à Georgi Eliava, ancien élève de Félix d'Hérelle. Les expériences se multiplient et font apparaître les premiers échecs, qui alimenteront les débats concernant l'existence même des bactériophages. Certains scientifiques voyaient en effet dans les résultats obtenus l'expression d'un phénomène enzymatique. Il fallut l'invention du microscope électronique, qui permit la première photographie de bactériophages en 1940, pour clore la polémique.

La pénicilline, découverte en 1928 par Alexander Flemming, n'était donc pas le premier traitement antibactérien de l'histoire de la médecine. L'utilisation thérapeutique des phages fut toutefois supplantée par les antibiotiques : plus aisés à fabriquer, plus stables et plus simples d'utilisation, ils permirent en effet de répondre de façon plus adaptée aux besoins immenses provoqués par la seconde guerre mondiale et les industries pharmaceutiques continuèrent ensuite les recherches dans ce sens pendant les décennies qui suivirent. Au moins cinq préparations furent produites par le laboratoire de d'Hérelle et commercialisées par l'entreprise qui deviendra plus tard L'Oréal : Bacté-coli-phage, Bacté-rhino-phage, Bacté-intesti-phage, Bacté-pyo-phage et Bacté-staphy-phage. Faute d'utilisation, elles furent retirées du marché, entraînant la perte des AMM existantes. La destruction des collections de l'Institut Pasteur de Paris et de l'Institut Pasteur de Lyon dans les années 80 mis un terme à la phagothérapie en France. Seul le domaine de la biologie moléculaire continua à étudier et utiliser les bactériophages, qui permirent d'ailleurs des avancées notamment dans le séquençage de l'ADN.

C'est la guerre froide qui permet à la phagothérapie de ne pas entièrement disparaître, les pays d'Europe de l'Est n'ayant alors pas accès légalement aux antibiotiques produits par l'industrie pharmaceutique occidentale. Toutefois la connaissance acquise à l'Est ne fut pas partagée, les scientifiques soviétiques ne pouvant se rendre à l'étranger partager leurs découvertes et ne pouvant pas publier dans les revues autres que celles des pays de l'Est, avec une rédaction en langue russe ou géorgienne. L'émergence de bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, associée à la fin de la guerre froide, pousse toutefois les thérapeutes occidentaux à s'intéresser à nouveau à la phagothérapie depuis le début des années 2000. Cela se constate par le nombre croissant de publications dans des revues internationales à ce sujet, comme montré dans la figure 18. (38,44)



*Figure 18 : Nombre de publications internationales concernant les bactériophages et la phagothérapie entre 1967 et 2011 (Ravat et al, 2015)*

### **III. CADRE REGLEMENTAIRE**

#### **A. REGLEMENTATION FRANÇAISE ET EUROPEENNE**

D'après l'article L5111-1 du Code de la Santé Publique, on entend par médicament « toute substance ou composition présentée comme possédant des propriétés curatives ou préventives à l'égard des maladies humaines ». (45) Ainsi, des bactériophages administrés dans le but de traiter une infection relèvent de la définition de médicament, quand bien même ils seraient déjà présents dans l'environnement du patient.

Pour autant, les Bonnes Pratiques de Fabrication (26) ne sont actuellement pas adaptées à la production industrielle de bactériophages par des établissements pharmaceutiques. Malgré la relative facilité de production de ces bactériophages, il est donc pour l'instant extrêmement difficile d'en faire une spécialité pharmaceutique. Les procédures d'obtention d'AMM sont par ailleurs conçues pour des médicaments à la composition fixe, ce qui nécessiterait d'obtenir une AMM pour chaque phage, individuellement, mais aussi à chaque mise à jour de la composition des cocktails de phages.

Les médicaments biologiques bénéficient toutefois d'un cadre adapté à leur développement, que ce soit dans l'annexe 2 des Bonnes Pratiques de Fabrication ou dans les recommandations publiées par l'EMA (24,26). L'alinéa 14 de l'article L5121-1 du Code de la Santé Publique définit par médicament biologique « Tout médicament dont la substance active est produite à partir d'une source biologique ou en est extraite et dont la caractérisation et la détermination de la qualité nécessitent une combinaison d'essais physiques, chimiques et biologiques ainsi que la connaissance de son procédé de fabrication et de son contrôle ». (46)

Cette définition semble adaptée aux bactériophages, toutefois la directive Européenne 2001/83/CE établit la liste des substances considérées comme médicaments biologiques, à savoir (1) :

#### **Les médicaments immunologiques**

Il s'agit des vaccins, toxines ou sérums, provoquant une immunité active ou passive, mais aussi des allergènes destinés à identifier ou provoquer une modification spécifique et acquise de la réponse immunologique à un agent allergisant.

#### **Les médicaments dérivés du sang et du plasma humains**

La directive 2002/98/CE du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 2003 modifie la directive 2001/83/CE et établit des normes de qualité et de sécurité pour la collecte, le contrôle, la transformation, la conservation et la distribution du sang humain et des composants sanguins.

#### **Les médicaments entrant dans le champ d'application de la partie A de l'annexe du règlement (CEE) n°2309/93**

Il s'agit des médicaments issus d'un des procédés biotechnologiques suivants (47) :

- Technologie de l'ADN recombinant
- Expression contrôlée de gènes codant pour des protéines biologiquement actives
- Méthodes à base d'hybridomes et d'anticorps monoclonaux

#### **Les médicaments de thérapie innovante**

La partie IV du Guide des BPF est adaptée à la production de MTI-PP. Toutefois la directive 2001/83/CE définit uniquement 4 types de MTI : les médicaments de thérapie génique, les médicaments de thérapie cellulaire somatique, les médicaments issus de l'ingénierie cellulaire ou tissulaire et les médicaments combinés de thérapie innovante.

Les bactériophages naturels ne répondant à aucune des définitions issues des différentes réglementations, il n'existe aucun cadre légal spécifique permettant leur production par des établissements pharmaceutiques. Ainsi, les laboratoires se heurtent à une réglementation inadaptée dans laquelle il est nécessaire de satisfaire à des exigences non pertinentes voire non applicables, sans que ne soient détaillées des exigences qu'il devrait être indispensable de remplir. Cela explique que malgré l'intérêt croissant de la phagothérapie dans différents domaines, un seul essai clinique soit parvenu à être ouvert en France. Le délai nécessaire à

en obtenir l'autorisation aurait toutefois entraîné une forte diminution du titre des phages entre leur production et leur administration, ce qui pourrait être à l'origine de l'échec de cet essai. (48)

En attendant l'évolution de la réglementation et l'ouverture d'essais cliniques, la seule solution pour traiter des patients par bactériophages en France reste la préparation magistrale par traitement compassionnel. Même si l'ANSM doit être sollicitée afin d'émettre un avis sur cette prise en charge, la responsabilité reste uniquement supportée par le médecin prescripteur, sous couvert de l'alinéa 37 de la déclaration d'Helsinki, et par le pharmacien hospitalier, qui réalise la préparation dans le respect des Bonnes Pratiques de Préparation. A noter toutefois que la réglementation européenne ne prévoit la possibilité d'usage compassionnel que pour les médicaments ayant fait l'objet d'une demande d'AMM ou étant en cours d'essais cliniques, pour des patients souffrant de maladie invalidante, chronique ou grave et ne pouvant pas être traités de manière satisfaisante par un médicament autorisé. (22)

Toutefois, celles-ci stipulent que : « Les matières premières non enregistrées pour la médecine humaine ou non décrites à une pharmacopée officielle ne peuvent pas être utilisées comme matières premières pour les préparations, sauf exceptionnellement en cas d'impossibilité d'approvisionnement par les sources décrites au premier paragraphe du chapitre 1.2.1. a),b),c),d) », à savoir des établissements pharmaceutiques, « et sous réserve qu'elles aient bénéficié d'une expertise physico-chimique et toxicologique adaptée et sauf, le cas échéant, dans le cadre de recherches biomédicales », en accord avec l'article L5121-6 du CSP. (27,49) Il revient donc au pharmacien hospitalier de s'assurer de la qualification adéquate des bactériophages non fournis par un établissement pharmaceutique, sans pouvoir s'appuyer entièrement sur la Pharmacopée Européenne ou Française, en dehors des monographies générales relatives aux formes pharmaceutiques, ni sur les Bonnes Pratiques de Préparation (BPP).

## **B. REGLEMENTATION NATIONALE BELGE**

En Belgique, en l'absence d'inscription à la Pharmacopée Européenne ou Belge, les substances actives doivent être autorisées par le Ministre de la Santé Publique, après avis favorable de la Commission de la Pharmacopée nationale. Des lots de produits non autorisés peuvent toutefois être utilisés, s'ils font l'objet d'une analyse et certification par un laboratoire agréé belge pour pouvoir être utilisé au sein de préparations magistrales. Ces laboratoires, privés ou publics, sont accrédités par l'Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de Santé (AFMPS). Concernant les phages, trop diversifiés pour pouvoir obtenir un à un l'autorisation ministérielle, c'est l'Institut Scientifique de Santé Publique qui a été identifié comme laboratoire adapté pour valider les certificats d'analyse des lots de matière première phagique. Bien que la procédure standard pour les substances actives non autorisées ne la concerne normalement pas, l'AFMPS a été exceptionnellement impliquée dans la rédaction d'une procédure pour la préparation magistrale de bactériophages, du fait de leur caractère spécifique et innovant.

Le 26 octobre 2016 il a ainsi été formellement convenu que les produits issus de phages naturels, qui ne sont pas pleinement conformes aux exigences relatives aux médicaments à usage humain selon la directive 2001/83, et pour lesquels il n'existe pas de monographie dans une pharmacopée officielle, peuvent être utilisés par un pharmacien en tant qu'ingrédients pharmaceutiques actifs dans les préparations magistrales. Le fournisseur établit alors une monographie interne, définie selon les caractéristiques pertinentes des phages utilisés comme substance active pharmaceutique, qu'il peut soumettre à l'AFMPS pour évaluation. Le pharmacien s'assure que la matière première est conforme à la monographie interne fournie par le fabricant, d'après les certificats d'analyse de lot validés par le laboratoire accrédité belge, puis délivre les phages sous forme de préparation magistrale à un patient spécifique. Une monographie générale, disponible à l'Annexe 4 a ensuite été élaborée par l'AFMPS, l'Institut Scientifique de Santé Publique et des experts de l'hôpital militaire de la Reine Astrid de Bruxelles. Destiné aux fournisseurs de bactériophages en tant que substance active pharmaceutique utilisée par des pharmacies hospitalières, ce document a été approuvé l'AFMPS le 10 janvier 2018 et permet d'apporter les premières spécifications aux préparations de bactériophages. (50,51)

#### IV. OBTENTION DE BACTERIOPHAGES A USAGE THERAPEUTIQUE

##### A. PRODUCTION DE SOLUTION DE BACTERIOPHAGES

Il est possible de produire soi-même des solutions de bactériophages à partir de phages extraits des milieux naturels. Pour cela il reste possible d'utiliser la méthode de d'Hérelle, il faut alors centrifuger, décanter et filtrer de l'eau « sale » puis mettre le filtrat dans un bouillon de culture contenant la bactérie pathogène. Après quelques heures d'incubation à 35°C l'utilisation de chloroforme permet de détruire les bactéries résiduelles sans détruire les phages, avant de centrifuger et filtrer à nouveau (filtres à 0.45 ou 0.22µm). La solution obtenue est alors exempte de débris bactériens et contient une quantité suffisante d'un ou plusieurs phages actifs sur la bactérie cible. Les produits de dégradations bactériens sont fortement immunogènes et imposent une étape de purification par filtration, plus ou moins importante selon la voie d'administration envisagée. Des techniques supplémentaires peuvent maintenant permettre d'obtenir des solutions pures d'un clone à partir d'une plaque de lyse. (38,39)

La recherche de phages actifs sur une souche bactérienne pathogène spécifique peut se faire dans tous les milieux environnementaux imaginables. Les phages se développant dans les milieux riches en bactérie cible, il peut être pertinent de les rechercher dans les échantillons provenant du patient (exsudats de plaie, sécrétions respiratoires, ...). Dans le cas de bactéries multi-résistantes, les eaux usées des hôpitaux sont également un réservoir important de bactériophages intéressants. (52)

Les bactéries utilisées pour isoler le phage actif sur la bactérie pathogène sont choisies en prenant également en compte de nombreux critères comme une purification facilitée, un plus faible nombre de toxines produites, mais également la facilité à les utiliser en laboratoire, liée notamment à leur pathogénicité. Ainsi les phages ciblant *Mycobacterium tuberculosis* sont isolés à partir de cultures de *Mycobacterium smegmatis*, moins pathogène et permettant d'obtenir un tapis cellulaire en quelques jours au lieu de plusieurs semaines ou mois. L'utilisation de multiples espèces bactériennes peut également permettre d'isoler des bactériophages polyvalents. Si un substitut à la bactérie pathogène est utilisé, il faut évidemment ensuite tester l'efficacité du phage isolé sur celle-ci. (52)



Il existe plusieurs méthodes pour détecter et caractériser des bactériophages d'intérêt. L'efficacité de la préparation peut par exemple être vérifiée en déposant une goutte de solution sur une gélose contenant un tapis bactérien (technique du spot test). Il apparaît alors une plage claire, signe de la lyse bactérienne, à l'endroit du dépôt. D'autres méthodes utilisables sont détaillées dans le Tableau V.

Methods for detecting newly isolated bacteriophages.			
Method	Description	Advantages	Limitations *
Spot testing	A plate is inoculated with host bacteria to form a lawn, then small drops of phage filtrate are placed on the surface. After incubation a zone of lysis indicates presence of phage.	Simple. Allows testing of multiple phage filtrates on the same plate.	Host must grow to confluence on solid media. Prone to false positives due to bacterial killing by media components or phage binding that does not lead to a productive infection.
Plaque testing	Increasing dilutions of phage filtrate are mixed with bacteria and placed on plate surface by spreading or soft agar overlay. After incubation plate is checked for the appearance of plaques.	Demonstrates productive phage growth. Plaque appearance can suggest lytic vs. temperate life cycle. Plaque size may suggest phage size due to diffusion effects (larger phages diffuse more slowly, etc.)	Host must grow to confluence on solid media. Not all phages are capable of forming plaques even on productive hosts due to limited diffusion in agar or low productivity.
Culture lysis	Phage filtrate added to broth culture of bacteria and incubated. Monitored for cell lysis as indicated by loss of culture turbidity. Metabolic dyes can be used instead of turbidity to assess bacterial metabolic activity [81].	Useful for bacteria that will not grow to confluence on solid media as well as any bacteria that grows well in broth. Can be adapted to automation using spectrophotometry to measure turbidity either in single tube or multiple well plates.	As with spot testing, can have false positives due to non-productive lysis. Cell debris from cells lysed during early infections may bind to and inactivate free phages, interfering with later infections. Hosts that rapidly evolve phage resistant mutants will cause false negatives as mutants maintain turbidity.
Routine test dilution (RTD)	Phage lysates are diluted to the point of producing just less than confluent lysis on a plate.	Useful with phage that do not form distinct plaques or very small indistinct plaques.	Prone to false positives when media components are not highly diluted.
<p>* These limitations can also be viewed as a screening method when isolating phages for phage therapy. That is, phages that cannot form plaques or whose host rapidly evolves resistance may be poor candidates as therapeutic phages. † All of these references used RTD for host range and other characterization, not detection of newly isolated phages, but in principle RTD could be used with a high titer, poorly plaquing novel phage.</p>			

*Tableau V : Méthodes de détection des bactériophages (Hyman, 2019)*

La recherche de phages tempérés dans les souches d'isolement est essentielle pour s'assurer que la préparation produite est bien exempte de phages tempérés. Elle peut se faire en exposant les bactéries à des éléments provoquant l'induction des prophages et en y recherchant ensuite des plages de lyse. Il est maintenant également possible de séquencer le génome bactérien pour y rechercher des séquences prophagiques. (52)

## **B. APPROVISIONNEMENT**

Il est théoriquement possible d'obtenir des bactériophages destinés à l'utilisation thérapeutique auprès des organismes des pays de l'ancienne Europe de l'Est. L'Institut Eliava à Tbilissi, en Géorgie, traite des patients par phagothérapie depuis 1923. Il s'agit le plus souvent de mélanges standards, généralement peu purifiés, principalement destinés à une administration par voie orale (ex : Intesti-phage®, Pyophage®). En Pologne, l'Institut d'Immunologie et de Thérapie Expérimentale Ludwik Hirszfeld, utilise la phagothérapie depuis sa fondation en 1952 à Wroclaw. S'appuyant sur la Déclaration d'Helsinki, cette activité continue à se développer, même depuis l'entrée du pays en Europe en 2004.

En Belgique, l'Hôpital militaire de la reine Astrid à Bruxelles produit des phages qualifiés conformément aux normes nationales belges. Cette phagothèque couvre davantage d'infections que les phages produits en France, mais l'autorisation d'importation de l'ANSM étant nécessaire, l'approvisionnement est complexe et long.

En France, des entreprises de biotechnologie peuvent également être des fournisseurs possibles de bactériophages en tant que matière première non pharmaceutique à usage compassionnel (phages anti-*S. aureus* et anti-*P. aeruginosa*). Ceux-ci ne sont pour l'instant pas fabriqués industriellement mais leur qualité est estimée compatible avec un usage clinique. Une certification de leur production conforme aux BPF est attendue avant de permettre leur utilisation par l'ANSM dans le cadre d'essais cliniques et l'obtention du statut d'ATU nominative. (53)

Aux Etats-Unis, l'Académie de Médecine de Californie a fondé en 2018 l'IPATH (Center for Innovative Phage Applications and Therapeutics, le premier centre dédié à la phagothérapie à ouvrir en Amérique du Nord, permettant aux patients d'accéder à usage compassionnel de la phagothérapie. (50)

Même si des initiatives récentes, comme Phage Directory depuis 2017, aident à faciliter les échanges de phages, il reste en pratique difficile d'importer des virus, et a fortiori des bactériophages qui n'ont aucune existence légale, faute de traçabilité satisfaisante ou d'un manque de certifications et d'analyses. Comme rappelé par le Comité Scientifique Spécialisé

Temporaire (CSST), il est en effet nécessaire de s'assurer que les phages importés soient produits en accord avec les Bonnes Pratiques de Fabrication européennes, où selon des normes au moins équivalentes pour un site hors Europe. (53) Les difficultés d'accès aux traitements par les patients occidentaux entraînent un essor du tourisme médical vers la Géorgie, ou la Pologne, réservé aux patients médicalement capables de voyager et financièrement capables de payer l'ensemble des frais engendrés (coût du voyage et coût du traitement). (50,54)

### C. QUALIFICATION

Les phages utilisés comme matière première pharmaceutiques en Belgique doivent se conformer aux essais suivants (55) :

- Détermination quantitative de la charge biologique ( $< 10$  cfu/100ml selon la méthode décrite dans la Pharmacopée Européenne).
- Détermination quantitative du taux d'endotoxine ( $< 5$  EU/kg/h pour la voie IV selon le Limulus test).
- Détermination du pH : conforme à la valeur énoncée dans la monographie individuelle (en général entre 6.0 et 8.0).
- Evaluation qualitative, par une méthode qualifiée, des phages.
- Evaluation quantitative, par une méthode qualifiée, du titre des phages.
- Quantification et qualification des impuretés liées au processus (notamment les agents utilisés pour la lyse des bactéries résiduelles).

Bien qu'elle ne soit pas opposable, il semble évident de s'inspirer de la monographie belge, faute de documentation française ou européenne, pour qualifier la matière première à utiliser pour effectuer une préparation magistrale de bactériophages. Si certains essais sont habituels en pharmacotechnie, ceux relatifs à la quantification et qualification des phages nécessitent de recourir à des techniques utilisées en microbiologie.

## V. PHARMACOLOGIE

### A. PHARMACOCINETIQUE

Il est essentiel de s'intéresser à la pharmacocinétique des bactériophages pour pouvoir les utiliser de façon efficace. La connaissance de leur capacité à passer les muqueuses est notamment déterminante pour pouvoir envisager un effet systémique à la suite de leur administration par voie orale. Il a bien été montré, principalement chez l'animal, que l'administration de bactériophages par voie orale provoquait une « phagémie ». Le délai et les doses nécessaires semblent toutefois variables d'une étude à l'autre, et difficilement prédictibles. L'administration intra-rectale permettrait d'atteindre une phagémie aussi élevée que lors d'une injection intramusculaire, et plus rapidement (5 minutes contre 15 minutes). De nombreux facteurs peuvent potentiellement impacter le passage des phages et restent à évaluer. On peut par exemple citer l'effet de la concentration de la préparation utilisée, les interactions possibles avec les cellules immunitaires intestinales ou la présence potentielle de séquences spécifiques au sein des protéines de capsid qui permettrait d'interagir avec les récepteurs des entérocytes. (56)

Une fois dans la circulation sanguine, les phages diffuseraient dans divers organes. Il a notamment été montré chez l'animal qu'après une administration par voie orale d'une dose unique de bactériophages, ceux-ci seraient retrouvés 2 à 4h après dans le compartiment sanguin et 10h après dans le foie, les reins et la rate. (44) Il a également été observé une importante concentration de phages au niveau cérébral après leur administration par voie intrapéritonéale chez des souris présentant une encéphalite à *Shigella dysenteriae*. Ces phages ont donc passé la barrière hémato-encéphalique puis se sont multipliés sur le site de l'infection. (57)

Leur possible utilisation par voie orale sera notamment conditionnée par leur capacité à rester actifs dans le tractus digestif. L'acidité gastrique tend à détruire les phages. D'autres paramètres physico-chimiques, comme la concentration en oxygène, pourraient également être impliqués dans la variation de l'efficacité des phages selon leur localisation dans l'intestin. Les bactériophages se retrouvent ensuite éliminés de l'organisme via les fèces ainsi que dans les urines. (41,50)

## **B. PHARMACODYNAMIE**

### **1. ACTION SUR LA CHARGE BACTERIENNE**

#### ***a. Seuil de réplication***

Pour permettre l'amplification phagique, il est nécessaire que la population de la bactérie cible soit supérieure au « seuil de réplication », qui est la densité à partir de laquelle l'infection de la bactérie devient probable. (40) Pour obtenir un traitement par bactériophages efficace il est indispensable de s'intéresser à ce seuil. C'est en effet la rencontre aléatoire entre le phage et sa bactérie cible qui permet d'initier l'amplification phagique nécessaire. Dans le cas où la densité de la population bactérienne n'est pas suffisante, les phages peuvent se retrouver éliminés de l'organisme avant d'avoir pu agir. S'il est important de débiter au plus tôt un traitement en cas d'infection, il peut être risqué de débiter trop tôt, c'est-à-dire lorsque le seuil de réplication n'est pas atteint.

La valeur de ce seuil varie selon de nombreux paramètres comme le site d'infection ou le nombre de phage administrés. Il est également nécessaire de prendre en compte la vitesse de multiplication des bactéries. Dans le cas de bactéries à multiplication lente le seuil est atteint plus tardivement, ce qui peut nécessiter de multiplier les administrations là où une seule pourrait suffire dans le cas de bactéries à croissance rapide. (58) Bien utilisés, les phages peuvent alors se montrer aussi rapides que les antibiotiques pour diminuer la charge bactérienne, comme cela a été montré sur les infections pulmonaires. (59)

#### ***b. Effets sur le biofilm***

Les bactériophages peuvent produire différentes enzymes leur permettant de dégrader les polymères présents à la surface des bactéries, ou qui sont produites par celles-ci pour former un biofilm. Ces dépolymérases peuvent soit être un composant structurel du phage, qui va aider à l'infection de la bactérie cible, soit être produite sous forme soluble au cours du cycle lytique.

Après fixation à une molécule de surface du biofilm (faisant office de récepteur secondaire), les différentes dépolymérases structurelles permettent au phage de dégrader le biofilm, puis

de dégrader l'enveloppe bactérienne après s'être fixé à la surface de la bactérie (récepteur primaire). Ce mécanisme est illustré dans la figure 19. Selon les enzymes portées, et leur localisation, les bactériophages peuvent présenter une efficacité spécifique au biofilm des bactéries qu'ils infectent. (60,61)

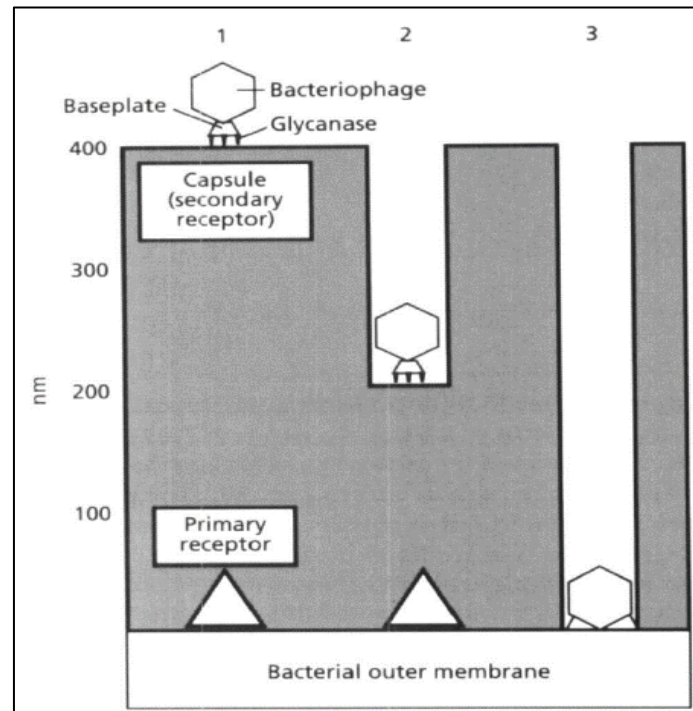


Figure 19 : Dégradation du biofilm bactérien (Hughes, 1998)

Il a ainsi été montré qu'en plus d'inhiber la croissance de deux souches de *Staphylococcus aureus*, les phages peuvent réduire l'épaisseur et la surface du biofilm d'un implant en titane après 48h de mise en contact. Par comparaison, la céfazoline à une concentration supérieure à cent fois la concentration minimale inhibitrice s'était montrée inefficace. (62)

## 2. INTERACTION AVEC LE SYSTEME IMMUNITAIRE

Il est attendu que l'introduction de protéines, et fortiori d'agent infectieux, provoque une réaction immunitaire de l'organisme. Malgré tout, la mise en jeu d'une réaction immunitaire innée, se traduisant par une réponse inflammatoire aigüe aspécifique, semble négligeable dans le cas d'utilisation de préparations phagiques suffisamment purifiées des débris bactériens. Il est également attendu que les fragments bactériens, issus de la lyse provoquée par la phagothérapie, provoquent eux-mêmes une réaction immunitaire.

Il semble par ailleurs que le système immunitaire du patient soit mis à contribution dans l'action des bactériophages. Une synergie d'action entre les bactériophages et les polynucléaires neutrophiles serait par exemple nécessaire pour obtenir une réponse clinique satisfaisante. Les phages induiraient par ailleurs la production de cytokines.

Cependant, l'administration de phages peut, dans le cadre de l'immunité adaptative, être accompagnée d'une production d'anticorps dont certains sont neutralisants, inactivant donc le bactériophage. L'intensité de la réaction immunogène provoquée varierait énormément selon les phages administrés. D'un point de vue clinique, ces anticorps ne sembleraient toutefois pas influencer l'efficacité du traitement. Cela pourrait notamment s'expliquer par une cinétique d'action plus rapide des bactériophages que celle de la production d'anticorps anti-phages. Il serait toutefois intéressant de s'intéresser à leur impact dans le cas d'un traitement par administrations répétées, notamment dans le cas de récurrence d'infection. Il pourrait alors être nécessaire d'augmenter les doses administrées ou d'envisager l'utilisation d'un phage au profil antigénique différent.

Finalement, la bonne tolérance immunitaire de l'organisme est rendue nécessaire et s'explique par la forte et fréquente exposition de celui-ci aux bactériophages tout au long de sa vie, en particulier au niveau digestif. (39,50)

## C. RESISTANCES BACTERIENNES

### 1. RESISTANCE AUX PHAGES

Il semble qu'à l'état naturel, les bactéries ne puissent pas devenir résistantes aux phages de façon pérenne. Le couple spécifique bactérie-bactériophage subirait en effet en permanence des mutations permettant de s'adapter l'un à l'autre, rendant labile tout système de résistance de la part des bactéries. Les principaux mécanismes de défense connus, différents de ceux aux antibiotiques, sont les suivants (39):

- Inhibition de l'adsorption virale : par mutation, non expression ou masquage du récepteur des phages
- Blocage de l'injection d'ADN : provenant notamment des prophages, empêchant la surinfection par un second virus
- Variation de phase : réorganisation génétique permettant d'activer ou non certains gènes afin d'adapter certains traits phénotypiques aux variations environnementales
- Infection abortive et système toxine-antitoxine : la propagation virale est bloquée par le suicide de l'hôte lors de l'infection
- Dégradation du génome viral par des nucléases bactériennes : systèmes de restriction-modification et systèmes CRISPR-Cas

Toutefois, dans le cadre de l'utilisation thérapeutique des bactériophages, il a été observé l'apparition de bactéries (*A. baumannii*) résistantes au cocktail de phages utilisé. Même si ce n'est pas censé amener à une impasse thérapeutique, cela oblige à rechercher de nouvelles souches actives. (48)



## **2. IMPACT DE LA PHAGOTHERAPIE SUR L'ANTIBIORESISTANCE**

Le développement de la phagothérapie pourrait permettre de diminuer la pression de sélection exercée par les antibiotiques sur les populations bactériennes, que ce soit par une diminution du recours à ces derniers ou par une action synergique des deux thérapeutiques. La dégradation du biofilm par les bactériophages peut notamment améliorer la diffusion des antibiotiques jusqu'aux bactéries tout en augmentant la sensibilité grâce à l'apport accru d'oxygène et de nutriments au travers de la matrice. Il semble donc nécessaire de d'administrer les phages avant les antibiotiques, en particulier dans le cas d'infections impliquant la production de biofilm.

Il a également été montré que l'administration de phages peut modifier le profil de résistance de la bactérie cible, comme la re-sensibilisation à des antibiotiques auxquels elle était initialement résistante. En se fixant à la surface des bactéries, il a en effet été observé que les phages pouvaient notamment bloquer certains mécanismes de résistance bactérienne, comme les pompes d'efflux. (50) Cette évolution de l'antibiogramme, tout comme la diminution de la virulence de la bactérie, peuvent également être observées dans le cas d'apparition de résistances aux phages. Si ces modifications semblent être favorables aux patients, elles nécessitent toutefois de surveiller l'évolution de la souche pathogène afin d'adapter au mieux la prise en charge de l'infection. (39)

### **D. POSOLOGIE**

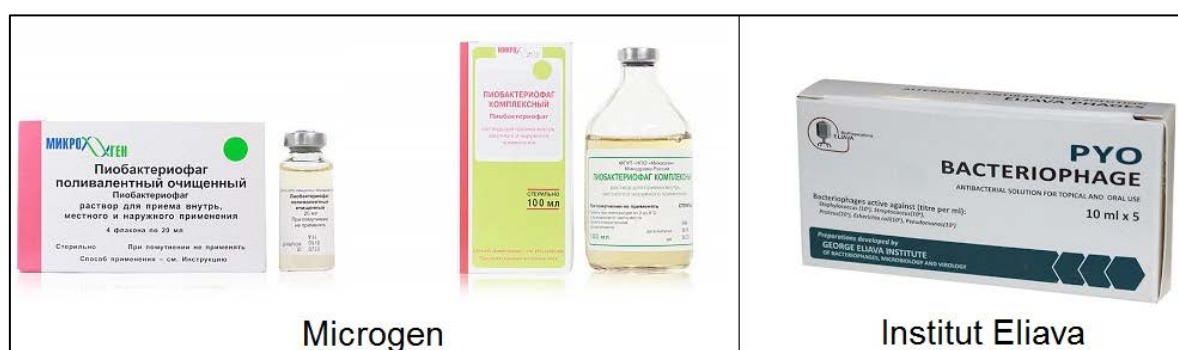
La phagothérapie étant principalement utilisée de façon compassionnelle, il n'y a pas d'études de doses, de rythmes ou de durées de traitements optimaux dans la littérature. L'amplification des phages dépendant à la fois de facteurs propres au patient et de facteurs propres à la bactérie cible, leur pharmacocinétique *in vivo* est difficilement prédictible. Théoriquement une seule administration est censée suffire, mais en pratique la répétition est souvent la règle, notamment dans le cas de formes per os en Géorgie. Pour déterminer la dose à administrer il faudrait pouvoir connaître le seuil de réplication au cas par cas, en fonction de nombreux facteurs tels que le site d'infection et la bactérie concernée. Une concentration minimale de  $10^5$  PFU/ml (Plaques-Forming Unit) semble néanmoins être admise pour une préparation de phagothérapie. (38)

## E. COMPOSITION : SUR-MESURE OU PRET-A-PORTER ?

Du fait de la grande spécificité des bactériophages, il est conseillé d'en associer plusieurs afin d'augmenter le spectre d'action du traitement pour lutter efficacement contre l'infection tout en limitant le risque d'émergence de résistance. On parle alors de cocktails de phages, qui peuvent être soit des mélanges standards, soit des mélanges sur-mesure.

L'approche « sur-mesure » permet de combiner plusieurs phages qui auront fait preuve de leur efficacité sur un phagogramme effectué sur la souche bactérienne pathogène. Le mélange est alors généralement réalisé à la pharmacie hospitalière en combinant des phages sélectionnés avant l'administration au patient.

L'approche « prêt à porter » du cocktail standard présente l'avantage de pouvoir être utilisée en urgence, de façon probabiliste. Si ces mélanges pourraient s'apparenter à des spécialités pharmaceutiques, l'étude des préparations produites en Géorgie montre toutefois qu'elles sont issues de cultures bactériennes qui ont progressivement dû être modifiées pour s'adapter à l'évolution des bactéries pathogènes. Bien qu'originellement identique, la composition de Pyophage® (aussi appelé « Pyobacteriophage ») a ainsi évolué différemment en Géorgie (Institut Eliava) et en Russie. (52) A noter qu'en Russie, le consortium Microgen regroupe plusieurs entreprises autrefois indépendantes qui produisent des préparations portant le même nom, mais de compositions pas identiques. La figure 20 ci-dessous illustre les différentes présentations de Pyophage® disponibles.



*Figure 20 : Présentation de différentes préparations dénommées « Pyophage »*

## **F. VOIES D'ADMINISTRATION**

La voie orale semble être une voie d'administration possible, du fait de sa simplicité d'emploi et de l'absence d'effets indésirables observés, toutefois l'acidité gastrique tend à détruire les bactériophages. Afin de les protéger, il est notamment envisageable d'alcaliniser l'estomac (au risque de favoriser l'émergence d'infections opportunistes) ou de développer un vecteur gastro-résistant. Des études complémentaires à ce sujet seraient nécessaires afin de trouver la meilleure stratégie d'administration orale. (50) Mais au vu de la difficulté à établir les doses à utiliser pour obtenir une activité suffisante sur les cibles bactériennes, le Comité Spécifique Spécialisé Temporaire de l'ANSM a voté à l'unanimité contre l'utilisation de cette voie, notamment dans les infections ostéoarticulaires. (53)

L'administration parentérale conduit à une diffusion systémique rapide des bactériophages. Ils se retrouvent en plus séquestrés par la rate et le foie et sont, en l'absence de bactérie cible, rapidement éliminés. Il est donc nécessaire d'administrer beaucoup de phages afin d'obtenir une concentration efficace sur le site de l'infection malgré cela. Il semble toutefois possible d'augmenter la persistance et la virulence des phages dans l'organisme par une technique de « passage en série ». Il s'agit alors de récupérer les phages circulants dans l'organisme 7h après l'injection, puis de les mettre en contact *in vitro* avec leur bactérie hôte avant de les ré-injecter au patient. La répétition de cet enchaînement sélectionnerait les phages les plus persistants et les plus virulents, jusqu'à atteindre un seuil au bout de neuf enchaînements. Un schéma adaptant le nombre et la fréquence des administrations en fonction de la persistance des bactériophages utilisés semble toutefois plus facile à mettre en œuvre. Cette voie nécessite par ailleurs de faire appel à des préparations de phages particulièrement pures vis-à-vis des débris bactériens créés lors de la production de la préparation thérapeutique. (50)

L'inhalation de bactériophages lyophilisés semble être une technique efficace et leur nébulisation peut être une technique envisageable. Si certaines équipes ont déjà validé des processus de vectorisation afin d'administrer les phages sous forme de poudre destinés à une déposition bronchique, encore trop peu de cas ont été publiés pour pouvoir évaluer la technique d'inhalation la plus adaptée pour chaque phage. (50,59)

Afin d'amener les phages immédiatement au contact des bactéries, la voie locale paraît être une solution d'administration de choix : facile d'utilisation, sûre et efficace. Des mélanges dans des crèmes ou gels peuvent être envisagés, ainsi que l'imprégnation de compresses à poser sur la plaie, sous réserve de stabilité et de diffusion satisfaisante. Des rares cas de réactions graves ont pu être rapportés en cas d'administrations répétées, mais les techniques actuelles de filtration semblent en maîtriser le risque. (50)

L'injection locale de bactériophages, ou l'inondation du champ per-opératoire, semble être une technique d'administration particulièrement pertinente lors de la reprise chirurgicale d'infections ostéoarticulaires. C'est via cette voie in situ que le CRIOGO souhaite traiter des patients au CHU de Rennes.

## **VI. UTILISATIONS ET ETUDES DE LA PHAGOTHERAPIE**

### **A. ETUDES IN VIVO CHEZ L'ANIMAL**

De nombreux travaux chez l'animal ont permis de conclure à l'efficacité des phages dans différents types d'infections.

On retrouve ainsi de nombreux travaux montrant l'intérêt de la phagothérapie dans diverses infections pulmonaires chez l'animal, listés dans l'Annexe 5. Par exemple, l'instillation directe d'une solution de phages dans les voies respiratoires s'est montrée capable de sauver 100 % des animaux infectés avec un inoculum mortel d'*E. coli* ou de *P. aeruginosa*. Dans les différentes études, les traitements étaient administrés par voie locale (intranasale, intratrachéale ou par aérosol), mais aussi par voie systémique (intrapéritonéale ou intramusculaire). Du fait de la vascularisation très importante des poumons, la voie systémique semble efficace dans ces indications, même s'il peut être nécessaire de majorer les doses administrées. Bien qu'il faille garder à l'esprit que les modèles animaux reproduisent des infections aiguës ou subaiguës, et non pas un poumon pathologique similaire à ceux des patients atteints de mucoviscidose, les données de tolérance recueillies semblent bonnes dès lors que les préparations sont suffisamment purifiées. (39,59)

Plusieurs études pré-cliniques ont également montré l'intérêt de la phagothérapie dans les infections ostéo-articulaires, pour lesquelles il est retrouvé beaucoup de bactéries

multirésistantes et d'infections chroniques. Ainsi, chez des rongeurs, les phages se sont avérés efficaces dans deux études portant sur l'ostéomyélite et dans une étude traitant l'infection de prothèse articulaire. L'association bactériophage-antibiotique se révèle d'ailleurs plus efficace et plus rapide que l'administration seule de phages ou d'antibiotique. Le Tableau VI ci-dessous résume les études concernées. (63)

Overview of Animal Studies Utilizing Phage to Treat Orthopedic Infections					
Author	Animal and Condition	Bacteria and Inoculation Route	Phage and Concentration Delivered (PFU/ml)	Design	Key Findings
Yilmaz et al <sup>47</sup>	Sprague-Dawley Albino Rat	MRSA	Sb-1 (MRSA) $1 \times 10^8$	OM model in 48 rats, each for MRSA and <i>P. aeruginosa</i>	MRSA infection: Combination therapy cleared biofilm, and lead to 90% reduction in CFU compared to control ( $p = 0.004$ )
	OM	<i>P. aeruginosa</i>	PAT14 ( <i>P. aeruginosa</i> ) $1 \times 10^8$	Each group subdivided into four groups: No treatment, antibiotic, phage, and combination	<i>P. aeruginosa</i> infection: Significant reduction in CFU in all treatments; combination therapy most effective with 88% reduction ( $p < 0.001$ ). No significant change in biofilm thickness
		Intramedullary injection		After confirmation of infection (14 days), treatment administered: Phage therapy 3 consecutive days, antibiotics 14 days Phage delivered via intralesional injection 0.1 mL/day for 3 days	
Kishor et al <sup>48</sup>	Rabbit	MRSA	Homemade cocktail $5 \times 10^6$	OM induced via inoculation of distal femur using clinical isolates of MRSA	Group B: Wound swabs became culture negative after 4th dose; minimal radiographic OM changes
	OM	Intramedullary injection		Phage therapy utilized 3 weeks after infection (group C), 6 weeks after infection (group B), or no therapy (group A) Phage delivered via intralesional injection 15 $\mu$ L every 48 h for 1 week	Group C: Wound swabs culture negative 2 weeks after therapy, wound healed, persistent radiographic OM changes
Kaur et al <sup>49</sup>	BALB/c mouse	MRSA (43300)	MR-5 $1 \times 10^9$	Retrograde femoral wire inserted into tibia, and canal inoculated with MRSA	Combination therapy resulted in the most significant decrease in initial bacterial adherence compared to other groups, and significantly less bacterial burden on adjoining tissue prior to clearance of infection
	PJI	Intramedullary injection		Phage, antibiotic, or combination was mixed with HPMC gel and coated onto wire. Naked wire and just HPMC were controls Mice were sacrificed at days 1,3,5,7,10,15, 20 and outcomes were measured	Combination therapy led to faster restoration of locomotion

OM, osteomyelitis; PJI, prosthetic joint infection; HPMC, hydroxypropylmethylcellulose; MRSA, methicillin resistant *S. aureus*.

Tableau VI : Traitement des infections orthopédiques chez l'animal (Akanda et al, 2018)

## B. UTILISATION A DES FINS THERAPEUTIQUES

### 1. USAGES COMPASSIONNELS

Faute de possibilité d'inclusion dans des essais cliniques, il est possible pour le thérapeute, en accord avec la Convention d'Helsinki, de recourir à l'option thérapeutique qu'il estimera efficace pour les patients pour lesquels toutes les thérapeutiques reconnues ont échoué. Ainsi, de nombreux cas ont été rapportés d'usages compassionnels de bactériophages chez des patients jusqu'alors en échec de traitement. On retrouve alors des publications faisant état de la sécurité et de l'efficacité des phages dans un large spectre d'indications, aiguës ou chroniques (gastro-intestinale, urogénitale, respiratoire, ORL, ostéoarticulaire, brûlure, septicémie). (50) Quelques cas d'utilisations, non exhaustifs, sont rapportés ci-après.

### Infections ostéoarticulaires

La phagothérapie a été utilisée très rapidement dans les infections ostéoarticulaires, que ce soit dans les pays de l'Europe de l'Est ou en Amérique du Nord. On retrouve également des publications françaises en faveur de l'utilisation des phages dans les infections ostéoarticulaires dès 1979. Plus récemment, des publications lyonnaises rapportent le cas de patients atteints d'ostéomyélite et d'infections sur prothèses ostéoarticulaires traités avec succès par l'administration locale de phages. (64,65) En 2019, l'Hôpital de Villeneuve Saint Georges partage ses résultats positifs concernant 15 patients traités par phages entre 2006 et 2018, en combinaison à un traitement antibiotique. Un modèle expérimental a par ailleurs confirmé l'intérêt des bactériophages pour dissoudre les biofilms et ainsi augmenter l'efficacité des antibiotiques, en particulier dans le cas d'infection par *Staphylococcus* sp. (50) La liste des utilisations compassionnelles de la phagothérapie rapportées dans les infections ostéoarticulaires est disponible en Annexe 6.

### Infection pulmonaire

Après la transplantation pulmonaire, la patiente atteinte de mucoviscidose avait contracté une souche de *Mycobacterium abscessus* résistante à tous les antibiotiques testés. Dans une collection de plus de 10 000 phages actifs contre *Mycobacterium smegmatis*, 3 ont été identifiés actifs sur la souche pathogène. Deux d'entre eux ont subi des modifications génétiques afin d'augmenter leur pouvoir lytique, initialement insuffisant. Ces trois phages ont été administrés ensemble à forte dose ( $10^9$  phages) en intraveineux et en local, sur les lésions cutanées. Toutes les lésions ont régressé ou disparu et la capacité respiratoire s'est nettement améliorée. Les dosages du sérum de la patiente ont montré des titres de phages élevés (jusqu'à  $10^9$  PFU/ml), signe d'une amplification virale efficace. (48)

### Pancréatite

L'injection intraveineuse et sous-cutanée de bactériophages spécifiques d'*Acinetobacter baumannii* aurait permis à un patient diabétique américain de sortir du coma, avant de quitter l'hôpital et de reprendre le travail. L'absence de témoin ainsi que l'ajout vers la fin d'un nouvel antibiotique (minocycline) ne permettent toutefois pas de prouver formellement le rôle de la phagothérapie dans le traitement de ce patient. (48)

L'accumulation des cas rapportés ne suffit certes pas à prouver l'efficacité de la phagothérapie, mais leur publication permet d'ouvrir la voie à des essais cliniques robustes tout en documentant leur profil de tolérance. En parallèle de l'évaluation de l'efficacité et de la sécurité de la phagothérapie, ces essais devraient permettre de documenter davantage l'activité des bactériophages après leur administration, notamment concernant leur amplification et leur sensibilité.

## 2. ESSAIS CLINIQUES

Il n'existe que peu d'essais cliniques contrôlés chez l'Homme hormis ceux des pays d'Europe de l'Est, dont les plus majeurs sont listés en Annexe 7, souvent anciens et ne répondant pas aux standards occidentaux actuels de la recherche clinique.

Malgré l'intérêt croissant que suscite la phagothérapie, très peu d'essais cliniques ont pour l'instant été menés à terme, du fait notamment des problèmes de réglementation encadrant la production de médicaments bactériophagiques. Le Tableau VII ci-dessous récapitule les rares études cliniques interventionnelles répertoriées sur ClinicalTrials.gov relatives à la phagothérapie, listées dans l'Annexe 8.

	Statut inconnu	Etude annulée	Recrutement			Etude arrêtée	Etude terminée
			Non commencé	En cours	Terminé		
Etude de tolérance							USA
Infection pulmonaire					Russie		France (MUCOPHAGE)*
Infection urinaire			USA	USA			Géorgie
Infections digestives				USA		Bangladesh*	USA*
Infections diverses	Pologne						
Ulcères (ulcère de jambe ou pied diabétique)		Royaume-Uni	France (PHAGOPIED)				USA*
Brûlure			Australie			Belgique, France, Suisse (PHAGOBURN)*	
HIV		Canada					
Déficit immunitaire primaire	USA						
Cancer						USA	USA

\* études pour lesquelles les résultats publiés ont été trouvés

*Tableau VII : Etudes cliniques interventionnelles concernant la phagothérapie déclarées sur ClinicalTrial.gov en juillet 2020*

## **a. Essais terminés**

### Infections pulmonaires

L'essai Mucophage, dirigé par l'institut Pasteur, visait à évaluer l'effet des bactériophages sur les bactéries *Pseudomonas aeruginosa* multirésistantes présentes dans les expectorations de personnes atteintes de mucoviscidose. Cette étude a permis de prouver l'efficacité d'un cocktail de dix phages, non sélectionnés spécifiquement, sur des cultures de souches prélevées chez les patients. Les phages n'ayant cependant pas été administrés, aucun critère clinique n'a pu être évalué. (66)

### Infections digestives

Une étude américaine a évalué l'efficacité d'une solution de bactériophages anti-*Escherichia coli* prise tous les jours pendant 28 jours, en cross-over en double aveugle contre placebo. Les résultats ont montré une réduction de la charge bactérienne fécale en *E. coli*, sans perturbation globale du microbiote intestinal. (67)

### Ulcères veineux de jambe

Dans une étude de phase I réalisée aux USA, la sécurité de l'utilisation de phages contre *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* et *Escherichia coli* a été évaluée chez des patients souffrant d'ulcère veineux de la jambe. Selon la randomisation, les patients recevaient pendant douze semaines soit une solution saline soit une préparation de phages à appliquer localement. Aucune différence significative, qualitative ou quantitative, n'a été observée entre les deux groupes. (68)

### Infections urinaires

Un essai clinique réalisé en Géorgie a évalué l'efficacité de la solution Pyobactériophage® contre les infections urinaires chez des patients devant subir une résection transurétrale de la prostate. En double aveugle, le design de l'étude a comparé l'efficacité de la phagothérapie par rapport à un placebo et à une antibiothérapie adaptée. Aucune publication des résultats n'a été retrouvée. (69)

### Etude de tolérance

Dans un essai randomisé contre placebo mené aux Etats-Unis, la sécurité de l'administration cutanée d'un mélange de trois bactériophages ciblant *Staphylococcus aureus* a été évaluée à



deux concentrations différentes, chez des sujets sains. Aucun résultat n'a été retrouvé dans la littérature. (essai NCT02757755)

#### Cancer cutané

Un essai américain a évalué une lotion dans la prévention de la récurrence du cancer cutané chez des patients greffés rénaux. La lotion contient une endonucléase de bactériophage T4 encapsulée dans des liposomes, capables de pénétrer les cellules cutanées et d'y réparer les dommages à l'ADN causés par les UV. Il s'agit donc d'utiliser une enzyme phagique, et non le phage en entier, pour une indication non infectieuse. Aucune publication des résultats n'a cependant été retrouvée dans la littérature. (essai NCT00089180)

#### Infection ORL

Un essai randomisé de phase I/II au Royaume-Uni, non référencé dans ClinicalTrials, a traité avec succès contre placebo des otites externes à *P. aeruginosa* multi-résistants. Aucun événement indésirable lié au traitement n'a été signalé. (70)

### **b. Essais arrêtés**

Les essais « arrêtés » sont définis par ClinicalTrials comme ayant arrêté prématurément et définitivement leur recrutement. Les participants ne sont plus traités ni examinés.

#### Brûlure

Phagoburn est un essai multicentrique européen en double aveugle, contre traitement standard (sulfadiazine argentique), qui a cherché à évaluer deux cocktails, de 12 et 13 phages différents, dans le traitement des infections cutanées causées par *E. coli* et *P. aeruginosa* chez les patients brûlés. Coordonné par le Service de santé des Armées (Ministère français de la Défense), il a été conduit dans les services des grands brûlés de l'Hôpital Militaire Percy (France), l'Hôpital Reine Astrid (Belgique) et le CHU Vaudois (Suisse) en collaboration avec une société de biotechnologie. Ce premier essai clinique répondant aux standards de fabrication européens fut un échec. Les délais imposés par la logistique et les aspects réglementaires en sont probablement en partie responsable puisqu'ils ont entraîné la diminution de la concentration de bactériophages à 100 PFU/ml, soit bien en dessous du seuil recommandé de  $10^5$  PFU/ml (38). La fabrication et libération d'un lot de produits expérimentaux a finalement pris 20 mois et a absorbé la plus grande partie du

budget de l'étude. De plus, les médecins étaient réticents à inclure les patients dans l'étude du fait de la spécificité de chaque cocktail de phages à une seule des multiples espèces bactériennes connues pour infecter ou coloniser les brûlures, les deux cocktails ne pouvant d'ailleurs pas être appliqués simultanément. (48,51,71)

#### Infections digestives

Un essai réalisé au Bangladesh a échoué à montrer l'efficacité des bactériophages dans le traitement des diarrhées bactériennes aiguës. Les phages administrés ne se seraient pas répliqués suffisamment, possiblement à cause d'un seuil de réplication non atteint. (72)

#### ***c. Essais en cours ou en projet***

La modulation du microbiote digestif des patients souffrants de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, comme la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique, semble être un autre axe de développement pertinent pour la phagothérapie. Une étude a été lancée aux USA en ce sens, visant des souches entéro-aggrégatives d'*E. coli* chez des patients atteints de la maladie de Crohn. Le recrutement des patients est toujours en cours. (39,50)

En Europe, aucune étude est en cours. L'essai clinique français PHAGOPIED, notamment, attend de pouvoir débiter le recrutement des patients dans le traitement de l'ulcère du pied diabétique infecté à *Staphylococcus aureus*.

D'autres essais, pas encore référencés sur ClinicalTrials.gov ou ClinicalTrialsRegister.eu, devraient également voir le jour en France dès que les autorités sanitaires valideront la conformité des traitements expérimentaux aux Bonnes Pratiques de Fabrication.

Dans le domaine des infections ostéoarticulaires l'essai Phagos est attendu dans le traitement des infections de prothèses à *S. aureus*. L'essai Phosa devrait s'intéresser au traitement des infections ostéoarticulaires à *S. aureus* et *S. epidermidis*.

Des essais devraient également voir le jour dans le domaine des infections pulmonaires. L'étude Pneumophage doit ainsi prouver le concept d'un traitement par phages inhalés dans le traitement des infections respiratoires à *P. aeruginosa*. Après Mucophage, RéapyoPhage devrait s'intéresser au traitement des infections à *Pseudomonas aeruginosa* multirésistantes chez les patients en réanimation.

### **3. AUTRES PERSPECTIVES DE RECHERCHE BIOMEDICALE**

La grande sélectivité des bactériophages laisse espérer la possibilité de pouvoir décontaminer sélectivement le tube digestif pour se débarrasser du portage intestinal de bactéries multi-résistantes (BMR), afin de réduire la morbi-mortalité associée ainsi que la charge en soins résultant de la mise en place de mesures d'hygiène renforcées.

Bien qu'insuffisamment caractérisés, les bactériophages se retrouvent également transférés dans le cas des greffes fécales, ce qui fait partie des freins à son utilisation. (40) Pourtant, la conservation de l'efficacité des transplantations de microbiote fécal une fois dépourvu de bactéries semble montrer le rôle des phages dans cette thérapeutique, qui sera donc peut être amenée à évoluer. (50)

Les progrès de la biologie moléculaire et de la bio-ingénierie permettront probablement dans un futur proche d'utiliser des phages génétiquement modifiés combinant certaines caractéristiques d'intérêts, comme la spécificité d'un phage et la virulence d'un autre. (39) La société Biosciences, notamment, aurait des projets de développement de bactériophages répondant à la définition de thérapie génique. (53)

L'utilisation de molécules phagiques semble être également une voie prometteuse. Les lysines, produites à la fin du cycle infectieux, provoquent la lyse bactérienne en hydrolysant le peptidoglycane de la paroi. Elles peuvent ainsi lyser une culture de *Staphylococcus aureus* en quelques secondes. Elles pourraient donc être envisagées comme traitement, sans avoir à administrer l'intégralité du phage. (42)

Les bactériophages pourraient également être utilisés dans des indications non infectieuses, en servant par exemple de nanovecteurs pour cibler les cellules tumorales et y délivrer *in situ* le traitement anti-cancéreux. (42)

#### 4. TOLERANCE

Bien qu'il y ait encore peu d'études publiées répondant aux standards occidentaux actuels, de nombreux rapports de l'utilisation de la phagothérapie ont été faits depuis sa découverte il y a plus d'un siècle et les données de sécurité qui peuvent en être extraites sont extrêmement rassurantes. (73) Les bactériophages faisant partie du microbiote intestinal, cela pouvait sembler intuitif concernant l'administration par voie orale mais cela a également pu être observé lors d'administrations par voie intraveineuse, notamment en France au début de son utilisation. Le risque de choc anaphylactique, souvent cité, semble extrêmement faible dès lors que la préparation est suffisamment purifiée. (74) Les quelques effets secondaires rapportés seraient donc rares, bénins et transitoires. Les principaux, gastro-intestinaux ou allergiques, apparaîtraient en effet chez moins de 0.5% des patients. Des cas de fièvre ou de maux de tête peuvent également survenir. (68,75,76)

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'apparition de tels effets indésirables. Au-delà d'une réaction causée directement par les phages sur l'organisme, la possibilité d'une réaction aux produits de la lyse bactérienne n'est en effet pas à exclure. Les études cliniques à venir devraient permettre de définir plus précisément les mécanismes en jeu, en vérifiant également qu'il ne s'agit pas d'une manifestation de la maladie elle-même. Du fait de leur spécificité d'action, il est néanmoins attendu que les bactériophages provoquent moins de troubles digestifs que les antibiotiques, qui provoquent une dysbiose importante. A noter que dans le cas d'utilisation d'antibiotiques, l'impact des produits issus de la destruction des bactéries est assez peu craint. (74)

### **C. UTILISATION A DES FINS NON THERAPEUTIQUES CHEZ L'HOMME**

Aux Etats-Unis, une préparation commerciale (Listex®) a obtenu une AMM par la FDA pour éradiquer l'espèce *Listeria* dans les produits issus de l'industrie laitière. Il y est également commercialisé des spécialités à usage vétérinaire contre les dermites du chien, à base de lysat de phages dirigés contre *Staphylococcus intermedius* (Staphage Lysate® des laboratoires Demont). D'autres produits sont prioritairement destinés aux animaux d'élevage, tels que PLSV-1™ (contre les salmonelles) ou INT-401™ (contre *Clostridium perfringens*) du laboratoire Intralytix utilisés chez les volailles. (38,77)

En Géorgie des solutions de bactériophages sont utilisées en pulvérisation cutanée pour l'asepsie préopératoire.

D'autres utilisations chez l'Homme sont aussi imaginées, comme la possibilité d'utiliser les bactériophages à des fins diagnostiques, pour identifier rapidement l'espèce et la souche bactérienne pathogène, en même temps qu'un traitement efficace. (38) Aux Etats-Unis, des bactériophages sont utilisés dans l'industrie alimentaire pour détecter la présence d'organismes pathogènes tels que *Listeria monocytogenes*, plus efficacement que les outils de détection conventionnels. (42)

## **PARTIE 3**

-

### **LA PHARMACOTECHNIQUE DU CHU DE RENNES**

#### **FACE A CES NOUVELLES THERAPIES**

Bien que différents à plusieurs égards, l'intérêt et le développement croissants des MTI et bactériophages imposent de repenser les équipements et procédures de la pharmacotechnie du CHU de Rennes afin de pouvoir préparer ces médicaments issus du vivant.

## I. LES MTI ET LES PHAGES VIS-A-VIS DU CIRCUIT EN PUI

Si aucune contrainte réglementaire n'encadre les préparations de bactériophages, ceux-ci peuvent toutefois s'apparenter aux MTI. La nature virale des bactériophages, même naturels, doit en effet être prise en compte lors de leur utilisation et en particulier concernant leur préparation. Toutefois comme le montre le Tableau VIII ci-dessous, les MTI ne forment pas une famille de médicaments uniforme, tant du point de vue du stockage que de la péremption ou des modalités de préparation à réaliser à la PUI.

TYPE	SPECIALITE	CONSERVATION	OPERATION
Médicament de thérapie génique	Glybera®	18 mois <b>entre -25°C et -15°C</b> Après décongélation : - Flacon : 8h entre 2 et 8°C - Seringue : 8h < 25°C	Réception, stockage Décongélation des flacons entre 15 et 25°C en 30-45 min Préparation dose en plusieurs seringues Mise à disposition
	Imlygic®	4 ans <b>entre -90°C et -70°C</b> Après décongélation : - Flacon à 10 <sup>8</sup> UFP/ml 48h à 5°C - Flacon à 10 <sup>6</sup> UFP/ml 12h à 5°C	Réception, stockage Décongélation des flacons entre 20 et environ 30 min Préparation seringues / lésions (volume < 1 à 4 ml) Mise à disposition
	Strimvelis®	6h <b>entre 15°C et 30°C</b>	Prélèvement greffons secours et pour traitement Production (modification génétique des cellules CD34+) Conditionnement Réception et mise à disposition
Médicament de thérapie cellulaire somatique	Provenge®	18h <b>entre 2 et 8°C</b> 3h à 25°C Ne pas réfrigérer ni congeler	Leucaphérèse 3j avant Production (activation PAP-GM-CSF) Conditionnement Réception et mise à disposition
	Zalmovix®	18 mois à <b>-180°C</b> Après décongélation : 2h entre 15 et 25°C	Prélèvement DLI Production (modification génétique de LT) Conditionnement Réception Décongélation en bain marie à 37°C Mise à disposition dont vérification identité ++
Produit issu de l'ingénierie tissulaire	Chondroelect®	48h <b>entre 15 et 25°C</b> Ne pas réfrigérer ni congeler	Prélèvement des cellules Production (culture) et conditionnement Réception et mise à disposition
	Holoclar®	36h <b>entre 15 et 25°C</b> Ne pas réfrigérer ni congeler Péremption 15 min après déconditionnement	Prélèvement des cellules Production (culture) et conditionnement Réception et mise à disposition
MTI combiné	Maci®	6j <b>≤ 37°C</b> Ne pas réfrigérer ni congeler	Prélèvement des cellules Production (culture et association au DM) Conditionnement Réception et mise à disposition

*Tableau VIII : Différentes modalités de conservation et de préparation des MTI  
(Dossier du CNHIM, 2017, XXXVIII, 1)*

La SFPO recommande, a minima, le port systématique de gants pour toutes les étapes de la prise en charge des MTI, depuis leur réception à leur transport dans le service de soin. (28)

## A. RECEPTION

Les médicaments OGM doivent être conditionnés dans un triple emballage pour garantir l'intégrité du produit et la protection de l'environnement lors du transport. Comme illustré dans la figure 21, le récipient primaire, étanche, contient le produit OGM. Le secondaire, étanche également, doit être résistant aux chocs. Le tout est placé dans un emballage tertiaire robuste qui porte l'étiquetage respectant la réglementation concernant le transport des matières infectieuses, conformément au Tableau IX.

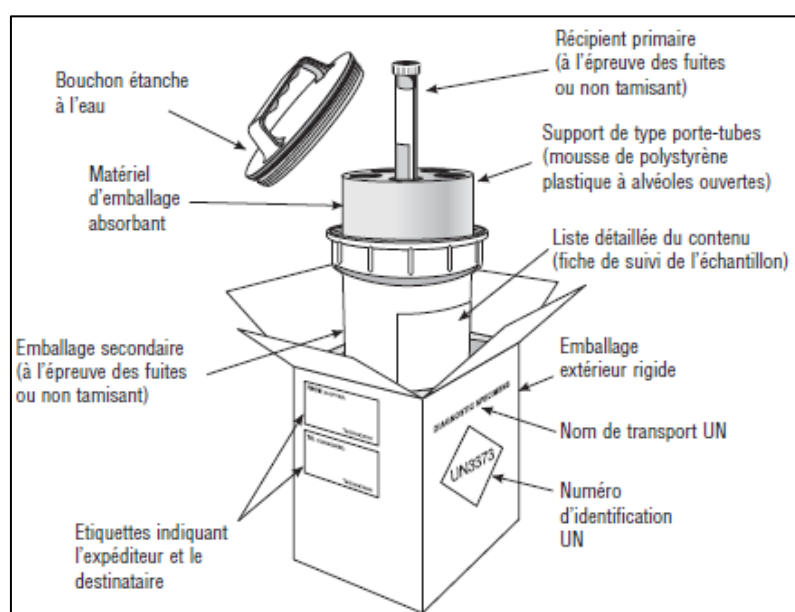




Figure 21: Système à triple emballage pour le transport des médicaments OGM (Manuel de sécurité biologique en laboratoire, OMS, 2005)

Catégorie	Définition	Numéro ONU <sup>a</sup>	Instructions d'emballage	Étiquetage spécifique	Désignation officielle de transport
A	Matière infectieuse qui peut provoquer une invalidité permanente ou une maladie mortelle ou potentiellement mortelle chez l'homme	ONU 2814	P620 <sup>b</sup>		« Matière infectieuse pour l'homme »
B	Matière infectieuse ne répondant pas aux critères de classification dans la catégorie A	ONU 3373	P650 <sup>c</sup>		« Matière biologique, catégorie B »

<sup>a</sup> Numéro ONU : numéro d'identification internationale des marchandises dangereuses.  
<sup>b</sup> P620 : indicateur garantissant que les emballages ont passé avec succès les épreuves requises de chutes libres d'une hauteur de 9 m, un test de perforation et un test de pression interne à 95 kPa.  
<sup>c</sup> P650 : indicateur garantissant que les emballages ont passé avec succès les épreuves requises de chutes libres d'une hauteur de 1,20 m et un test de pression interne à 95 kPa

Tableau IX : Caractéristiques du système d'emballage des matières infectieuses (Pignard et al, 2015)



Les bactériophages n'étant pas infectieux pour l'homme, ils sont classés en groupe 1 concernant les agents biologiques, conformément à la définition de l'article R4421-3 du Code du travail (78), illustrée par le Tableau X ci-dessous. Aucune nomenclature ONU n'est donc nécessaire pour leur transport. (79)

Groupe Critère	1	2	3	4
Pathogène chez l'homme	Non	Oui probable	Oui Maladie grave	Oui Maladie très grave
Dangereux pour l'opérateur	Sans objet	Oui Modérément	Oui Risque élevé	Oui Risque très élevé
Propagation	Sans objet	Peu probable	Possible	Risque élevé
Existence d'une prophylaxie ou d'un traitement	Sans objet	Oui	Oui généralement	Non
Exemples	<i>B. subtilis</i> <i>E. coli</i> non pathogène	Virus de la rougeole <i>Clostridium tetani</i>	VIH, VHB <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Virus Ebola Virus de la variole

Tableau X : Groupes de risques des agents biologiques naturels (Bleux et al., 2012)

Ces traitements étant commandés voire produits pour un patient spécifié, un double contrôle doit en particulier être réalisé à la réception afin de vérifier l'identité du patient sur le produit, les documents de réception et le certificat de libération du médicament. Le respect des conditions liées au maintien de la température lors du transport doit également être vérifié et tracé à réception.

Différents modes de conservation peuvent être nécessaire lors du transport de ces produits : température ambiante ; température réfrigérée avec un système de froid actif ou d'emballages isothermes avec production de froid passif (plaques eutectiques) ; température négative à l'aide de conteneur contenant de la carboglace ou de l'azote.

Les conteneurs comme le Dry Shipper, illustré par la figure 22 ci-contre, permettent en effet la conservation de cellules à une température inférieure à -150°C. L'azote liquide étant adsorbée par une matière poreuse, la manipulation de ce conteneur est facilitée et le stockage ne nécessite qu'un endroit ventilé d'accès sécurisé.



Figure 22 : Dry Shipper et son conteneur de transport

## B. STOCKAGE

Le stockage doit respecter les conditions de conservation du produit vis-à-vis de la température. Selon les médicaments utilisés la PUI doit ainsi disposer d'un réfrigérateur, d'un congélateur ou d'une enceinte de cryogénie. Ces équipements devront faire l'objet d'une qualification régulière et permettre le stockage de ces médicaments dans un emplacement identifié, séparé des médicaments conventionnels. Une alternative de secours devra également être prévue en cas de défaillance de l'équipement de stockage. Dans le cas de médicaments OGM le symbole « risque biologique », illustré en figure 23, doit également être apposé. (28) Afin de limiter tout danger, il semble pertinent de réaliser la même chose pour le stockage des bactériophages.



*Figure 23 : Signalétique  
« risque biologique »  
(INRS)*

Les médicaments issus de cellules, comme les CAR-T cells, peuvent en principe être conservés pendant des années dans une cuve de cryoconservation en azote gazeux ou liquide. Cela nécessite toutefois la création d'une salle de cryogénie dans les locaux de la pharmacie ou l'établissement d'une convention, validée par l'ARS, afin de permettre la mise à disposition d'une cuve par une unité de thérapie cellulaire (UTC). Il est également possible pour la PUI, en accord avec l'ARS, d'annexer une partie des locaux de l'UTC. Il faut alors organiser le circuit pour que le pharmacien hospitalier puisse accéder à ces locaux afin d'effectuer la réception et la libération du médicament.

Une salle de cryogénie nécessite de nombreux autres équipements afin de garantir la sécurité du personnel et du produit conservé. La cuve de stockage doit en effet être reliée à un système de remplissage automatique depuis une cuve de remplissage. La température et le niveau de remplissage de la cuve en azote doit également faire l'objet d'un monitoring continu, accessible à distance et relié à des alarmes via un système de supervision. Les paramètres de la salle doivent également être suivis, comme la température, le taux d'oxygène et le débit d'extraction. Le personnel manipulant l'azote doit y être formé et habilité, ainsi que bénéficier d'équipements de protection individuelle (EPI) adaptés. D'autres éléments de sécurité sont listés dans le Tableau XI ci-après. (80)

<b><u>Sécurité du personnel</u></b>	<b><u>Sécurité du produit</u></b>
Accès contrôlé	Surveillance du niveau d'azote
Alarmes sonores et visuelles	Valve de pression ou de niveau hors limite
Alarme sonore si $O_2 < 20\%$	Valve de sécurité pour sections de ligne sous vide
Recyclage de l'air à 20 vol/h si $O_2 < 20\%$	Remplissage automatique du réservoir
Recyclage standard de l'air à 6 vol/h	Niveaux d'azote minimum et maximum
Remplissage automatique de cuve	Pré-alarme et alarme de température
Arrêt automatique d'azote si $O_2 < 18\%$	Valve d'alimentation en azote de la cuve
Dispositifs d'urgence	Alimentation électrique de secours

*Tableau XI : Outils de sécurité pour le personnel et le produit cryoconservé (Lecchi et al, 2016)*

Si la PUI ne dispose pas de cuve de stockage azote et que la stabilité du produit le permet, le MTI peut être conservé quelques jours dans le conteneur de transport jusqu'à son administration, conformément au certificat de qualification fourni par l'industriel. Le pharmacien doit alors signaler par écrit, au promoteur, son impossibilité à garantir les conditions de maintien de température. (28)

Parmi les causes de dommages aux cellules liées à la cryoconservation, listés dans le Tableau XII, la fluctuation ou la remontée de la température de stockage peut en effet induire une recristallisation du produit ou sa dégradation par le cryoprotecteur, tel que le DMSO. (80,81)

Damage mechanism	Description and factors to consider
Osmotic injury or toxic injury	Injury due to the addition and removal of cryoprotective agents. Cell-specific characteristics such as biophysical parameters (size, shape, membrane permeability to water and cryoprotectants, osmotically inactive water, osmotic and volumetric tolerance limits) should be considered.
Cold-shock injury	Injury due to an abrupt change in temperature. Cooling rate should be considered, with very slow ( $<0.5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ) cooling rates applied to cold shock-sensitive cells.
Chilling injury	Injury due to prolonged exposure to cold (but above cryogenic) temperatures. Absolute exposure time is the most critical factor to consider. If cells appear to be chilling sensitive but are tolerant of a cryoprotectant such as DMSO at warmer temperatures, strategies can be employed to perform cryoprotectant additions at or near room temperature and reduce the amount of time "chilled."
Cooling injury	Injury associated with extracellular and intracellular ice formation. Factors to consider can be cell type-specific and include cooling rate, ice nucleation regimen, supercooling, end temperature before transfer to storage, cellular dehydration, intracellular ice formation and hypertonic solute toxicity.
Storage injury	Injury due to unwanted thermal fluctuations (transient warming events), cosmic rays and free radical formation. Factors to consider include the glass transition temperature of the cryoprotectant and careful maintenance of the storage temperature at all times. Properly cryopreserved and stored cells are viable indefinitely. Although practically challenging, if at all possible a sample should never be removed from cryostorage until it is to be used; otherwise temperature of the sample should be monitored throughout any temporary removal (such as removing a rack of vials or frame of bags). Additional considerations should include the use of closed system containers for storage (in vapor or liquid).
Thawing injury	Injury associated with warming sample from $\text{LN}_2$ storage temperature to above phase change temperature. Potential recrystallization during warming should be considered. If slow cooling is used, a wide range of warming rates are likely acceptable; however, faster warming generally may result in less intracellular recrystallization.
Post-cryopreservation processing	Upon thaw, cells are in a potentially compromised state. Care must be given to appropriately prepare them for use. If a permeable cryoprotectant is used (such as DMSO), knowledge of cell-specific osmotic characteristics is important. Cells swell and may lyse upon removal of permeable cryoprotectants and may not survive one-step dilution. If cells are administered directly from thaw without dilution or a washing step, this is effectively a one-step dilution and may result in significant cell loss <i>in vivo</i> .

Tableau XII : Dommages potentiels lié à la cryoconservation des cellules (Woods et al, 2016)

### C. TRANSPORT VERS LA ZONE DE PREPARATION

Le retrait du médicament de son emplacement de stockage ne doit avoir lieu qu'après le feu vert de l'équipe médicale pour la préparation du médicament. La température du conteneur de stockage doit être relevée avant son ouverture. La concordance de l'identité du patient sur le produit et la prescription doit ensuite être vérifiée par deux personnes. Ces éléments doivent être tracés, ainsi que l'heure de sortie du produit de son emplacement de stockage.

Le transport vers la zone de préparation doit se faire dans un conteneur solide et étanche, étiqueté si nécessaire du symbole « risque biologique ». Une matière absorbante peut également être placée dans le fond du conteneur pour prévenir le risque de dissémination en cas de dommage porté au conditionnement.

Dans le cas notamment des CAR-T cells, si la préparation est effectuée à distance de l'emplacement de stockage, le transport entre les deux sites doit se faire à la température spécifiée pour le stockage du produit. Un équipement permettant le maintien et le contrôle de cette température est donc nécessaire. La température de l'enceinte de transport et l'horaire d'arrivée du produit sur le lieu de la préparation doivent être tracés.

## **D. PREPARATION**

### **1. MANIPULATION**

Les modalités de manipulation dépendent de plusieurs facteurs comme :

- Le conditionnement primaire du produit : flacons sertis ou ampoules (unique ou multiple), seringue prête à l'emploi ou poche de perfusion
- Les conditions de conservation initiales du produit : une étape de décongélation est nécessaire pour tous les produits congelés et doit être réalisée conformément aux indications de durée et de températures indiquées par le promoteur ou le laboratoire. Dans le cas de produits issus de tissus ou cellules, une décongélation à une température sous optimale peut notamment provoquer des dommages par recristallisation de la glace en gros cristaux. Comme le préconise la HAS, la décongélation de cellules congelées en DMSO doit par ailleurs être rapide. (81,82)
- La préparation à réaliser : mise en solution, dilution, retrait de volume de poches de perfusion, mélange, division du produit ...
- Le conditionnement final nécessaire à l'administration : mise en poche ou seringue (avec bouchon ou aiguille d'administration montée)

Une documentation qualité complète, incluant une fiche de fabrication détaillée, doit donc être rédigée en amont de la préparation afin de permettre la bonne préparation du médicament tout en respectant sa péremption. Au minimum, un double contrôle visuel à toutes les étapes de la préparation doit être réalisé et enregistré, tout comme les horaires de début et de fin de la préparation. Dans le cas de produits décongelés au bain marie, la température de décongélation doit également être consignée.

La SFPO rappelle par ailleurs qu'une attention particulière doit être portée aux procédures d'habillage et de déshabillage afin de garantir le confinement adéquat des MTI. Par ailleurs, entre deux préparations de nature différente sous PSM de type IIB, l'intégralité des EPI (tenue vestimentaire, gants, masque et lunettes de protection) doit être changée.

Le personnel réalisant la préparation doit en effet être formé et habilité à la manipulation du produit, et notamment aux risques potentiels qu'ils représentent pour leur santé et

l'environnement. Des exemptions à la manipulation devront également être prévues. Faute de recul suffisant concernant les MTI, la SFPO préconise de suivre les recommandations sur la manipulation des produits à risques, en particulier pour les femmes enceintes. (28)

L'utilisation de dispositif de transfert en système clos (comme le PhaSeal®), notamment pour la manipulation de produit OGM, est envisageable à condition que la compatibilité vis-à-vis du produit ait été évaluée par l'industriel. L'utilisation de ce type de dispositif ne dispense cependant pas des mesures de confinement à apporter à l'environnement de la préparation.

La préparation de phages peut nécessiter de mélanger la solution de plusieurs flacons et, si nécessaire, de la diluer pour obtenir un volume adéquat pour le mode d'administration choisi. La matière première utilisée n'étant pas pharmaceutique, il est nécessaire de procéder à une analyse de faisabilité préalable ainsi qu'à l'analyse du risque de la réalisation de cette préparation, pour le manipulateur et pour le patient. Les précautions à prendre afin de protéger le manipulateur et l'environnement doivent aussi être établies.

## **2. ENVIRONNEMENT ET EQUIPEMENTS**

Bien que l'utilisation de médicaments OGM soit connue du HCB, en témoigne l'annexe IV.1 relative aux chambres des patients traités par thérapie génique, les mesures de confinement concernant la manipulation du produit sont décrites uniquement pour les laboratoires de recherche et de production industrielle mais pas pour les pharmacies hospitalières. A défaut, l'Annexe 1 reprend les recommandations de confinement C1 et C2 applicables à l'utilisation d'OGM en laboratoire. (6)

S'agissant de la préparation de médicaments, les locaux doivent répondre aux principes généraux décrits dans les BPP et BPPH concernant notamment les flux de personnes, de produits et de déchets. Les préparations destinées à une utilisation par voie parentérale imposent en outre le respect du chapitre 6 des BPP relatif aux préparations stériles. L'environnement de production doit par ailleurs être contrôlé, notamment pendant la préparation. (27)

La SFPO, au regard des principes énoncés par le HCB, estime que ces préconisations sont suffisantes pour les MTCS et MTG de classe I. Les locaux concernés sont alors

temporairement dédiés à ces médicaments dont la production doit être encadrée par un bionettoyage efficace. Le chapitre 4 de la partie IV des BPF précise toutefois les cas dans lesquels il est possible de fabriquer concomitamment différents lots de MTI, les contaminations croisées étant alors évitées grâce à une séparation dans l'espace. (26)

Afin de protéger le manipulateur et le produit, la préparation doit être réalisée sous PSM de type IIB ou III avec un dispositif d'évacuation relié à l'extérieur. Si l'utilisation d'un isolateur en dépression permet de protéger davantage le manipulateur et l'environnement, cette solution n'est pas généralisable à tous les MTI, comme les MTCS cryoconservés qui seraient dégradés lors de la décontamination à l'acide peracétique ou au peroxyde d'hydrogène. (28)

Dans le cas de MTG de classe II et des virus réplicatifs il est cependant nécessaire de disposer d'une zone à atmosphère contrôlée (ZAC) dédiée à cette activité, avec gradient de pression adapté. Une pièce de préparation en dépression par rapport à un sas en pression positive doit ainsi être privilégiée. Il est également recommandé que les effluents du PSM soient évacués sans recyclage vers l'extérieur, via un dispositif étanche. (6,28) L'annexe IV de la directive 2009/41/CE et l'arrêté du 16 juillet 2007 concernant l'utilisation confinée d'OGM en laboratoire n'imposent toutefois pas de pression négative ou de filtration de l'air par des filtres HEPA pour les niveaux C1 et C2, comme l'indique le Tableau XIII ci-dessous. (83–85)

	Confinement	
	C1	C2
Pression négative par rapport à celle de l'environnement immédiat	Non obligatoire	Non obligatoire
L'air entrant ou sortant du laboratoire doit être filtré (filtre HEPA)	Non obligatoire	Non obligatoire
Autoclave	Site	Bâtiment
Accès limité	Non obligatoire	Obligatoire
Panneau de danger biologique sur la porte	Non obligatoire	Obligatoire
Contrôle efficace des vecteurs (rongeurs, insectes...)	Optionnel	Obligatoire
Inactivation des OGM dans le matériel contaminé et les déchets	Optionnel	Obligatoire
Inactivation des OGM dans les effluents des éviers ou des canalisations et des douches, et les effluents similaires	Non obligatoire	Non obligatoire

*Tableau XIII : Mesures de confinement et de protection en laboratoire (d'après directive 2009/41/CE)*

Des équipements spécifiques peuvent être nécessaires, selon la manipulation à effectuer. Des dispositifs permettant le comptage cellulaire ou la centrifugation peuvent être requis. Dans le cas de la décongélation des médicaments issus de cellules il est nécessaire de recourir à un bain marie ou à un système de décongélation à sec, comme le Plasmatherm® illustré par la figure 24 ci-dessous.



*Figure 24 : Dispositif de décongélation à sec Plasmatherm® (Sebac)*

D'après les BPF relatives aux MTI, la décongélation peut être réalisée dans une ZAC de classe D minimum. C'est ce qui est par exemple réalisé au CHRU de Lille. (26,86) Toutefois dans le cadre d'essais cliniques de CAR-T cells, certains promoteurs exigent que cette étape soit réalisée sous un PSM, ou que celui-ci doit immédiatement accessible, en cas de rupture de l'intégrité de la poche. Dans ce dernier cas la décongélation doit donc avoir lieu sur paillasse dans une ZAC de classe B. Les seuils de contamination des différentes classes de ZAC sont par ailleurs disponibles dans l'Annexe 9.

Lors de la conception de nouvelles zones de pharmacotechnie, les PUI doivent dorénavant intégrer la problématique des MTI, et créer des salles spécifiques pour le stockage et la préparation de MTCS et de MTG. Ainsi, des PUI ont déjà établi les plans de leur future pharmacotechnie voire, comme à Brest, ont déjà vu leur projet aboutir. (37,86–88) La figure 25 ci-après schématise une unité de pharmacotechnie répondant aux problématiques liées aux MTCS et MTG, en particulier concernant leur confinement.



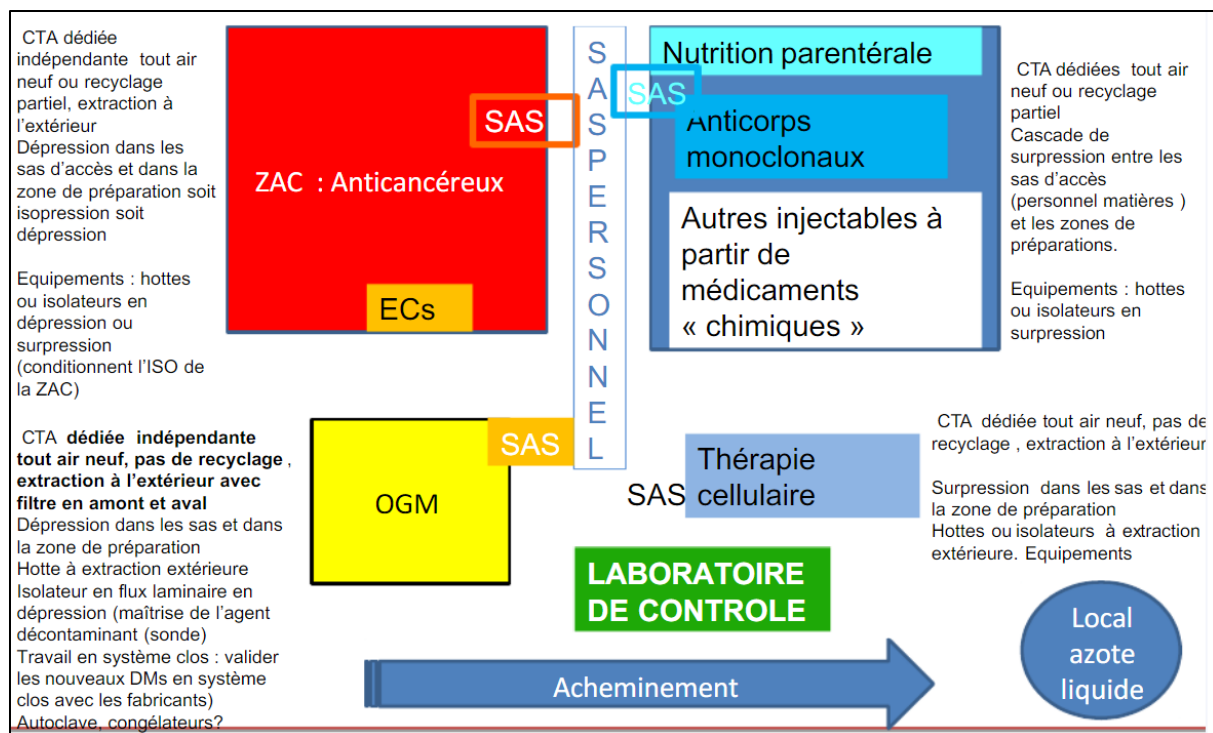


Figure 25 : Schéma des futures unités de pharmacotechnies (Bernard et al, GERPAC 2017)

Faute de réglementation, l'environnement de la production de bactériophages n'est pour l'instant pas imposé et aucune mesure particulière n'est recommandée pour la manipulation, en dehors de l'utilisation d'un PSM afin de garantir le maintien de la stérilité de la préparation. Si les bactériophages devaient à l'avenir être classés en tant que MTI, il serait possiblement nécessaire de les préparer dans la zone de production dédiée aux MTI.

Les bactériophages étant considérés comme des agents biologiques non susceptibles de provoquer une maladie chez l'Homme, ils appartiennent au groupe 1 des agents biologiques défini par le décret n°94-352 du 4 mai 1994 relatif à la protection des travailleurs contre les risques résultant de leur exposition à des agents biologiques. Les EPI habituels pour la préparation de médicaments stériles (gants, masque, cagoule et casaque à usage unique) suffisent donc à protéger le manipulateur, comme l'indique le Tableau XIV ci-après. (79,89)

Protection	EPI	Agent biologique		
		Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3
Corps	Blouse en coton	✓		
	Blouse en matériau non tissé		✓	
	Blouse en matériau non tissé Norme EN 14126:2004		✓*	✓
	Surchaussures		✓	✓
	Charlotte		✓*	✓
Mains	Gants EPI de catégorie III		✓*	✓
Yeux et visage	Lunette ou masque	✓*	✓*	✓*
Voies respiratoires	Masque FFP1 ou filtre P1	✓*		
	Masque FFP2 ou filtre P2		✓*	
	Masque FFP3 ou filtre P3			✓

\* selon les résultats de l'évaluation des risques (par exemple en L2 : gants uniquement pour les phases à risque)

*Tableau XIV : EPI préconisés selon la classification des agents biologiques manipulés  
(Bleux et al., 2012)*

## **E. DECONTAMINATION**

Le nettoyage et la désinfection de l'environnement de production selon une procédure validée est indispensable entre deux préparations de natures différentes. Deux préparations cellulaires autologues de même nature sont par ailleurs à considérer comme différentes (28). Deux préparations différentes de phages devraient l'être également.

Faute d'agent décontaminant universel et des incompatibilités avec les surfaces à nettoyer, y compris le conditionnement primaire du médicament, l'avis de l'équipe d'hygiène (et/ou du CLIN) doit être sollicité pour chaque nouveau type de médicament (MTG, MTCS, bactériophage...). Les produits à utiliser sur les différentes surfaces, avec la dilution et le temps de contact nécessaire, doivent être indiqués.

Concernant les bactériophages, les désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire et de l'industrie sont considérés efficaces s'ils satisfont à l'essai spécifié dans la norme NF EN 13610. Dans le domaine de la santé, la méthode pour la détermination de l'activité désinfectante d'un produit, notamment vis-à-vis des bactériophages, est décrite dans la norme NF T72-281. Les produits utilisés doivent également être compatibles avec les surfaces et équipements. L'eau de Javel, efficace sur les phages n'est par exemple pas compatible avec l'inox des PSM.

## **F. TRANSPORT VERS LE SERVICE DE SOIN**

Le transport vers le service de soin doit être effectué par du personnel formé, de la pharmacie ou à défaut du service de soin, afin de respecter notamment les délais parfois extrêmement courts de péremption du produit. Celui-ci sera transporté dans une boîte dédiée, mentionnant si nécessaire le risque biologique. Afin de garantir la qualité du produit, le transport doit donc être maîtrisé et la remise en main propre dans le service, à du personnel habilité, doit être tracée en précisant la date, l'horaire et le nom de la personne effectuant la réception. (28)

Dans le cas des CAR-T cells par exemple, il ne doit pas y avoir plus de trente minutes entre le début de la décongélation et la fin de l'administration au patient, ce qui nécessite une bonne coordination de tous les acteurs en charge du produit et du patient ainsi qu'une proximité physique importante entre le lieu de la décongélation et celui de l'administration. Cette péremption est expliquée par la présence de DMSO dans la préparation, un produit cryoconservateur qui présente une activité cytotoxique dès sa montée en température. Au vu des courts délais imposés pour les CAR-T cells, il n'est pas nécessaire de mettre en œuvre des mesures de contrôle de la température lors du transport. (5)

D'autres circuits peuvent être envisagés pour les produits avec une péremption après préparation plus longue, comme la réalisation de la préparation sur un site distant du lieu d'administration. Dans ce cas, le circuit devra être préalablement défini, avec une traçabilité à chaque étape, et le transport entre les deux sites pourra nécessiter une température dirigée et contrôlée.

## **G. DECHETS**

Les déchets de préparation relatifs aux OGM, incluant notamment les équipements de protection individuelle utilisés ou l'eau souillée du bain marie, doivent être inactivés puis éliminés conformément aux recommandations du HCB. (5,6,28) L'Annexe 2 reprend l'ensemble des consignes relatives au traitement des déchets issues de l'Annexe V.1 du manuel du HCB. Compte tenu du risque biologique, le conditionnement primaire des médicaments OGM en essai clinique est immédiatement détruit après utilisation et n'est jamais conservé, y compris pour ceux en essais cliniques nécessitant une comptabilité. (28)

### **1. INACTIVATION**

Les déchets produits doivent subir sur leur lieu de production ou d'utilisation un traitement d'inactivation adapté au niveau de confinement de l'OGM afin de réduire le risque biologique ou infectieux pour l'homme et l'environnement. L'inactivation, qui doit dans tous les cas être rigoureusement tracée, peut être réalisée selon deux procédés différents.

#### **Traitement physique**

Le traitement thermique par autoclavage, défini par le HCB comme un plateau à 134 °C pendant 20-30 minutes, est la référence pour l'inactivation des déchets solides ou liquides. Un stérilisateur par vapeur d'eau ou des stations de traitement spécifiques pour les déchets peuvent être utilisés après avoir été dûment qualifiés et contrôlés, notamment vis-à-vis de la réglementation des récipients sous pression. La SFPO précise bien que l'autoclave utilisé doit être dédié à ces produits biologiques, ce qui exclut la possibilité d'utiliser les autoclaves de la stérilisation centrale. (6,28,90)

#### **Traitement chimique**

Lorsque l'inactivation thermique est impossible pour les déchets liquides, ou pour les déchets solides de confinement C1, un procédé utilisant des désinfectants ou gaz peut être validé. Outre une solution extemporanée d'hypochlorite de sodium à 0.43% de chlore actif final en contact pendant au minimum 12h, d'autres produits peuvent être validés. Le chapitre 14 du manuel de sécurité biologique de l'OMS liste d'autres désinfectants qui peuvent être utilisés. (6,91)

En dernier recours, si l'inactivation physique ou chimique des déchets solides issus de produits classés C1 n'est pas possible, ceux-ci peuvent être placés dans des containers verrouillables pour déchets infectieux, en y mentionnant qu'il s'agit de déchets OGM ainsi que le nom et contact du service et de son responsable. (6)

S'il n'existe pas de recommandation concernant l'inactivation ou la stérilisation des déchets issus de la préparation de bactériophages, il semble pertinent d'envisager de leur appliquer un traitement similaire aux déchets OGM de confinement C1, notamment pour anticiper une éventuelle réglementation à venir sur ce sujet. Une procédure de gestion des déchets similaire à celles mises en place en virologie peut également être envisagée.

## **2. ELIMINATION**

Si le HCB considère que les déchets de médicaments OGM inactivés peuvent être assimilés aux déchets industriels banals ou à des ordures ménagères, la SFPO recommande de les éliminer via la filière DASRI, tout comme les médicaments de thérapie cellulaire. Ainsi tous les déchets issus de ces médicaments doivent être éliminés via la filière des déchets à risques infectieux, quel que soit leur niveau de confinement et qu'ils aient été inactivés ou non, (6,28)

Le traitement de ces déchets par incinération à 850°C peut être effectué par un prestataire de service agréé. La traçabilité de l'incinération de ces déchets peut être demandée par un promoteur d'essai clinique et doit dans tous les cas être assurée dans le cas d'OGM de confinement C2. Le pharmacien doit alors conserver le Bordereau de Suivi des Déchets d'Activité de Soins (BSDAS) remis par le prestataire. (5,6,86,92)

Le circuit d'élimination des déchets d'activité de soins est établi par l'équipe d'hygiène (et/ou du CLIN) de l'établissement. (28)

## **II. EQUIPEMENTS DISPONIBLES ET EVOLUTIONS A METTRE EN PLACE**

### **A. STOCKAGE**

Quelles que soient les conditions de conservation, une séparation physique des MTI doit être organisée, que ce soit en y dédiant un compartiment, une étagère, un tiroir ou un équipement entier. La température est également monitorée en continu et une supervision permet d'être alertés de toute excursion.

#### **1. TEMPERATURE POSITIVE**

Les médicaments utilisés habituellement en pharmacotechnie sont stockés à température ambiante ou réfrigérée. Des équipements sont donc disponibles pour la conservation de ces produits, et de nouveaux emplacements peuvent y être créés et identifiés. Un partage des équipements et locaux du secteur essai clinique peut être envisagé pour restreindre et contrôler davantage l'accès aux traitements. Si nécessaire, les locaux de la PUI permettent également d'envisager l'installation d'équipements dédiés. La récurrence de la nécessité de ce stockage sera un critère pris en compte lors du choix qui sera fait.

#### **2. TEMPERATURE NEGATIVE**

##### ***a. Congélateur***

La PUI dispose d'un congélateur à -80°C. Un de ses compartiments peut être mis à disposition si nécessaire. Une signalétique appropriée doit alors être apposée sur chacun des emplacements. Dans le cas où la température de ce congélateur n'est pas appropriée et que le produit ne peut pas être conservé en cuve azote, un nouvel équipement pourra être installé.

##### ***b. Cuve cryoconservation sèche***

La PUI dispose d'une cuve azote dans les locaux du Centre de Ressources Biologiques (CRB) du CHU. Avec l'accord de l'ARS, une annexe de la PUI a été créée dans la salle de cryoconservation. L'accès à cette salle n'est possible que pour le personnel du CRB et pour les pharmaciens. Cette cuve, fermée à clef, permet le stockage des médicaments à -196°C.

Elle est reliée à la fois au système de remplissage automatique et aux alarmes des équipements du CRB. Les paramètres de la cuve sont ainsi contrôlés en continu via un système de supervision relié au PC sécurité du CHU et une astreinte a été mise en place afin de pouvoir intervenir immédiatement en cas de défaillance. Comme montré dans la figure 26, une cuve du CRB est identifiée pour accueillir les MTI en cas d'incident sur celle de la PUI.

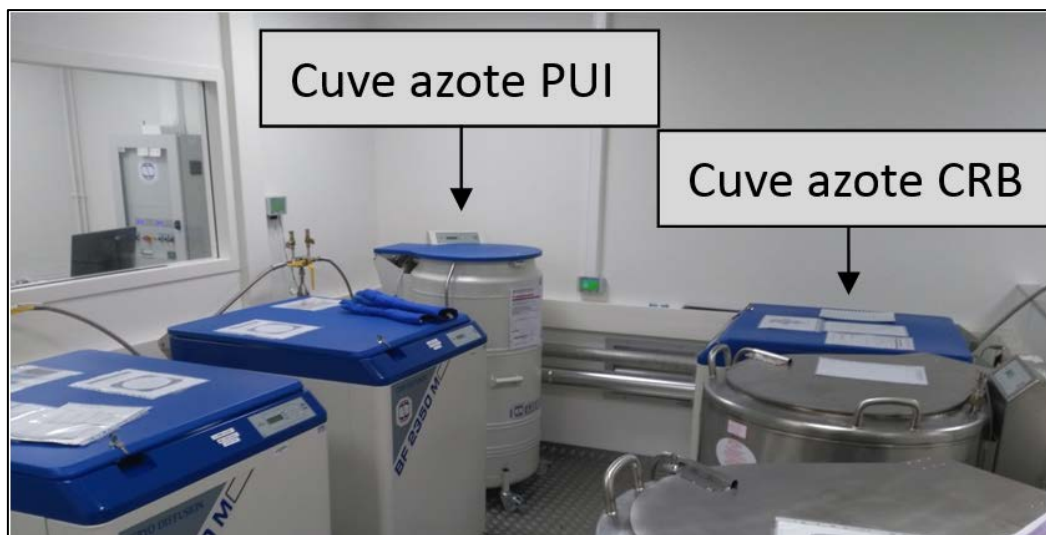


Figure 26 : Cuves azotes disponibles pour les MTI

## B. TRANSPORT

### 1. TEMPERATURE POSITIVE

Les MTI sont acheminés grâce à des boîtes isothermes scellées, identifiées au nom du service destinataire et portant la signalétique « risque biologique ». Des plaques eutectiques froides peuvent y être placées dans le cas d'une préparation conservée à température réfrigérée.

Les seringues de bactériophages devant être transférées sur le site de l'Hôpital Sud pour la réalisation des contrôles seront au préalable placées dans des Biotainer®, illustré par la figure 27. Ce triple emballage, étanche et comportant un papier absorbant, est qualifié pour le transport de matières infectieuses de catégorie A.



Figure 27 : Biotainer® (E3 Cortex)

## 2. TEMPERATURE NEGATIVE

Le stockage des médicaments cryoconservés n'étant pas réalisé à proximité immédiate du lieu de décongélation, le transport entre ces deux sites est réalisé à l'aide d'un Cryopod®, présenté à la figure 28 ci-dessous. Une fois sa cuve remplie d'azote, ce dispositif permet la conservation du médicament pendant la durée établie lors de sa qualification ( $\geq 2h$ ). Afin de minimiser le risque d'accident lié à la manipulation de l'azote liquide, une station de remplissage automatique a été installée.



Figure 28 : Cryopod™ Carrier et sa station de remplissage (Brooks)

## C. PREPARATION

La PUI du CHU de Rennes dispose de locaux dédiés à la production de médicaments stériles sur les sites de Pontchaillou et de l'Hôpital Sud, selon les caractéristiques présentées dans le Tableau XV ci-dessous.

Site	Pièce	Equipements	Activité
Hôpital sud	URCC	Isolateur (en surpression)	Reconstitution de chimiothérapies
	ZPI	Mur soufflant à flux laminaire	Nutrition parentérale
	ZPI	PSM IIb	Collyres et injectables
Pontchaillou	URCC	Isolateur (en surpression)	Reconstitution de chimiothérapies
	ZPI	PSM IIb	Médicaments expérimentaux et MTI

Tableau XV : Locaux et équipements de préparation de médicaments stériles du CHU de Rennes



Toutes les pièces sont en surpression, comme illustré par la figure 29 pour la Zone de Préparations Injectables (ZPI) de Pontchaillou. Les PSM IIb et isolateurs sont en classe A, tandis que leurs ZAC sont respectivement en classe B et D.

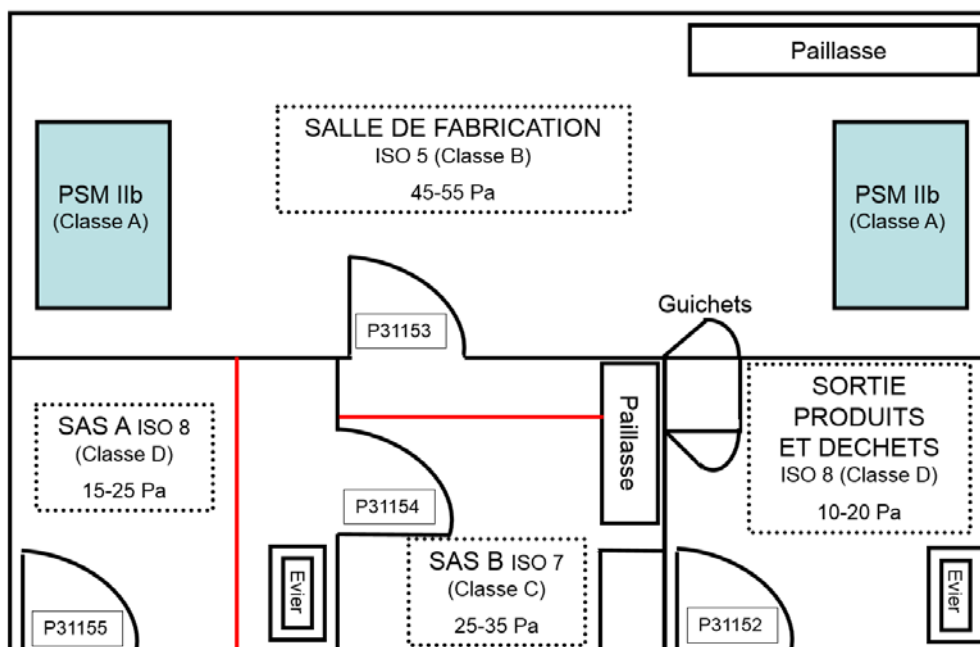


Figure 29 : Plan ZPI Pontchaillou

Les PSM disponibles sont des hottes à flux laminaire de classe IIb. En plus des représentations disponibles en Annexe 10, le Tableau XVI ci-dessous rappelle les différences entre les différents types de PSM. (91)

Classe	Protection		Flux d'air		
	Personnel	Produit	Air recyclé	Air évacué	Circuit d'évacuation
I*	Oui	Non	0 %	100 %	Jonction rigide étanche
II A1	Oui	Oui	70 %	30 %	Evacuation dans la pièce ou manchon de raccordement
II A2 avec ventilation sur l'extérieur*	Oui	Oui	70 %	30 %	Evacuation dans la pièce ou manchon de raccordement
II B1*	Oui	Oui	30 %	70 %	Jonction rigide étanche
II B2*	Oui	Oui	0 %	100 %	Jonction rigide étanche
III*	Oui	Oui	0 %	100 %	Jonction rigide étanche

\*Toutes les gaines et tous les conduits potentiellement contaminés sont en dépression ou sont entourés de gaines et de volumes en dépression.

Tableau XVI : Différences entre les PSM de classe I, II et III (OMS, 2005)

Afin de pouvoir travailler dans un environnement de préparation en dépression, l'utilisation d'un isolateur a semblé être la méthode la plus adaptée à mettre en place au CHU de Rennes. Toutefois cet équipement nécessite de réaliser un cycle de décontamination à l'acide peracétique et au peroxyde d'hydrogène non adapté en durée et température au process de préparation des MTI.

Un système hybride a été trouvé, permettant de travailler à la fois dans une enceinte fermée, en dépression et sous un flux laminaire.

Ce système, illustré par la figure 30 ci-dessous, présente en particulier l'avantage de pouvoir charger les produits et dispositifs :

- Soit frontalement : la vapeur de peroxyde d'hydrogène libérée dans l'enceinte permet alors d'effectuer la bio-décontamination de l'ensemble de l'enceinte et des produits en 20 à 30 minutes.
- Soit par le sas : les produits doivent alors avoir été désinfectés manuellement, selon une méthode validée.
- Soit par le dispositif de transfert rapide : les produits ont alors été désinfectés dans l'enceinte puis placés dans le dispositif.

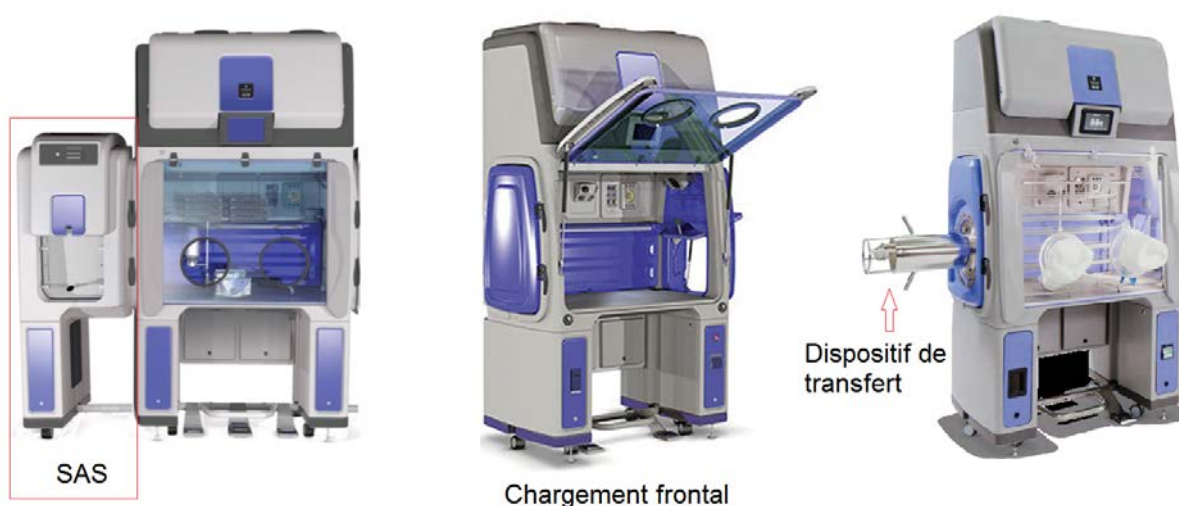


Figure 30 : Possibilités de chargement dans l'isolateur Qube® (Bioquell)

Avec cet équipement, il est possible d'alterner la pression de l'environnement de travail et de passer d'une pression positive à une pression négative. Il permet le travail en tout air neuf et peut être relié à la centrale de traitement de l'air. Disposant de deux filtres HEPA en sortie, certains centres ont reçu l'autorisation à la préparation de MTI conformément au décret PUI alors même que la configuration de leur installation ne permettait pas un raccordement vers l'extérieur.

Le peroxyde d'hydrogène présente l'avantage d'être actif sur les phages, les plasmides et les virus. A la fin du cycle, un système de catalyse assure sa dégradation, dispensant également d'évacuation vers l'extérieur.

Pour travailler en dépression, il est nécessaire que l'environnement de l'équipement soit au moins en classe C. Au CHU de Rennes, le Qube® serait donc installé en ZPI-MTI de classe B. La réponse à la demande d'équipement est à ce jour toujours attendue.

Dans l'élaboration des futurs locaux de l'IRC (Institut Régional de Cancérologie) regroupant la pharmacotechnie du CHU et celle du centre de lutte contre le cancer Eugène Marquis, une ZAC en dépression disposant d'une centrale d'air dédiée (tout air neuf, filtré avec extraction vers l'extérieur) devrait notamment être créée pour pouvoir répondre à l'ensemble des spécifications attendues, en particulier pour la manipulation d'OGM de classe 2. Un programme de contrôle des insectes et des rongeurs doit également être mis en place.

L'activité MTI du CHU de Rennes consiste pour l'instant principalement à la préparation d'OGM classe 1 (vaccins, Car-T cells...). En fonction de l'arrivée d'autres MTI sur le marché, d'autres équipements pourraient toutefois être installés à l'avenir (centrifugation, comptage de cellules...).

#### **D. DECHETS**

Actuellement, les déchets issus de la décongélation des Car-T cells sont identifiés comme étant des déchets OGM et éliminés via la filière DASRI, sans inactivation préalable.

Dans le cas de la préparation de médicaments OGM de classe 1 autre que les Car-T cells, une inactivation par hypochlorite de sodium (eau de Javel) conformément aux recommandations du HCB est prévue. A noter que si la SFPO prévoit la nécessité de gélification de certains déchets, ce traitement ne fait pas partie des préconisations du HCB ou du MESR pour l'utilisation d'OGM en milieu confiné, toutes classes confondues. (6,28,83) Cela peut toutefois être imposé par certains promoteurs d'essais cliniques. Dans le cas où les déchets auraient été préalablement inactivés à l'aide d'eau de Javel, il est toutefois impératif de s'assurer de la compatibilité du gélifiant utilisé. Un dégagement de dichlore peut en effet résulter de la réaction du gélifiant sur l'hypochlorite de sodium. En plus d'être toxique, cela provoque la formation de mousse abondante. Le service d'hygiène du CHU a permis d'identifier un produit compatible, le GelMax®, afin de gélifier les déchets traités par l'eau de Javel.

Dans le cas où un médicament OGM de classe 2 doit être préparé, un autoclave de paillasse sera installé et qualifié dans la zone de préparation. Dans la ZAC de préparation des MTI du futur IRC, un autoclave sera installé et un système à double-porte pourra être envisagé. Le choix du type d'autoclave à installer sera donc un élément pris en compte dans la conception des locaux.

### III. LA PHAGOTHERAPIE COMPASSIONNELLE AU CHU DE RENNES

#### A. PATIENT ELIGIBLE A LA PHAGOTHERAPIE

Alors qu'aucune spécialité pharmaceutique n'est disponible sous le statut d'AMM ou dans le cadre d'essai clinique, le CRIOGO souhaite recourir à phagothérapie au CHU de Rennes afin de traiter un patient atteint d'ostéomyélite chronique fémorale à *S aureus*.

Suite à un accident de la voie publique, le patient avait subi en 1984 une ostéosynthèse fémorale. Le premier épisode d'ostéite a eu lieu en 2009, pour lequel peu d'informations ont été retrouvées en dehors de la reprise chirurgicale. Lors de la seconde récurrence, en 2013, l'extraction de fragments de vis cassées avait permis de mettre en évidence une infection à SAMS de profil KTG (induisant une résistance de haut niveau à la kanamycine, amikacine tobramycine, nétilmicine et gentamicine (93)), résistant à l'érythromycine et la clindamycine. Le traitement antibiotique prolongé par rifampicine et lévofloxacine a été compliqué de tendinopathie. La dernière récurrence, fin 2019, a été constatée par l'apparition de collections fistulisées au niveau de la cuisse en regard des anciens orifices de vis. Le nouvel alésage réalisé en mai 2020 a permis d'effectuer de nouveaux prélèvements, qui retrouvent un SAMS dont les résistances incluent dorénavant la rifampicine. Compte tenu de la contre-indication aux quinolones, le patient a été traité par linézolide puis par céfazoline IV continue pendant 3 mois.

Au vu de la douleur du patient, l'échec de la prise en charge médico-chirurgicale a été discuté en RCP fin juin. Faute d'indication à une reprise chirurgicale aussi rapide et d'alternative médicamenteuse, un échantillon du prélèvement et une demande de phagogramme ont été envoyés à un établissement produisant des bactériophages. La phagothérapie serait ainsi réalisée en même temps qu'une nouvelle intervention chirurgicale, en cas d'échec confirmé de l'antibiothérapie.

Les résultats du phagogramme ont été communiqués 8 jours après la réception de la souche bactérienne. Deux phages ont été testés, montrant en killing essay une inhibition totale de la croissance bactérienne à la concentration haute pour le premier phage et une activité transitoire pour le deuxième. Les CML (Concentration Minimale de Lyse) ont été évaluées

pour ces deux phages, à des valeurs de l'ordre de  $10^7$  PFU/ml par la méthode de plaque assay. Ces phages ont montré des signes de lyse partielle, sans toutefois former de PFU.

L'ensemble des éléments relatifs au patient, à la souche bactérienne et aux phages identifiés ont été communiqués à l'ANSM, dont l'avis est désormais attendu. Bien qu'indispensable, cet avis ne vaut pas pour autant autorisation, et la responsabilité de la préparation et de l'administration de cette thérapie repose intégralement sur le médecin et le pharmacien.

La figure 31 ci-dessous synthétise les différentes étapes nécessaires à la mise en place d'un traitement par phagothérapie compassionnelle.

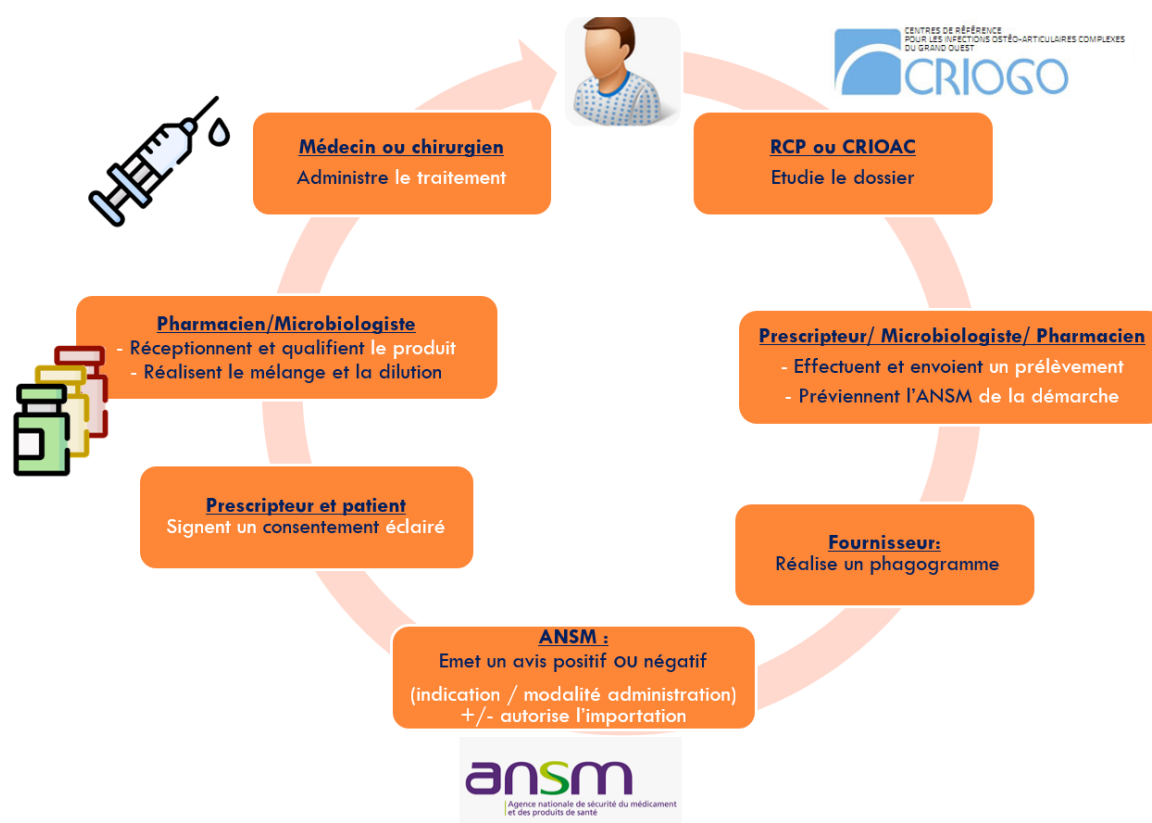


Figure 31 : Etapes de la prise en charge compassionnelle d'un patient par phagothérapie

## **B. BACTERIOPHAGES A USAGE COMPASSIONNEL**

A l'heure actuelle les bactériophages n'étant pas fournis par des établissements pharmaceutiques, ils ne sont pas certifiés conformes aux BPF. Les fournisseurs des bactériophages peuvent toutefois fournir les résultats des analyses qu'ils ont effectué sur la stérilité, le pH, l'identification et la titration des bactériophages, ainsi que les taux d'endotoxines, de protéines, d'ADN bactérien résiduel et d'impuretés liées au process. (94) Ces analyses font notamment partie du contrôle qualité détaillé dans l'Annexe 11, concernant les bactériophages de qualité BPF développés pour l'essai clinique Phagoburn. (95)

Les impuretés correspondent aux produits utilisés lors de la production des phages, notamment lors de la purification vis-à-vis des bactéries résiduelles. Des nucléases peuvent par exemple être utilisées afin de dégrader toutes les formes d'ADN et d'ARN (simple brin, double brin, linéaire et circulaire), sans présenter d'activité protéolytique. (96,97) Des détergents comme le DOC (désoxycholate de sodium) peuvent également être utilisés, pour dissocier les phages des lipopolysaccharides bactériens. (97,98) Dans le cas du DOC, l'administration sous-cutanée peut provoquer une réaction inflammatoire locale, sans effet systémique. Il provoque également une lipolyse locale. (99–101) Quel que soit le process du fournisseur de phages, les produits utilisés lors de la production ne devraient pas être retrouvés dans les solutions administrées. Cela est d'autant plus vrai dans le cas où les produits utilisés sont censés être destinés uniquement à la recherche.

La tolérance de la solution de bactériophages doit également être évaluée, notamment vis-à-vis de son solvant. Les phages peuvent par exemple être fournis dans une solution isotonique saline de DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffer Saline). (64,94) La société GIBCO, un établissement enregistré auprès de la FDA en tant que fabricant de dispositifs médicaux, est un fabricant de cette solution tamponnée. Celle-ci n'est toutefois commercialisée que pour un usage de diagnostic *in vitro*, ne devant pas être « injecté ou perfusé ». (102) Le Tableau XVII ci-après résume les caractéristiques d'une solution de DPBS. (103,104)

Composition	KCl : 200 mg/l KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> : 200 mg/l NaCl : 8000 mg/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O : 2160 mg/l
pH	7,0 à 7,3
Osmolalité	270 à 300 mOsm/kg

*Tableau XVII : Spécifications du DPBS sans calcium ni magnésium (ThermoFischer)*

Le fournisseur de la solution de phages doit également étudier la stabilité du produit vis-à-vis du stockage et des modalités de préparation. La stabilité des bactériophages, seuls ou en association, dans les éventuels solvants de dilution doit en effet être documentée et la compatibilité vis-à-vis du matériel utilisé doit être vérifiée. Les filtres utilisables pour effectuer une filtration stérilisante doivent ainsi être indiqués au pharmacien.

### **C. GESTION DES RISQUES EN PHARMACOTECHNIE**

Les bactériophages fournis n'étant pas des produits pharmaceutiques, leur utilisation entraîne un engagement complet de la responsabilité du pharmacien hospitalier. Préalablement à la prise en charge de tout patient, une étude de faisabilité a donc été réalisée au CHU de Rennes, couplée à une analyse des risques. Cette dernière a été réalisée en adaptant un outil de gestion des risques proposé par l'ARS Ile-de-France. (105) Les étapes allant de la validation pharmaceutique de la prescription à l'administration des bactériophages ont été analysées, suivant la configuration proposée dans le Tableau XVIII ci-dessous. Une synthèse des résultats de l'analyse des risques est proposée dans l'Annexe 12, et celle des actions à mettre en place dans l'Annexe 13.

Numéro de l'étape	Nom de l'étape
A	Prescription
B	Validation médicale
C	Transmission de la prescription
D	Validation pharmaceutique de la prescription
E	Contrôle des moyens de production
F	Production
G	Stockage avant dispensation
H	Contrôle de la préparation
I	Dispensation
J	Transports
K	Administration
L	Surveillance

*Tableau XVIII : Configuration du circuit analysé*



Suite à l'analyse des risques, de nouveaux documents ont été ajoutés au système qualité de la pharmacotechnie du CHU de Rennes. Ainsi, toutes les étapes de la prise en charge pharmaceutique d'un traitement compassionnel par bactériophages ont été décrites, comme l'illustre le Tableau XIX ci-dessous. Un dossier de lot à compléter a également été élaboré, permettant d'assurer une traçabilité complète de toutes les étapes décrites dans les instructions de travail. Celui-ci est disponible en Annexe 14.

	Intitulé	Processus	Version	Date d'application
ZPI-IT 029	Valider une prescription de préparation magistrale de bactériophages à usage compassionnel	3.2	1	01/09/2020
ZPI-IT 030	Réceptionner et stocker des bactériophages à usage compassionnel	3.3	1	01/09/2020
ZPI-IT 031	Réaliser une préparation magistrale de bactériophages à usage compassionnel	3.3	1	01/09/2020
ZPI-IT 032	Contrôler et libérer une préparation magistrale de bactériophages à usage compassionnel	3.3	1	01/09/2020
ZPI-IT 033	Acheminer une préparation magistrale de bactériophages à usage compassionnel	3.4	1	01/09/2020
ZPI-EN 022	Dossier de lot d'une préparation de bactériophages à usage compassionnel	3.3	1	01/09/2020

*Tableau XIX : Documentation qualité relative à la préparation de bactériophages à usage compassionnel au CHU de Rennes*

### **1. RISQUES POUR LE PATIENT**

D'un point de vue réglementaire, la matière première non pharmaceutique doit être qualifiée par le pharmacien hospitalier préalablement à son utilisation. Cependant, dans le cadre d'un traitement compassionnel, un seul flacon est fourni par type de phages à administrer, de volume insuffisant pour permettre la réalisation des contrôles. Au vu de la nature stérile de la solution à réaliser, il n'est en outre pas envisageable de prélever dans le flacon préalablement à la préparation.

Des échantillons de la préparation seront donc réalisés afin de permettre la réalisation des contrôles après la préparation, sur le produit fini. Bien que cela ne soit pas exigé pour les préparations magistrales, un échantillon sera également conservé à l'échantillothèque. Le volume nécessaire pour ces échantillons devra être pris en compte dans la dilution à effectuer, qui devra être spécifiée dans la prescription. Les échantillons seront réalisés de façon à minimiser le volume nécessaire afin de limiter la dilution à effectuer.

Faute de données de stabilité suffisantes, tous les résultats des contrôles effectués ne pourront pas être attendus pour la libération et l'administration de la préparation. Au CHU de Rennes, la péremption après préparation a en effet été fixée à 24h. La figure 32 ci-dessous illustre les modalités des contrôles qu'il a été décidé d'effectuer, suite à l'analyse de risque et l'étude de faisabilité.

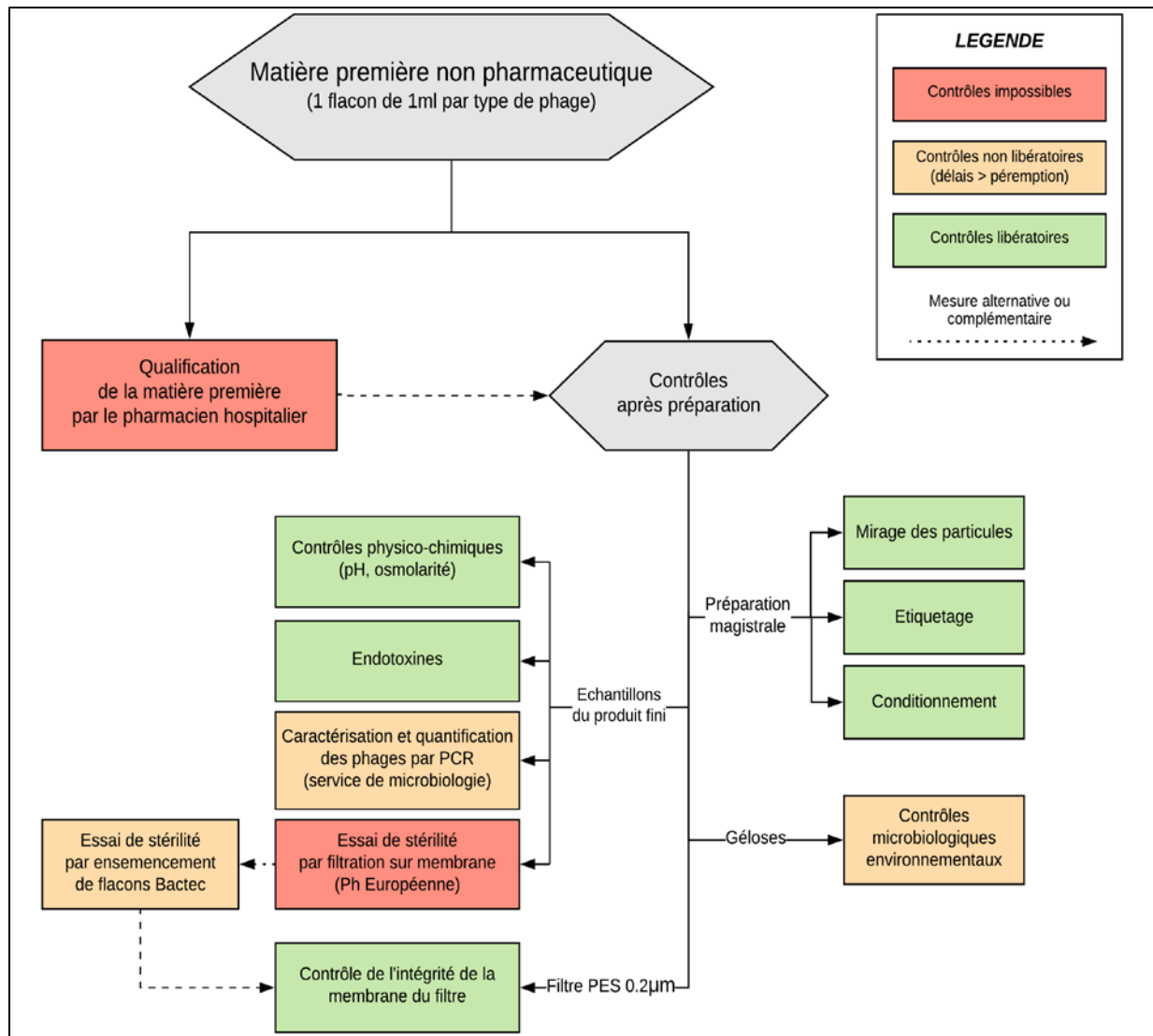


Figure 32 : Contrôles d'une préparation de bactériophages issus d'une matière première non pharmaceutique au CHU de Rennes

## *a. Risques liés à la matière première*

### *i. Risque d'inefficacité*

Pour chaque bactériophage, le titre final de la préparation ne devra notamment pas être inférieur à la concentration minimale de lyse indiquée dans le phagogramme réalisé. Cette valeur devra en outre être en accord avec les données de stabilité établies par le fournisseur. Un défaut qualitatif ou quantitatif des bactériophages fournis peut entraîner une perte de chance pour le patient. Leur identification et quantification seront réalisées sur le produit fini par des techniques de PCR, dont les résultats ne pourront être obtenus qu'après l'administration de la préparation. La PUI ne disposant pas des équipements nécessaires, une convention de sous-traitance sera établie avec le service de microbiologie lorsqu'un traitement par phagothérapie sera validé pour un patient.

### *ii. Risque infectieux*

Si des techniques de filtration peuvent être utilisées par le fabricant, la nature virale des bactériophages empêche toute stérilisation du produit fini par autoclavage afin de conserver leurs propriétés thérapeutiques. Les bactériophages étant en outre produits à partir d'une culture bactérienne, leur administration peut donc exposer le patient à un risque infectieux.

### **Essai de stérilité**

La Pharmacopée Européenne (106) préconise de réaliser les essais de stérilité à l'aide de la méthode de filtration sur membrane. Le produit testé doit être filtré au travers d'une membrane de porosité inférieure ou égale à 45 µm, qui sera ensuite incubée 14 jours dans un milieu de culture (milieu à l'hydrolysate de caséine et de soja ou milieu liquide au thioglycolate). Toutefois comme le montre le Tableau XX ci-après, dans le cas d'une préparation de plus de 40 ml cet essai nécessite d'en sacrifier au minimum 20 ml pour chaque milieu testé (aérobie et anaérobie). Cette méthode ne peut par ailleurs pas être intégrée au processus de fabrication, or le respect des conditions aseptiques est indispensable pour ne pas entraîner un résultat faussement positif. Une autre méthode est également décrite, où les milieux de culture précités sont directementensemencés par la préparation. Cette méthode nécessite de faire appel au même volume de préparation à utiliser ainsi qu'à la même durée d'incubation.

Quantité par récipient	Quantité minimale de préparation à utiliser pour chaque milieu, sauf exception justifiée et autorisée
< 1 ml	Contenu total de chaque récipient
1 – 40 ml	La moitié du contenu de chaque récipient, mais pas moins de 1 ml
41 – 100 ml	20 ml
> 100 ml	10% du contenu du récipient, mais pas moins de 20 ml

*Tableau XX : Quantités minimales de préparation à utiliser pour réaliser un essai de stérilité (Pharmacopée Européenne)*

Il a donc été décidé que le contrôle de la stérilité de la préparation sera effectué tel qu'il est réalisé et validé en routine pour les préparations stériles, à l'aide de flacons Bactec® aérobies et anaérobies ensemencés par 8 à 10 ml de préparation au cours du processus. (107) Cette méthode facile à mettre en œuvre est bien intégrée au processus aseptique et permet de limiter le volume de préparation à utiliser. La durée d'incubation est par ailleurs réduite à 7 jours. Le délai d'obtention des résultats reste toutefois incompatible avec la péremption de la préparation. Ceux-ci permettront donc de documenter la qualité de la préparation administrée mais ils ne seront pas attendus pour sa libération.

#### **Intégrité de la membrane de filtration stérilisante**

Une filtration stérilisante du produit fini sera réalisée lors de la répartition de la préparation, conformément aux BPP. Compte tenu de l'impossibilité de valider la stérilité de la préparation préalablement à sa libération, l'intégrité du filtre utilisé sera vérifiée selon la méthode du point de bulle, citée dans les BPF. (26,27)

Le test du point de bulle est un test non destructif qui peut être effectué avant et après l'utilisation du filtre. Dans le cas de la préparation de bactériophages il sera réalisé manuellement après la manipulation, afin de vérifier que celle-ci n'a pas altéré l'intégrité du filtre au cours de son utilisation. Sous le PSM, le filtre sera positionné sur une seringue d'inflation afin d'y appliquer une pression contrôlée grâce au manomètre intégré. Une tubulure sera placée en aval du filtre, et son extrémité sera immergée dans l'eau. La figure 33 ci-après illustre le montage à réaliser.

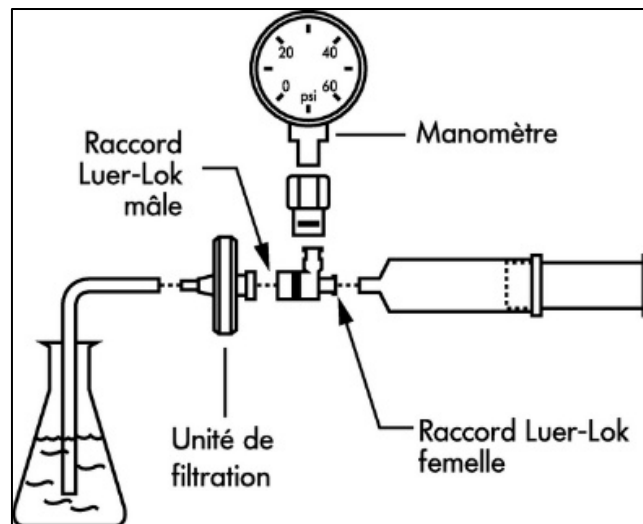


Figure 33 : Montage du test du point de bulle (Merkmillipore)

Le test repose sur le principe que les liquides sont retenus dans les pores des membranes microporeuses par capillarité et par les forces de tension de surface. Ainsi le liquide peut être expulsé des pores lorsqu'une pression d'air appliquée depuis l'amont du filtre surmonte la force capillaire. Lors du test du point de bulle, la pression est augmentée progressivement jusqu'à ce que le liquide soit expulsé des pores. Lorsque le point de bulle est dépassé, un flux de bulles d'air continu se forme en aval du filtre. La figure 34 ci-dessous illustre ce phénomène.

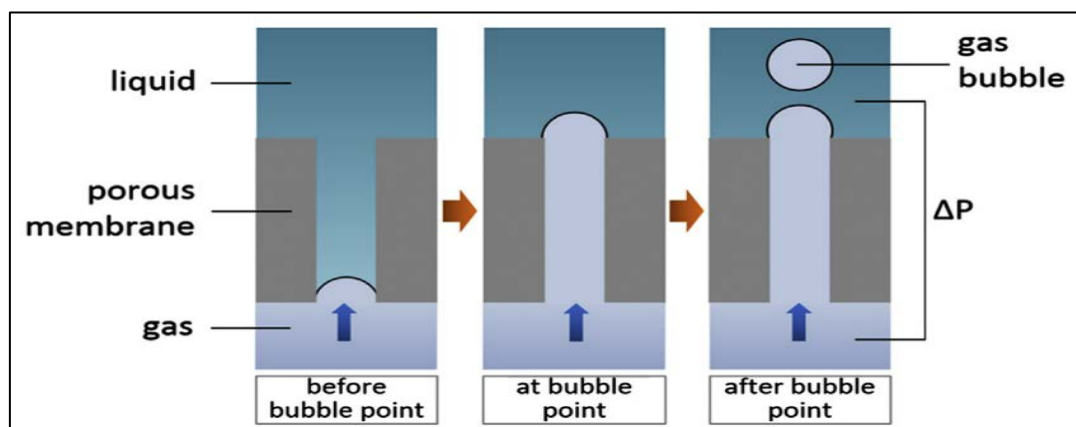


Figure 34 : Principe de la méthode du point de bulle (Wenten et al, 2017)

La valeur du point de bulle dépend de la taille des pores du filtre, du polymère de sa membrane, de la température et du liquide mouillant utilisé. (108) La tension de surface de l'eau à 20°C étant de 72.8 mN/m, au vu des données disponibles dans le Tableau XXI, le solvant NaCl 0.9% ne sera pas considéré comme significativement différent au niveau du mouillage. (109,110) La valeur obtenue lors du test pourra donc être comparée à la valeur spécifiée par le fabricant du filtre testé.

C (wt %)	$\sigma$ (mN · m <sup>-1</sup> ) at $\theta$ (°C)								
	25	20	15	10	5	0	-2.5	-5	-10
0.0	72.0	72.7	73.6	74.2	74.9	75.7	—	—	—
5.0	—	74.4	75.1	75.8	76.4	77.5	77.7	—	—
10	—	76.2	76.9	77.6	78.3	79.2	79.5	79.9	—
15	—	77.9	78.6	79.3	80.0	80.6	81.0	81.4	81.9

*Tableau XXI : Tension de surface d'une solution aqueuse de chlorure de sodium en fonction de sa concentration et de la température (Horibe et al, 1996)*

Le filtre utilisé disposera d'une membrane en PES (polyéthersulfone) avec des pores de 0,2 µm dont le fabricant établit le point de bulle comme étant supérieur ou égal à 46 psi. Pour valider l'intégrité du filtre utilisé lors de la préparation, cette valeur devra donc être atteinte avant d'observer l'apparition d'un flux de bulles en aval du filtre. En cas de non-conformité, le test étant réalisé sous le PSM de préparation, le produit sera à nouveau filtré et un nouveau test d'intégrité sera réalisé.

### **Contrôles environnementaux**

Des contrôles microbiologiques de l'environnement de la zone de préparation seront réalisés conformément aux procédures habituelles concernant la production de préparation stériles. L'empreinte du gant du manipulateur sera réalisée sur une gélose afin de vérifier l'absence de contamination de surface et l'aérobiocontamination sera évaluée par sédimentation. Les boîtes de gélose seront manipulées à l'aide de compresses propres pour limiter le risque de dépôt de bactériophages à leur surface. Après avoir été étiquetées, elles seront placées dans un sachet hermétique identifié « risque infectieux » puis envoyées dans le service bactériologie du CHU.

### iii. Risque d'intolérance locale ou systémique

Afin de minimiser le risque d'intolérance locale ou systémique, des contrôles seront effectués pour vérifier le taux d'endotoxines et l'absence de particules visibles dans la préparation. Le pH et l'osmolarité seront également mesurés. Il a cependant été convenu avec l'équipe médicale que la préparation ne sera en aucun cas administrée par voie IV.

#### **Contrôle des endotoxines**

La Pharmacopée Européenne établit que la limite en endotoxines doit être calculée selon le rapport de K sur M, où :

- K est la dose seuil d'endotoxines ayant un effet pyrogène par kilogramme de masse corporelle. Pour une préparation administrée par voie parentérale, la valeur de K retenue par la Pharmacopée Européenne est de 100 UI/m<sup>2</sup>.
- M est la dose maximale recommandée pour le produit, en bolus, par kilogramme de masse corporelle. Il n'existe pas de recommandations concernant la dose maximale de bactériophages administrable. Dans le cas d'une préparation à usage compassionnel, M sera défini comme la quantité totale de bactériophages fournis par mètre carré de surface corporelle. Ainsi :  $M = \frac{Nt}{SC}$  PFU/m<sup>2</sup> avec :
  - Nt : la quantité de bactériophages envoyés par le fournisseur, correspondant à la somme des produits des titres et des volumes de chaque flacon de phage.
  - SC : la surface corporelle du patient en mètre carré

La limite en endotoxines correspond alors à  $\frac{100 * SC}{Nt}$  UI/PFU. La concentration maximale en endotoxines dans la préparation dépend donc du titre final (T) en bactériophages. La limite en endotoxines sera donc calculée ainsi :  $\frac{100 * SC}{Nt} * T$  UI/ml.

Cette valeur devra être comprise entre 0.05 et 5 UI/ml pour pouvoir mesurer le taux d'endotoxines à l'aide de la procédure utilisée en routine par le secteur hydrologie. Dans le cas contraire une nouvelle procédure devra être validée, avec une gamme adaptée.

La recherche des endotoxines sera réalisée conformément à la Pharmacopée Européenne par un test Limulus, au laboratoire d'hydrologie de la PUI.

### **Contrôle du pH**

Les normes d'acceptabilité seront établies à partir des certificats d'analyse de chaque phage et du solvant de dilution. Il est attendu que les spécifications annoncées par le fournisseur de phages soient elles-mêmes comprises entre 6 et 8. (55) La mesure sera effectuée grâce au pHmètre pHenomenal® du laboratoire de contrôle de la pharmacie de l'Hôpital Sud, selon la méthode potentiométrique décrite dans la Pharmacopée Européenne.

### **Contrôle de l'osmolarité**

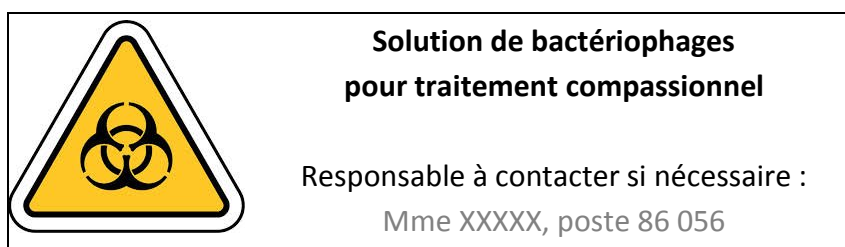
Les limites acceptables pour l'osmolarité seront fixées en tenant compte des caractéristiques du solvant DPBS de la solution de bactériophages et du solvant de dilution. Ces valeurs doivent également garantir une bonne tolérance du patient vis-à-vis de la tonicité du produit. L'osmolarité sera déterminée à l'aide de l'osmomètre du laboratoire de contrôle de la pharmacie de l'Hôpital Sud, par abaissement du point de congélation conformément à la Pharmacopée Européenne.

## ***b. Risques liés au circuit du médicament***

### ***i. Réception et stockage***

La livraison est planifiée avec le fournisseur quelques jours avant la date prévue pour la préparation, de façon à minimiser le temps de stockage à la pharmacie. Le colis sera adressé au pharmacien de la pharmacotechnie qui effectuera la réception.

Un emplacement de stockage sera créé dans la zone de la chambre froide réservée aux médicaments de pharmacotechnie. Une bannette en plastique y sera placée, identifiée par une étiquette similaire à la figure 35 ci-dessous.



*Figure 35 : Etiquette emplacement de stockage*



La réception sera effectuée par un pharmacien, équipé de gants nitriles. Il vérifie la conformité du produit et de son conditionnement par rapport aux certificats d'analyse fourni et aux produits commandés. La conformité de la température du produit pendant le transport devra également être validée.


Les produits réceptionnés devront être placés individuellement dans des sachets hermétiques et placés à l'emplacement de stockage identifié. En cas de dysfonctionnement de la chambre froide, les produits seront transférés dans une autre enceinte climatique, comme le réfrigérateur des essais cliniques. Tous les événements liés au stockage seront documentés précisément dans le dossier de lot.

## ii. Préparation

S'agissant d'une préparation stérile, la manipulation sera effectuée sous un PSM IIB de classe A dans une ZAC de classe B, conformément aux BPP. Les équipements et locaux utilisés seront ceux servant à la préparation de médicaments expérimentaux stériles. La préparation sera réalisée par le personnel habilité à la réalisation de préparations stériles, qui aura reçu une formation concernant la nature des phages.

L'administration étant réalisée au cours d'une opération chirurgicale programmée, il sera prévu suffisamment de personnel qualifié pour garantir la réalisation de la préparation et des contrôles le jour prévu.

Outre les mentions obligatoires pour les préparations magistrales (111), l'étiquetage de la préparation précisera également la nature compassionnelle et virale du produit, ainsi que la voie d'administration choisie. Il sera par ailleurs explicitement indiqué que le produit ne doit pas être administré par voie intraveineuse, comme l'illustre la figure 36 ci-dessous.

Préparation magistrale de bactériophages	
destinée à : <i>NOM Prénom (JJ/MM/AA)</i>	
<b>POUR USAGE COMPASSIONNEL UNIQUEMENT</b>	
	Bactériophages XXXXXX.....XX PFU
	Bactériophages XXXXXX.....XX PFU
	NaCl 0.9% .....qsp XX ml
<b>Réservé à l'administration in situ.</b>	
<b>Ne pas administrer par voie intraveineuse</b>	
Lot : .....	
Péremption : ...../...../..... à .....h.....	
N° d'enregistrement : .....	
Conserver entre +2°C et +8°C	
Pharmacie CHU Rennes, 2 rue Henri Le Guillou 35000 Rennes	

*Figure 36 : Etiquette d'une préparation magistrale de bactériophages à usage compassionnel*

### *iii. Transport*

Le transport jusqu'au bloc opératoire sera réalisé par le pharmacien. La préparation sera placée dans une boîte isotherme rigide scellée, étiquetée au nom du service destinataire avec le symbole « risque biologique ». Un bordereau sera édité, où l'heure de départ de la pharmacie sera notamment indiquée. La réception au bloc opératoire sera assurée par un IDE ou IBODE en charge du patient, équipé de gants. Après avoir vérifié la conformité de la préparation délivrée, il complètera le bordereau en indiquant l'heure de réception. Le pharmacien et l'IDE terminent la traçabilité manuscrite de la dispensation en apposant leurs noms et signant leurs parties respectives.

Les échantillons destinés aux contrôles réalisés sur le site de l'Hôpital Sud seront conditionnés dans un Biotainer® avant d'être placés dans une boîte isotherme rigide scellée, préparée et étiquetée comme décrit précédemment. Le transport sera effectué par les agents du service logistique du CHU assurant le service de navettes entre les différents sites.

## **2. RISQUES POUR LE MANIPULATEUR**

Comme établi dans l'analyse de risque, la matière première et la préparation seront manipulées à toutes les étapes, depuis la réception à l'acheminement dans le service, par du personnel équipé a minima de gants nitriles.

Les bactériophages sont des agents biologiques du groupe 1, qui feront l'objet d'une préparation en système fermé. Le risque d'exposition et de danger pour les manipulateurs étant donc faible, la préparation sera réalisée par du personnel équipé des EPI habituels pour la production de médicaments stériles : gants, masque chirurgical, cagoule, surchaussures et casaque stérile à usage unique. Par principe, certains professionnels seront toutefois dispensés de manipulation, comme les femmes enceintes.

Les contrôles de pH, osmolarité et endotoxines étant réalisés en système ouvert, le manipulateur sera équipé de gants, d'une casaque, d'un masque chirurgical et de lunettes à usage unique.

### **3. RISQUES POUR L'ENVIRONNEMENT**

Afin de ne pas provoquer de contamination croisée, aucune autre préparation ne sera réalisée dans la ZAC en même temps que la préparation de phages et jusqu'à la fin de la procédure de décontamination et d'élimination des déchets.

Un bionettoyage de l'environnement de production sera réalisé conformément à la procédure habituelle à la fin de la préparation puis les surfaces seront traitées par un produit actif sur les phages. En lien avec l'unité d'hygiène hospitalière de l'établissement, le produit Meliseptol® a ainsi été retenu.

L'ensemble des déchets produits et des EPI utilisés pour la préparation et les contrôles seront éliminés via la filière DASRI dès la fin de leur utilisation.

La préparation et les différents échantillons seront placés dans des emballages hermétiques, manipulés de façon à minimiser le risque de contamination de leur surface par des bactériophages. La signalétique « risque biologique » sera apposée sur chaque emballage. L'administration étant réalisée au cours d'une opération chirurgicale, la préparation sera conditionnée dans un double emballage stérile afin de permettre son utilisation dans le respect des règles d'hygiène en bloc opératoire.

## DISCUSSION

Au vu des données de la littérature, et après avoir été sollicitée par le CRIOGO, la PUI du CHU de Rennes a réalisé une étude de faisabilité conduisant à la rédaction et validation de procédures décrivant toutes les étapes du circuit de la phagothérapie compassionnelle. Bien que la qualification de cette matière première non pharmaceutique ne soit pas réalisable, l'analyse des risques a permis d'établir et décrire les contrôles à réaliser sur le produit fini. Le contrôle des impuretés liées au process de fabrication et la recherche de bactériophages tempérés ne sont toutefois pas réalisables en pratique.

Ces produits n'étant pas des médicaments attendus dans l'enceinte de la PUI et dans les services de soin, des précautions supplémentaires doivent être mises en place. Il a donc été décidé que le pictogramme « risque biologique » sera apposé sur tous les éléments relatifs aux bactériophages, bien qu'il ne soit pas forcément jugé nécessaire pour l'accès aux laboratoires dans le cas de virus de groupe 1. Cela rejoint par ailleurs la recommandation de la SFPO concernant l'affichage de ce symbole pour les Car-T cells, alors même que le HCB ne l'impose pour les OGM qu'à partir du niveau C2. (6,28,91)

Les équipements et locaux disponibles permettent d'ores et déjà de préparer des MTI et bactériophages. Toutefois des équipements supplémentaires devraient être acquis, afin notamment de pouvoir travailler en dépression pour réaliser des MTI OGM de classe 2. Ceux-ci devront alors faire l'objet d'une qualification et le manuel qualité devra être revu et complété des nouvelles procédures décrivant les modalités d'utilisation ainsi que la traçabilité des maintenances et requalifications.

A terme, une ZAC unique dédiée aux MTI ne peut cependant pas être estimée suffisante. Les contraintes liées à la thérapie cellulaire et à la thérapie génique ne sont en effet pas les mêmes. Toutefois au vu de la configuration actuelle des locaux de la PUI et du coût que représente la création d'une nouvelle ZAC, cette salle dédiée supplémentaire ne peut être envisagée qu'au travers du projet d'établissement que représente le futur Institut Régional de Cancérologie. Cette nouvelle structure donnera lieu à la création d'un plateau de pharmacotechnie dont un secteur sera dédié aux MTI.

Cela sera l'occasion de repenser également les circuits à mettre en place autour des bactériophages, mais aussi des nouvelles thérapies issues du vivant moins contraignantes en termes de pharmacotechnie, telles que la transplantation de microbiote fécal.

## CONCLUSION

Bien qu'elle constitue une piste très prometteuse dans le traitement des infections bactériennes, le développement de la phagothérapie souffre actuellement d'un cadre réglementaire inadapté voire inexistant. Au vu du nombre toujours croissant d'impasses thérapeutiques causées par les bactéries multirésistantes, une évolution de la législation est donc attendue. Les bactériophages pourraient alors être classés comme médicament biologique, voir même comme médicament de thérapie innovante. La définition légale des MTI, à peine édictée, pourrait donc déjà être revue et élargie. Pour les PUI amenées à faire évoluer leurs locaux pour répondre au décret PUI concernant les MTI, la question des phages doit donc d'ores et déjà être intégrée aux réflexions relatives à la conception des locaux et équipements à utiliser.

En attendant ces évolutions, la PUI du CHU de Rennes s'est préparée afin d'accompagner le CRIOGO dans la mise à disposition, en dernier recours, de la phagothérapie compassionnelle pour les patients souffrant d'infections ostéoarticulaires chroniques multirésistantes. Les démarches sont ainsi en cours pour le premier patient qui pourrait bénéficier de ce traitement en Bretagne, en fonction de l'avis de l'ANSM.

La pharmacotechnie du CHU de Rennes s'est également engagée dans une démarche d'évolution afin d'obtenir l'autorisation à la préparation de MTI, conformément au décret PUI de 2019. Outre la pérennisation de l'activité MTI déjà développée, cette autorisation permettra la préparation de médicaments OGM de classe C2. Le contexte sanitaire lié au COVID a toutefois perturbé les projets de la pharmacie, et les demandes d'équipements sont restées en attente. Un travail conséquent de mise en place et qualification restera donc à faire lors de leur installation.

## **ANNEXES**

### *Annexe 1 : Description des différentes contraintes applicables à l'utilisation de médicaments OGM en laboratoire (d'après le manuel du HCB)*

#### **Confinement C1**

- **Pratiques de travail**

- *Les surfaces de travail sont nettoyées et désinfectées chaque jour et immédiatement après tout incident conduisant au déversement d'organismes contenant des molécules d'ADN recombinant.*
- *Tous les déchets biologiques et les fluides sont stérilisés (ou à défaut inactivés par des procédures validées) avant destruction ou rejet. Les matériels contaminés par des microorganismes génétiquement modifiés tels que la verrerie, les cages pour les animaux et les équipements de laboratoire doivent être décontaminés avant le lavage, le réemploi ou la destruction.*
- *Le matériel de pipetage mécanique doit être utilisé, le pipetage à la bouche est interdit.*
- *Les manipulations doivent être faites de manière à minimiser la création d'aérosols.*
- *Manger, boire, conserver des aliments, et toute activité qui n'est pas en lien avec l'expérimentation ne sont pas autorisés dans l'aire de travail.*
- *Le port d'une blouse, ou d'un vêtement spécifique de laboratoire est requis. Les vêtements de laboratoire ne sont pas portés en dehors du site.*
- *Le personnel doit se laver les mains après avoir été en contact avec des organismes contenant des molécules d'ADN recombinant et également quand il quitte le laboratoire.*

- **Équipement de confinement** : *Un équipement spécial de confinement n'est pas requis au niveau C1.*

- **Agencement spécial du laboratoire** : *Un modèle spécial de laboratoire n'est pas requis au niveau C1.*

## **Confinement C2 : en plus des contraintes décrites pour la classe C1**

- **Pratiques de travail**

- *Les portes du laboratoire sont maintenues fermées pendant que les expériences sont en cours.*
- *Tous les déchets biologiques et les fluides sont inactivés par des procédures validées avant destruction ou rejet. Les matériels contaminés tels que verrerie, cage pour les animaux et équipement de laboratoire doivent être décontaminés avant le lavage, le réemploi ou la destruction.*
- *Des soins doivent être apportés pour minimiser la création d'aérosols. Par exemple, on évitera les manipulations telles que l'insertion d'une boucle ou d'une aiguille à inoculer chaude dans la culture, le flambage jusqu'à crépitements d'une boucle ou une aiguille à inoculer, et l'éjection sous pression des fluides des pipettes ou des seringues.*
- *Les déchets et matériels qui sont décontaminés hors de la zone C2 doivent être placés dans un conteneur résistant et étanche qui est fermé et désinfecté extérieurement avant le transport hors du laboratoire. Un système doit permettre d'identifier le conteneur et d'éviter son ouverture avant stérilisation. L'ensemble de l'opération fait l'objet d'une procédure écrite.*
- *Seules les personnes autorisées et qui ont été informées de la nature des recherches entreprises peuvent entrer dans le laboratoire.*
- *Le symbole international de biorisque doit être placé sur toutes les portes d'accès du laboratoire. Les congélateurs et réfrigérateurs utilisés pour mettre en dépôt des organismes contenant des molécules d'ADN recombinant doivent également comporter le symbole international de biorisque s'ils sont à l'extérieur du laboratoire.*
- *Un programme de contrôle des insectes et des rongeurs doit être institué.*
- *Les animaux et les plantes qui ne sont pas en relation avec l'expérience ne sont pas autorisés dans le laboratoire.*



- **Equipement de confinement**

*Des postes de sécurité biologique seront utilisés pour contenir les équipements produisant des aérosols, tels que mélangeurs, lyophilisateurs, générateurs de son et centrifugeuses, sauf si le modèle de l'équipement fournit le confinement pour les aérosols potentiels. Par exemple, une centrifugeuse peut fonctionner à l'air libre si les tubes sont munis d'un couvercle étanche ou si les tubes sont placés dans une nacelle étanche pendant la centrifugation. Les tubes ou l'enceinte étanche sont ensuite transportés dans un PSM de type II pour être ouverts. Les manipulations qui comportent des risques potentiels de dispersion d'OGM sont effectuées sous des PSM de type II. Les PSM doivent être certifiés par le LNE et testés selon les normes en vigueur. Des gants sont portés par les utilisateurs pendant toute la durée des manipulations qui comportent des risques potentiels et ils sont décontaminés avant d'être jetés, immédiatement après la fin de ces manipulations.*

- **Agencement spécial du laboratoire**

*La ventilation des salles dédiées aux activités techniques est assurée par un dispositif de ventilation mécanique, conformément à l'article R. 232-5-6 du code du travail. Un autoclave pour la stérilisation des déchets et des matériels contaminés doit être disponible à proximité du lieu où sont manipulés des OGM. Les conduites de vide doivent être protégées par des filtres afin de ne pas contaminer le système générateur de vide en cas de rupture de vide ou de reflux.*

### **Confinement C1**

*Le HCB recommande que les déchets, solides et liquides, soient inactivés pour stériliser l'OGM sur le site de production, par traitement physique ou chimique validé. En l'absence de possibilité d'inactivation sur place, les déchets solides pourront par exemple être placés dans des containers adaptés, verrouillables et avec un étiquetage mentionnant qu'il s'agit d'OGM, et éliminés par un prestataire de service agréé pour l'élimination des déchets biologiques infectieux (DASRI), ou éliminés par toute autre méthode proposée permettant une inactivation empêchant toute dissémination de l'organisme dans l'environnement. Les déchets inactivés sont alors considérés comme des Déchets Industriels Banals (DIB) ou assimilables à des Ordures Ménagères (OM).*

#### **Cas particulier des essais cliniques de thérapie génique en milieu hospitalier :**

- La définition des conditions du traitement des déchets incombe au promoteur de l'essai qui doit valider les protocoles.*
- Pour les OGM de confinement C1, en l'absence avérée de possibilité d'inactivation sur place (par exemple par autoclavage à 134°C et 20-30 minutes de plateau de stérilisation pour les déchets solides), les déchets (y compris gants, masques, blouses jetables) pourront être placés dans des containers pour déchets infectieux avec étiquetage mentionnant qu'il s'agit d'OGM, le nom du service et de son responsable, avec son n° de téléphone. La traçabilité de ces containers doit être assurée jusqu'au lieu de destruction finale.*
- Pour les déchets liquides qui ne pourraient pas être autoclavés, il est par exemple possible d'utiliser de l'hypochlorite de sodium (eau de javel) à 0,43% de chlore actif final en contact pendant 12 h minimum. D'autres traitements validés peuvent être utilisés sous l'entière responsabilité des opérateurs. Leur utilisation devra être détaillée dans le dossier.*

## **Confinement C2**

- *Déchets liquides : inactiver dès leur production (traitement physique ou chimique).*
- *Déchets solides : placer dans des conteneurs étanches et inactiver par autoclavage.*
- *Les déchets inactivés solides sont ensuite éliminés par la filière de conteneurs pour DASRI : enlèvement, transport jusqu'au lieu de traitement par un prestataire de service agréé, et réception BSDAS (Bordereau de Suivi des Déchets d'Activité de Soins).*

Niveau de confinement	C1	C2	C3	C4
Lieu de traitement	Sur le lieu de production/utilisation	Sur le lieu de production/utilisation	Sur le lieu de production/utilisation	Les procédures sont spécifiquement validées par le comité de pilotage du site.
Procédé inactivation des déchets solides	Traitement physique (autoclave de stérilisation) ou traitement chimique validé Sauf litières (filière DIB)	Traitement physique (autoclave de stérilisation)	Traitement physique (autoclave de stérilisation)	
Procédé inactivation des déchets liquides	Traitement physique (autoclavage ou traitement thermique)	Traitement physique (autoclavage ou traitement thermique)	Traitement physique (autoclavage ou traitement thermique), y compris pour les effluents des éviers, les douches et les effluents de l'autoclave	
Caractéristiques de l'autoclave de stérilisation	Situé sur le site	Situé dans le même bâtiment	A double entrée, situé au sein / en barrière du laboratoire, inactivation des effluents	
Procédé inactivation des déchets liquides (si traitement thermique impossible)	traitement chimique Ou autre méthode validée.	traitement chimique Ou autre méthode validée.	traitement chimique Ou autre méthode validée.	
Filière d'élimination après traitement	Filière DIB (assimilés déchets ménagers)	Filière DASRI «DAS à risque infectieux »	Filière DASRI «DAS à risque infectieux »	
Traitement (si inactivation sur site impossible)	Conteneur verrouillable + étiquetage OGM + élimination par filière DASRI «DAS à risque infectieux »	Non applicable	Non applicable	
Cas spéciaux :				
Déchets chimiques toxiques	Filière «DAS à risque chimique toxiques »	Filière «DAS à risque chimique toxiques »	Filière «DAS à risque chimique toxiques »	
Déchets radioactifs	Filière «DAS à risque radioactif »	Filière «DAS à risque radioactif »	Filière «DAS à risque radioactif »	
Cadavres et pièces anatomiques d'animaux	Incinération (filière « DAS pièces anatomiques »)	Incinération (filière « DAS pièces anatomiques »)	Incinération (filière « DAS pièces anatomiques »)	

### Annexe 3 : Etudes publiées avant 1918 concernant probablement les bactériophages (43)

Reference	English translation of title
Frankland P. Ueber das Verhalten des Typhusbacillus und des Bacillus coli communis im Trinkwasser. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 1895; 19:393–407	On the behavior of the typhoid bacillus and the common Bacillus coli in drinking water
Hankin ME. L'action bactéricide des eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du choléra. Annales de l'Inst Pasteur 1896; 10:511–23	The bactericidal action of waters of Jumna and Ganges on the cholera microbe
Hankin ME. Les microbes des rivières de l'Inde. Annales de l'Inst Pasteur 1896; 10:175–6	The microbes of the rivers of India
Gamaleya NF, 1898. Бактериолизы—ферменты, разрушающие бактерий. Russ Arch Pathol Clin Med Bacteriol 6:607–13	Bacteriolysins-ferments destroying bacteria <sup>1</sup>
Emmerich R, Löw O. Bakteriolytische Enzyme als Ursache der erworbenen Immunität und die Heilung von Infektionskrankheiten durch dieselben. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 1899; 31:1–65	Bacteriolytic enzymes as the cause of acquired immunity and cure for infectious diseases
Gamaleia. Bakteriolytine—bakterienzerstörende Fermente. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten 1899; 26:661–3 <sup>2</sup>	Bacteriolysins-bacteria-destroying enzymes
Emmerich R, Löw O. Die künstliche Darstellung der immunisierenden Substanzen (Nucleasen-Immunoproteidine) und ihre Verwendung zur Therapie der Infektionskrankheiten und zur Schutzimpfung an Stelle des Heilserums. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 1901; 36:9–28	The artificial preparation of the immunizing substances (nuclease-immunoproteins) and their use in the treatment of infectious diseases and for vaccination in place of healing serum
Klein A. Die physiologische Bakteriologie des Darmkanals. Archiv für Hygiene 1902; 45:117–76	The physiological bacteriology of the intestinal canal
Krencker E. Über Baktericidie von Bakterienfiltraten. Inaug-Diss, Straßburg 1903	On the bactericidal activity of bacterial filtrates
Lode A. Experimentelle Untersuchungen über Bakterienantagonismus. I. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten 1903; 33:196–208	Experimental studies on bacterial antagonists. I
Eijkman C. Ueber thermolabile Stoffwechselprodukte als Ursache der natürlichen Wachstumshemmung der Mikroorganismen. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten 1904; 37:436–49	On the thermolabile metabolites as a cause of the natural growth inhibition of microorganisms
Conradi H, Kurpjuweit O. Ueber spontane Wachstumshemmung der Bakterien infolge Selbstvergiftung. I. Muenchener Medizinische Wochenschrift 1905; 52:1761–4	On the spontaneous growth inhibition of bacteria due to self poisoning. I
Conradi H, Kurpjuweit O. Ueber die Bedeutung der bakteriellen Hemmungsstoffe für die Physiologie und Pathologie des Darms. II. Muenchener Medizinische Wochenschrift 1905; 52:2164–8	On the importance of bacterial inhibition materials for the physiology and pathology of the intestine. II
Eijkman C. Ueber die Ursache der Wachstumshemmung in Bakterienkulturen. Berliner Klinische Wochenschrift 1906; 43:499	On the cause of growth inhibition in bacterial cultures
Eijkman C. Ueber natürliche Wachstumshemmung der Bakterien. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten 1906; 41:367-9 and 471–4	On the natural growth inhibition of bacteria
Manteufel. Untersuchungen über die „Autotoxine“ (Conradi) und ihre Bedeutung als Ursache der Wachstumshemmung in Bakterienkulturen. Berliner Klinische Wochenschrift 1906; 43:313–8	Studies on the “Auto toxins” (Conradi) and their importance as the cause of growth inhibition in bacterial cultures
Oebius R. Ueber spontane Wachstumshemmung der Bakterien auf künstlichem Nährboden. Medizinische Klinik 1906; 1906:598–601	On the spontaneous growth inhibition of bacteria on artificial media
Passini F. Die bakteriellen hemmungsstoffe Conradis und ihr Einfluss auf das Wachstum der Anaërobie des Darmes. Wiener klinische Wochenschrift 1906; 19:627–30	Conradi's bacterial inhibition materials and their influence on the growth of the anaerobic bacteria of the intestine
Rahn O. Ueber den Einfluss der Stoffwechselprodukte auf das Wachstum der Bakterien. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten 1906; 16:417–29	On the influence of metabolites on the growth of bacteria
Rolly [S.] Experimentelle Untersuchungen über das biologische Verhalten der Bakterien im Dickdarm. Deutsche medizinische Wochenschrift 1906; 32:1733-7.	Experimental studies on the biological behavior of the bacteria in the colon
Eijkman C. Ueber die Ursache der Wachstumshemmung in Bakterienkulturen. Deutsche medizinische Wochenschrift 1907; 33:265–6	On the cause of growth inhibition in bacterial cultures
Manteufel. Das Problem der Entwicklungshemmung in Bakterienkulturen und seine Beziehungen zu den Absterbeerscheinungen der Bakterien im Darmkanal. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten 1907; 57:337–54	The problem of resistance development in bacterial cultures and its relationship to the products of dying bacteria in the gut
Faltin R. Studien über Hetero- und Isoantagonismus, mit besonderer Berücksichtigung der Verhältnisse bei infektiösen Erkrankungen der Harnwege. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten 1908; 46:6–20	Studies on hetero- and isoantagonism, with special consideration of relationships in infectious diseases of the urinary tract
Remlinger P, Nouri O. Les géloses dites vaccinées. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances et Mémoires de la Société de Biologie 1908; 65:361–3	Inoculated agar media
Kantorowicz A. Bakterien-Antifermente und Bakteriolyse. Munchener Medizinische Wochenschrift 1909; 56:897–900	Bacterial fermentation inhibitors and bacterial lysis
de Waele H. Protéolase et antiprotéolase dans les cultures microbiennes. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten 1909; 50:40–4	Proteolytic enzymes and enzyme inhibitors in microbe cultures
Twort FW. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. Lancet 1915; 2:1241–3	An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses
Gildemeister E. Ueber Variabilitätserscheinungen des Typhusbacillus, die bereits bei seiner Isolierung aus dem infizierten Organismus auftreten. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten 1916; 78:209–25	Variability phenomena of the typhoid bacillus which already show up at the time of its isolation from the infected organism
d'Hérèlle F. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. C R Acad Sci Ser D 1917; 165:373–5	On an invisible microbe antagonistic to the dysentery bacillus
Gildemeister E. Weitere Mitteilungen über Variabilitätserscheinungen bei Bakterien, die bereits bei ihrer Isolierung aus dem Organismus zu beobachten sind. Centralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten 1917; 79:49–62	Further reports on the occurrence of variability in bacteria that is already observed at the time of their isolation from the (host) organism

<sup>1</sup>The title listed is the English translation provided by Bardell.<sup>89</sup> A direct translation is “Bacteriolysins-bacteria-destroying ferments”. See, however, the following footnote. <sup>2</sup>This is an overview of a number of Gamaleia/Gamaleya papers including the 1898 paper listed previously. The title listed with this entry is an English translation of the German.

## PHAGE ACTIVE PHARMACEUTICAL INGREDIENTS

### DEFINITION

Phage active pharmaceutical ingredients (APIs) are pharmaceutical raw materials containing naturally occurring bacteriophages (phages in short), which are viruses that infect bacteria. Phages are composed of proteins that encapsulate a DNA or RNA genome, and may have relatively simple or elaborate structures. Phages replicate within a bacterium following the injection of their genome into its cytoplasm.

Phage APIs are intended for use as active ingredients of phage magistral preparations for *in vivo* treatment of bacterial infections (phage therapy).

Phage APIs are available as aqueous physiological solutions containing natural lytic phages (e.g., saline or glucose solutions) that may contain a buffer or as dried or freeze-dried powder. As active ingredients of magistral preparations, they are intended to be diluted or reconstituted and/or combined with the necessary excipients, in a hospital pharmacy officina, immediately before use on a named patient basis. Dosage forms may consist of capsules, creams, ointments, liquid preparation for oral use, cutaneous application, inhalation or parenteral administration, etc. The excipients needed to formulate these dosage forms must allow the required phage activity during the intended application period.

Each phage API contains one phage strain and various phage strains APIs may be combined into one magistral preparation to broaden the spectrum of activity of the medicine.

*The magistral preparation of phage therapy products is a practical way for medical doctors to personalize antibacterial treatments.*

*This monograph does not apply to phage derived products such as phage endolysins. It does not necessarily apply to phage products for veterinary use or for decontamination purposes.*

*In addition to the requirements specified in this general monograph, specific requirements for production, in process testing and release testing might be included in individual monographs.*

### PRODUCTION

#### MANUFACTURING PROCESS

Phage APIs are generally obtained by propagation in host bacterial strains and are purified using appropriate methods shown to preserve the biological properties of the phages. Phage APIs are manufactured under conditions designed to minimise microbial contamination and phage degradation. Purification procedures need to be designed to minimize the content of harmful bacterial or culture medium components (e.g., bacterial endotoxins and animal products).

*The manufacturing process must be described in detail (equipment, materials, culture media, additives, culture conditions, purification steps...) in standard operating procedures (SOPs) and must be validated to confirm that the process can reliably output phage APIs of a determined standard.*

*The following manufacturing process has shown to be suitable for the small-scale production of qualitatively acceptable and safe phage APIs. It is indicative and based on the state of the art and available knowledge from peer reviewed scientific literature.*

*The manufacturing process comprises various stages.*

**De novo phage isolation.** Natural phages are generally isolated from environmental samples such as sewage and river water or from clinical samples. Usually, the sample, culture medium and phage sensitive host bacteria (typically  $10^7$ - $10^8$  colony forming units (cfu)) are mixed in a sterile container and incubated under appropriate conditions (typically at 37°C for 1-3 h). If justified, a small volume of chloroform is added and the container is further incubated at 4°C for a short period of time (typically for 1 h). Host bacteria are removed using membrane filtration (0.2-0.5 µm) or by centrifugation. Usually, phages are isolated on bacteriophage sensitive bacteria following the 'double agar overlay method'. Phage lysate is mixed with lukewarm (typically 45°C) culture medium containing 0.5-1% agar and a suspension of bacteriophage sensitive host bacteria (typically  $10^7$ - $10^8$  cfu/ml) in a sterile container. This mixture is transferred to a sterile cell culture container with culture medium containing 1-3% agar and incubated under appropriate conditions (typically at 37°C for 12-36 h). The resulting plaques ('clear' zones formed in a lawn of bacterial cells due to lysis by phages) with different morphology are transferred to sterile culture media in sterile containers and incubated under appropriate conditions (typically at 37°C for 1-3 h). If justified, a small volume of chloroform is added and the containers are further incubated at 4°C (typically for 1 h). For each container, a dilution series (typically log(0) - log(-8)) is made in sterile containers filled with culture medium. A part from each dilution is mixed with lukewarm (typically 45°C) culture medium containing 0.5-1% agar and a suspension of bacteriophage sensitive host bacteria (typically  $10^7$ - $10^8$  cfu/ml) in a sterile container. This lysate mixture is transferred to cell culture containers with culture medium containing 1-3% agar and incubated (typically at 37°C for 12-36 h). Plates showing 1-10 plaques are visually analysed. Again, all plaques with different morphology are transferred to sterile culture medium in sterile containers and incubated (typically at 37°C for 1-3 h). This complete cycle is repeated until phage lysates with one plaque morphotype, containing one phage clone, are obtained (homogeneous plaques).

*If warranted, phages can be incited to evolve in vitro to exhibit broader host range or higher lytic activity under physiological conditions (e.g., temperature and pH).*

**Phage seed lots.** Phage seed lots are usually prepared using a slightly modified double-agar overlay method. If justified, another adequate solidifying agent than agar can be used. Monoclonal phage lysate (typically containing  $10^3$ - $10^5$  plaque forming units (pfu)) is mixed with lukewarm (typically 45°C) culture medium containing 0.5-1% agar and a suspension of phage sensitive host bacteria (typically  $10^7$ - $10^8$  cfu/ml) in a sterile container. This mixture is transferred to a sterile cell culture container with culture medium containing 1-3% agar and incubated (typically at 37°C for 12-36 h). If justified, a small volume of chloroform is added and the container is further incubated at 4°C (typically for 1 h). The top agar layer is recuperated and transferred to a sterile container. *Alternatively, buffer solution is added to the top agar layer. The cell culture container is shaken (typically for 1-3 h) and the buffer solution is recuperated.* Bacterial cells and cell debris are removed, usually by centrifugation (e.g., 20 min at 6 000g) followed by membrane filtration (0.2-0.5 µm). Phage seed lots can be stored using validated preservation/storage (cooling, cryopreservation, freeze-drying...) methods.

**Phage APIs.** Phage APIs are prepared in the same way as phage seed lots, but starting from characterised and quality controlled phage seed lots instead of phage lysates. If justified, other agreed manufacturing methods can be used. In addition, bioburden as well as the levels of impurities, including endotoxins (especially for Gram negative host bacteria) are minimized using appropriate methods (e.g.

dedicated filters, affinity columns, tangential flow filtration, cesium chloride banding).

#### QUALITY SYSTEM AND PRODUCTION ENVIRONMENT

Phage seed lots and phage APIs should be manufactured under a quality system.

The manufacturing of phage APIs from phage seed lots takes place in an environment with specified air quality and cleanliness to minimize the risk of contamination. The effectiveness of these measures is validated and monitored. Where phage APIs are exposed to the environment during processing, without a subsequent microbial inactivation or removal process, an air quality with particle counts and microbial colony counts equivalent to those of Grade A as defined in the current European Guide to Good Manufacturing Practice (GMP), Annex 1 and Directive 2003/94/EC is required with, if the system is not closed, a background environment at least equivalent to GMP Grade B in terms of particles and microbial counts. The biosafety level (BSL) is determined by the host bacteria used in the production processes (e.g., BSL-2 for *Pseudomonas aeruginosa*).

#### EQUIPMENT AND MATERIALS

All equipment and material are designed and maintained to suit its intended purpose and must minimize any hazard to recipients and staff. All critical equipment and technical devices are identified and qualified, regularly inspected and preventively maintained in accordance with the manufacturers' instructions. Where equipment or materials affect critical processing or storage parameters (e.g., temperature, pressure, particle counts and microbial contamination levels), they must be identified and subjected to appropriate monitoring, alerts, alarms and corrective action, as required, to detect malfunctions and defects and to ensure that the critical parameters are maintained within acceptable limits at all times. All equipment with a critical measuring function is calibrated against a traceable standard if available. Maintenance, servicing, cleaning, disinfection and sanitation of all critical equipment are performed regularly and recorded accordingly.

SOPs detail the specifications for all critical materials and reagents. In particular, specifications for culture media, additives (e.g., solutions) and packaging materials are defined. Where applicable, reagents and materials meet compendial requirements and/or documented specifications and the requirements of Regulation 2017/745 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on medical devices and Regulation 2017/746 of the European Parliament and of the Council of 5 April 2017 on *in vitro* diagnostic medical devices. Animal component free culture media and additives should preferably be used. If materials of human or animal origin are used, measures to control endogenous and adventitious agents including transmissible spongiform encephalopathy (TSE) agents should be implemented. Material from TSE-relevant animal species should be subjected to a risk assessment to demonstrate that TSE risk factors have been considered and that the risk has been minimized by applying the principles described in the general text Ph. Eur. 5.2.8 and the Note for Guidance on Minimizing the Risk of Transmitting Animal Spongiform Encephalopathy Agents via Human and Veterinary Medicinal Products (EMA/410/01). Compliance to these requirements may be demonstrated on production of a TSE Certificate of suitability granted by the EDQM.

**Host bacteria** used in the manufacturing process are as safe (or least pathogenic) as possible. Non-lysogenic bacterial strains are used, if possible.

#### TESTS

*Various tests can be applied, but validated tests measuring the identity and quantity of phages, bioburden, bacterial endotoxin levels, pH and, where relevant, water content and residual chloroform of phage APIs, performed by a Belgian Approved Laboratory, are mandatory.*

#### HOST BACTERIA

**Identification.** State of the art clinical microbiology techniques.

#### PHAGE SEED LOTS

**Phage identification.** State of the art DNA or RNA sequencing and genome analysis. When reliable *in silico* morphology prediction is not possible, phage morphology should be determined by electron microscopy.

**Phage enumeration.** The phage enumeration of the phage seed lot should be determined using an appropriate method (e.g. pfu determination, qPCR).

**Phage purity.** Absence of adventitious agents (e.g., other phages, bacteria, viruses) should be demonstrated using an appropriate method, unless otherwise justified (e.g. virus testing may be omitted if no or only autoclave-sterilized material of human or animal origin is used).

**Detection of genetic determinants conferring toxicity, virulence, lysogeny and antibiotic resistance.** State of the art DNA or RNA sequencing and genome analysis.

Raw sequencing data must be provided in a broadly accepted format (e.g. FASTQ) to a Belgian Approved Laboratory for review and approval.

#### PHAGE APIs

*All tests are performed under appropriate quality standards (e.g. ISO 17025).*

**Phage identification.** The phage strain of a phage API is determined using a validated or qualified phage identification test (e.g. specific PCR, qPCR).

**Quantitative assessment of phages.** The potency of the phage API is determined using a validated or qualified assay (e.g. phage-specific qPCR).

**Quantitative bioburden determination** (EP 2.6.12). The total aerobic microbial count is determined using the official Ph. Eur. method or, where justified and authorised, using a validated alternative method. Phage APIs are required to contain  $\leq 10$  cfu/100 ml or g.

**Bacterial endotoxins** (EP 2.6.14). The test for bacterial endotoxins is used to detect and quantify endotoxins of gram-negative bacterial origin using amoebocyte lysate from horseshoe crab (*Limulus polyphemus* or *Tachypleus tridentatus*). The endotoxin concentration in the phage API should remain below the endotoxin threshold specified in the individual monograph. The endotoxin limit depends on the final therapeutic product (magistral preparation) and its route of administration and is stated in the individual monograph according to compendial requirements. *The maximal dose administered by the intended route per hour should not contain sufficient endotoxin to cause a toxic reaction. For instance, as stated in EP 5.1.10, the maximum dose for intravenous injection is 5 Endotoxin Units (EU)/kg/h.*

**Potentiometric determination of pH** (EP 2.2.3). The pH should conform to the pH specifications set forth in the individual monograph, usually 6.0-8.0 pH.

**Water content** (EP 2.5.12 or 2.5.32). Dried phage APIs are tested for water content. The maximum water content is 3.0 per cent m/m, unless otherwise stated in specific monograph (e.g. APIs intended for oral lyophilisates).

**Impurities.** Process-related impurities should be quantified

and qualified. In particular, when chloroform or any other particular reagent is used in the manufacture of the phage API, an appropriate validated procedure is to be employed for the quantification of the residual chloroform/reagent. Appropriate acceptance criteria should be set up such that the amounts of chloroform/reagent intake are consistently below levels that are demonstrated to be safe.

#### STORAGE

Phage APIs should be stored under the conditions specified in the individual monograph.

#### SHELF LIFE

Phage quantity using a stability indicative method, bioburden, pH and, where relevant, water content are periodically determined. The shelf life is the time period during which phage quantity, bioburden, pH and, where relevant, water content of the API remain within the limit thresholds specified in the individual monograph.

#### LABELLING

The label states:

- the identity and quantity of the phages within the API;
- the type of species and strain of host bacteria used as a substrate for the production of the phage API;
- the type of species and strains of bacteria that the phages are able to lyse;
- the storage conditions;
- the production date;
- the expiration date;
- for dried preparations:
  - the name, composition and volume of the reconstituting liquid to be added;
  - the period of time within which the preparation is to be used after reconstitution;
- instructions for reporting serious adverse reactions and/or events;
- instructions how to dispose of unused (expired) bacteriophage products.

#### SURVEILLANCE

The clinical use of phage API based magistral preparations must be surveyed and reported, including possible adverse events and reactions associated with their use. A centralized reporting system and a register for therapeutic phage applications are warranted.



## Annexe 5 : Evaluation de la phagothérapie dans les infections pulmonaires chez l'animal (59)

**Tableau I.** Principaux travaux ayant évalué l'intérêt d'un traitement par bactériophages dans différents modèles d'infection pulmonaire chez l'animal.

Bactérie	Animal	Infection / Traitement	Principaux résultats
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souris	IN / IN	Réduction de la charge bactérienne (évaluée par bioluminescence)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souris	IN / IN	Réduction de la charge bactérienne (évaluée par bioluminescence et compte), augmentation de la survie, moindre inflammation
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souris	IN / IN	Réduction de la charge bactérienne (compte), augmentation de survie. Efficacité curative et préventive
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souris	IN / IN	Étude de la corrélation entre activité <i>in vitro/in vivo</i> . Réduction de la charge bactérienne, augmentation de la survie
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Souris	IN / IP	Réduction de la charge bactérienne. Diminution de l'inflammation. Effet d'une formulation liposomale sur l'approche préventive
<i>Escherichia coli</i>	Souris	IN / IN	Réduction de la charge bactérienne (évaluée par bioluminescence et compte), augmentation de la survie, moindre inflammation
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Vison	IN / Aér. ou IN	Réduction de charge bactérienne (compte), augmentation de la survie, absence de toxicité par doses répétées
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Souris	IN / IN	Réduction de la charge bactérienne, diminution de l'inflammation
<i>Staphylococcus aureus</i>	Souris	IN/ IP	Souris neutropéniques. Réduction de la charge bactérienne (compte), augmentation de la survie, moindre inflammation
<i>Escherichia coli</i> (APEC)	Poulet	IT / IT, eau, IO	Pas d'effet sur la mortalité, pas d'effet sur les lésions histologiques macroscopiques
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Souris	IT / IN ou IP	Réduction de la charge bactérienne (compte), moindre inflammation
<i>Burkholderia cenocepacia</i>	Souris	Aér. / Aér. ou IP	Souris neutropéniques. Réduction de la charge bactérienne. Effet nul par voie IP
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Souris	IN / IP	Réduction de la charge bactérienne (compte)
<i>Escherichia coli</i> (APEC)	Poulet	IPulm / IM	Réduction de la mortalité, réduction de lésions macroscopiques
<i>Escherichia coli</i> (APEC)	Poulet	Infection spontanée / eau et Aér.	Réduction de mortalité dans un essai grandeur nature en élevage (batterie de 5000-10000 poulets)
<i>Escherichia coli</i> (APEC)	Poulet	IT / IT	Réduction de mortalité, réduction de la charge bactérienne, réduction de morbidité (perte de poids)

**Abbreviations.** Aér. : aérosol ; APEC (avian pathogenic *E. coli*) : souches responsables de colibacillose aviaire ; IM : intramusculaire ; IN : intranasal ; IP : intrapéritonéal ; IPulm : intrapulmonaire ; IO : intraoesophagien ; IT : intratrachéal.



## Annexe 6 : Utilisation compassionnelle de bactériophages entre 2006 et 2018 (50)

Age; Sex	Symptom Onset; PT Start	Clinical Symptoms	Bacteria	Phage Therapy	Outcome
20; F	2004; 2006	Suppurating chronic otitis; intense pain	<i>S. aureus</i>	Commercial anti- <i>S. aureus</i> suspension; ear drop instillations (15 days)	2006 Complete cure
44; M	2005; 2008	Accidental fall; multiple fractures ( <i>n</i> = 37); amputation considered	<i>S. aureus</i>	Commercial anti- <i>S. aureus</i> and Pyophage suspensions; administered peroperatively over several weeks	2009 Wound closure and complete cure
25; M	2007; 2008	Road accident causing multiple trauma; uncontrolled pelvic bone infection	<i>S. aureus</i> <i>P. aeruginosa</i>	Anti- <i>S. aureus</i> and anti- <i>P. aeruginosa</i> phage suspension; administered peroperatively and via catheter in days following operation (Belgium).	2010 Complete cure
40; F	1995; 2009	Fall leading to complex fracture of the right foot; Planned amputation	<i>S. aureus</i>	Commercial anti- <i>S. aureus</i> suspension administered peroperatively and via catheter in the days following operation	2009 Wound closure and complete cure
60; M	2008; 2009	Fistulised abdominal plaque infection; continuous suppressive antibiotic administration	Methicillin resistant <i>S. aureus</i> (MRSA)	Commercial anti- <i>S. aureus</i> suspension administered via fistula	2010 No recurrence without any antibiotic over 4 years
80; F	2008; 2010	Knee prosthesis infection unsuitable for surgery	<i>P. aeruginosa</i>	Commercial broad spectrum multi-bacteriophage suspension; Knee joint injection	2012 <i>P. aeruginosa</i> clearance, but appearance of <i>Enterococcus</i> sp.
61; F	1995/2005; 2010	Operated tongue cancer; Dental extraction, jaw fracture, osleo-synthesis and fistulised infection	<i>S. aureus</i> (MRSA)	Commercial anti- <i>S. aureus</i> suspension administered peroperatively	2011 Complete cure
90; F	2009/2010; 2010	Femoral fracture under hip prosthesis; Drained hematoma and antibiotherapy-infection	<i>S. aureus</i> (MRSA)	Commercial anti- <i>S. aureus</i> suspension administered peroperatively by flooding the infection site and via catheter in the 10 days following the operation	2011 Complete cure, rapid recovery without recurrence after 1 year with retention of the hip prosthesis and osteosynthesis material <i>in situ</i>
20; M	2012; 2012	Chronic Ulcerative Colitis with liver complications. Severe weight loss (54 kg down from 80 kg). Poor digestion of food.	<i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> spp. <i>S. aureus</i> (Urine) <i>S. aureus</i> (skin) <i>E. coli</i> , <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Proteus mirabilis</i> (stool)	Treatment in Tbilisi (Georgia) with 2 commercially available phage suspensions plus special customised phage suspension. Probiotics, enzymes and Camelyn immune stimulant also given. Treatment lasted 1 month.	2012 Healing with sterilisation of urine, reduction of <i>E. coli</i> and <i>P. vulgaris</i> growth from high ( $10^8$ ) to low ( $<10^2$ ) in stool. Weight gain to 72 kg by end of treatment. Digestion improved but still poor
72; F	2009; 2013	Left knee prosthesis infection	<i>Staphylococcus</i> sp.	Commercial anti- <i>S. aureus</i> suspension administered peroperatively by flooding the infection site	2013 Initial partial disinfection with closure of several fistula followed by stabilisation
84; M	1943/2012; 2013	Osteomyelitis of the left tibia; Fistula next to the wound	<i>S. aureus</i> (MRSA)	Initial phage therapy treatment in Tbilisi via fistula with temporary improvement, followed by surgical follow up intervention in France in 2013; Commercial anti- <i>S. aureus</i> suspension administered peroperatively by flooding the infection site	2013 Complete cure
58; F	2000; 2013	Acoustic neuroma with nosocomial infection of the ENT and ophthalmic regions	<i>S. aureus</i>	Treatment in Tbilisi with locally produced phage suspensions administered locally and orally	2013 Complete cure allowing an ophthalmic intervention of the retina that had been delayed for several years
68; F	1973; 2015	Operated left tibia fracture, followed by re-opened bone infection 2013: Travel to Phage Therapy Center (Tbilisi)	<i>S. aureus</i>	Surgery, phage therapy with commercial staphylococcal phage suspension, and antibiotherapy	2016 Disappearance of <i>S. aureus</i> replaced by <i>P. aeruginosa</i> & <i>Streptococcus constellatus</i> , followed by complete cure without recurrence
84; M	2006 & 2015; 2016	Prostate adenectomy with chronic urinary infection and bacteraemia	Extended-spectrum beta-lactamase <i>E. coli</i> (ESBL)	Anti- <i>E. coli</i> phage suspension administered per os and rectally	2018 Complete cure
86; M	2016; 2018	Recurring prostatitis with bacteraemia	<i>P. aeruginosa</i>	Commercial multi-phage suspension administered orally and rectally	2018 Complete cure with disappearance of any urinary infection for the first time in 2 years

## Annexe 7 : Publications majeures relatives à la phagothérapie en Pologne et ancienne Union Soviétique (44)

Référence(s)	Infection(s)	Etiologic agent(s)	Comments
<b>Babalova et al.</b> 1968. Preventive value of dried dysentery bacteriophage. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 2:143–145.	Bacterial dysentery	<i>Shigella</i>	<i>Shigella</i> phages were successfully used for prophylaxis of bacterial dysentery.
<b>Bogovazova et al.</b> 1992. Immunobiological properties and therapeutic effectiveness of preparations from <i>Klebsiella</i> bacteriophages. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 3:30–33.	Infections of skin and nasal mucosa	<i>K. ozaenae</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i> , and <i>K. pneumoniae</i>	Adapted phages were reported to be effective in treating <i>Klebsiella</i> infections in all of the 109 patients.
<b>Cislo et al.</b> 1987. Bacteriophage treatment of suppurative skin infections. Arch. Immunol. Ther. Exp. 2:175–183.	Suppurative skin infections	<i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> , and <i>E. coli</i>	Thirty-one patients having chronically infected skin ulcers were treated orally and locally with phages. The success rate was 74%.
<b>Ioseliani et al.</b> 1980. Use of bacteriophage and antibiotics for prevention of acute postoperative empyema in chronic suppurative lung diseases. Grudn. Khir. 6:63–67.	Lung and pleural infections	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>E. coli</i> , and <i>Proteus</i>	Phages were successfully used together with antibiotics to treat lung and pleural infections in 45 patients.
<b>Kochetkova et al.</b> 1989. Phagotherapy of postoperative suppurative-inflammatory complications in patients with neoplasms. Sov. Med. 6:23–26.	Postoperative wound infections in cancer patients	<i>Staphylococcus</i> and <i>Pseudomonas</i>	A total of 131 cancer patients having postsurgical wound infections participated in the study. Of these, 65 patients received phages and the rest received antibiotics. Phage treatment was successful in 82% of the cases, and antibiotic treatment was successful in 61% of the cases.
<b>Kucharewicz-Krukowska, A., and S. Slopek.</b> 1987. Immunogenic effect of bacteriophage in patients subjected to phage therapy. Arch. Immunol. Ther. Exp. 5:553–561.	Various infections	<i>Staphylococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> , and <i>Proteus</i>	Immunogenicity of therapeutic phages was analyzed in 57 patients. The authors concluded that the phages' immunogenicity did not impede therapy.
<b>Kwarcinski et al.</b> 1994. Bacteriophage therapy in the treatment of recurrent subphrenic and subhepatic abscess with jejunal fistula after stomach resection. Pol. Tyg. Lek. 49:535.	Recurrent subphrenic abscess	<i>E. coli</i>	Recurrent subphrenic abscess (after stomach resection) caused by an antibiotic-resistant strain of <i>E. coli</i> was successfully treated with phages.
<b>Litvinova et al.</b> 1978. Evaluation of efficacy of the use of <i>E. coli-Proteus</i> bacteriophage in intestinal dysbacteriosis in premature infants. Vopr. Okhr. Materin. Det. 9:42–44.	Intestinal dysbacteriosis	<i>E. coli</i> and <i>Proteus</i>	Phages were successfully used together with bifidobacteria to treat antibiotic-associated dysbacteriosis in 500 low-birth-weight infants.
<b>Meladze et al.</b> 1982. The efficacy of staphylococcal bacteriophage in treatment of purulent diseases of lungs and pleura. Grudn. Khir. 1:53–56.	Lung and pleural infections	<i>Staphylococcus</i>	Phages were used to treat 223 patients having lung and pleural infections, and the results were compared to 117 cases where antibiotics were used. Full recovery was observed in 82% of the patients in the phage-treated group, as opposed to 64% of the patients in the antibiotic-treated group.
<b>Miliutina, L. N., and N. V. Vorotyntseva.</b> 1993. Current strategy and tactics of etiologic therapy of acute intestinal infections in children. Antibiot. Khimioter. 1:46–53.	Bacterial dysentery and salmonellosis	<i>Shigella</i> and <i>Salmonella</i>	The effectiveness of treating salmonellosis using phages and a combination of phages and antibiotics was examined. The combination of phages and antibiotics was reported to be effective in treating cases where antibiotics alone were ineffective.
<b>Perepanova et al.</b> 1995. The efficacy of bacteriophage preparations in treating inflammatory urologic diseases. Urol. Nefrol. 5:14–17.	Inflammatory urologic diseases	<i>Staphylococcus</i> , <i>E. coli</i> , and <i>Proteus</i>	Adapted phages were used to treat acute and chronic urogenital inflammation in 46 patients. The efficacy of phage treatment was 92% (marked clinical improvements) and 84% (bacteriological clearance).
<b>Sakandelidze, V. M., and A. N. Meipariani.</b> 1974. Use of combined phages in suppurative-inflammatory diseases. Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol. 6:135–136.	Peritonitis, osteomyelitis, lung abscesses, and postsurgical wound infections	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , and <i>Proteus</i>	Phages administered subcutaneously or through surgical drains in 236 patients having antibiotic-resistant infections eliminated the infections in 92% of the patients.
<b>Sakandelidze, V. M.</b> 1991. The combined use of specific phages and antibiotics in different infectious allergoses. Vrach. Delo 3:60–63.	Infectious allergoses (rhinitis, pharyngitis, dermatitis, and conjunctivitis)	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> , enterococci, and <i>P. aeruginosa</i>	A total of 1,380 patients having infectious allergoses were treated with phages (360 patients), antibiotics (404 patients), or a combination of phages and antibiotics (576 patients). Clinical improvement was observed in 86, 48 and 83% of the cases, respectively.
<b>Slopek et al.</b> 1987. Results of bacteriophage treatment of suppurative bacterial infections in the years 1981–1986. Arch. Immunol. Ther. Exp. 35:569–583.	Gastrointestinal tract, skin, head, and neck infections	<i>Staphylococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> , and <i>Salmonella</i>	A total of 550 patients were treated with phages. The overall success rate of phage treatment was 92%.
<b>Stroj et al.</b> 1999. Successful treatment with bacteriophage in purulent cerebrospinal meningitis in a newborn. Neurol. Neurochir. Pol. 3:693–698.	Cerebrospinal meningitis	<i>K. pneumoniae</i>	Orally administered phages were used successfully to treat meningitis in a newborn (after antibiotic therapy failed).
<b>Tolkacheva et al.</b> 1981. Correction of intestinal dysbacteriosis with biological preparations in acute leukemia. Probl. Gematol. Pereliv. Krovi 7:29–33.	Bacterial dysentery	<i>E. coli</i> and <i>Proteus</i>	Phages were used together with bifidobacteria to treat bacterial dysentery in 59 immunosuppressed leukemia patients. The superiority of treatment with phage-bifidobacteria over antibiotics was reported.
<b>Weber-Dabrowska et al.</b> 1987. Studies on bacteriophage penetration in patients subjected to phage therapy. Arch. Immunol. Ther. Exp. 35:563–568.	Suppurative infections	<i>Staphylococcus</i> and various gramnegative bacteria	Orally administered phages were used to successfully treat 56 patients, and the phages were found to reach the patients' blood and urine.
<b>Zhukov-Verezhnikov et al.</b> 1978. A study of the therapeutic effect of bacteriophage agents in a complex treatment of suppurative surgical diseases. Sov. Med. 12:64–66.	Suppurative surgical infections	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>E. coli</i> , and <i>Proteus</i>	The superiority of adapted phages (phages selected against bacterial strains isolated from individual patients) over commercial phage preparations was reported in treating 60 patients having suppurative infections.

## Annexe 8 : Etudes cliniques relatives à la phagothérapie référencées sur ClinicalTrial.gov

ClinicalTrials.gov Search Results 07/07/2020

	Title	Status	Study Results	Conditions	Interventions	Locations
1	Phage Therapy for the Prevention and Treatment of Wound Infection in Burned Patients	Not yet recruiting	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>Wound Infection</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Biological: Bacteriophage cocktail spray</li> <li>Drug: Xeroform</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Royal Brisbane and Women's Hospital, Brisbane, Queensland, Australia</li> </ul>
2	Assessing the Efficacy of Anti-staphylococcal Phages in the Management of Infected Foot Ulcers in Diabetes	Withdrawn	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diabetes</li> <li>Diabetic Foot</li> <li>Diabetic Foot Infection</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Drug: Phage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>University Hospitals Derby and Burton NHS Foundation Trust, Derby, Derbyshire, United Kingdom</li> </ul>
3	Bacteriophage Therapy in Patients With Urinary Tract Infections	Not yet recruiting	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>Urinary Tract Infection Bacterial</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Biological: Bacteriophage Therapy</li> </ul>	
4	Standard Treatment Associated With Phage Therapy Versus Placebo for Diabetic Foot Ulcers Infected by S. Aureus	Not yet recruiting	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diabetic Foot</li> <li>Staphylococcal Infections</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Drug: Topical anti-Staphylococcus bacteriophage therapy</li> <li>Drug: Topical placebo corresponding to anti-Staphylococcus bacteriophage therapy</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>CHU de Bordeaux - Hôpital Pellegrin, Bordeaux, France</li> <li>CHRU de Nîmes - Hôpital Universitaire de Réadaptation du Grau du Roi, Le Grau du Roi, France</li> <li>CHU de Nantes - Hôtel Dieu, Nantes Cedex 1, France</li> <li>APHP - Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Paris Cedex 13, France</li> <li>APHP - Hôpital Lariboisière, Paris, France</li> <li>CHRU de Toulouse - Hôpital de Rangueil, Toulouse Cedex 9, France</li> <li>CH de Tourcoing, Tourcoing, France</li> <li>Institut Robert Merle d'Aubigné, Valenton, France</li> <li>CH Intercommunal de Villeneuve-Saint-Georges, France</li> </ul>
5	Evaluate Bacteriophage as a Useful Immunogen in Patients with Primary Immune Deficiency Diseases (PID)	Unknown status	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>Primary Immune Deficiency Diseases</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Biological: Bacteriophage OX174</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>University of South Florida, St. Petersburg, Florida, United States</li> </ul>
6	Experimental Phage Therapy of Bacterial Infections	Unknown status	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>Bacterial Infections</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Other: Bacteriophage preparation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Phage Therapy Unit at the Institute of Immunology and Experimental Therapy of the Polish Academy of Sciences, Wroclaw, Poland</li> </ul>
7	Bacteriophage Effects on Pseudomonas Aeruginosa	Completed	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cystic Fibrosis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Other: Collection of induced sputum in order to evaluate the efficacy of a cocktail of 10 bacteriophages.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>CHU de Montpellier - Hôpital Arnaud de Villeneuve CRM, Montpellier, Languedoc Roussillon, France</li> </ul>
8	Evaluation of Phage Therapy for the Treatment of Escherichia Coli and Pseudomonas Aeruginosa Wound Infections in Burned Patients	Unknown status	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>Wound Infection</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Drug: E. coli Phages cocktail</li> <li>Drug: Standard of care : Silver Sulfadiazine</li> <li>Drug: P. Aeruginosa, Phages cocktail</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hopital Militaire Reine Astrid, Brussel, Belgium</li> <li>CHU Sart-Tilman, Liege, Belgium</li> <li>Hôpital d'instruction des armées Percy, Clamart, France</li> <li>Centre hospitalier ST Joseph et St Luc, Lyon, France</li> <li>Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland</li> </ul>
9	Bacteriophages for Treating Urinary Tract Infections in Patients Undergoing Transurethral Resection of the Prostate	Completed	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>Intravesical Bacteriophage Treatment for Urinary Tract Infections</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Biological: PYO Phage</li> <li>Drug: Antibiotics</li> <li>Other: Sterile bacteriology media</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>National Center of Urology, Tbilisi, Georgia</li> </ul>
10	PHAGE Study: Bacteriophages as Novel Prebiotics	Completed	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>Gastrointestinal Disorder, Functional</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dietary Supplement: Bacteriophage mixture</li> <li>Other: Placebo Control</li> </ul>	
11	Antibacterial Treatment Against Diarrhea in Oral Rehydration Solution	Terminated	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diarrhea</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Other: T4 phage cocktail test</li> <li>Other: Commercial T4 phage cocktail</li> <li>Other: standard oral rehydration solution (ORS)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Clinical Sciences Division, ICDDR,B, Mohakhali, Dhaka, Bangladesh</li> </ul>
12	A Prospective, Randomized, Double-Blind Controlled Study of WPP-201 for the Safety and Efficacy of Treatment of Venous Leg Ulcers	Completed	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>Venous Leg Ulcers</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Drug: Bacteriophage</li> <li>Drug: WPP-201 Bacteriophage</li> <li>Drug: Bacteriophages</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Southwest Regional Wound Care Center, Lubbock, Texas, United States</li> </ul>
13	Safety and Efficacy of EcoActive on Intestinal Adherent Invasive E. Coli in Patients With Inactive Crohn's Disease	Recruiting	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>Crohn Disease</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Biological: Placebo</li> <li>Biological: Bacteriophage preparation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>The Mount Sinai Hospital, New York, New York, United States</li> </ul>



13	Safety and Efficacy of EcoActive on Intestinal Adherent Invasive E. Coli in Patients With Inactive Crohn's Disease	Recruiting	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crohn Disease</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biological: Placebo</li> <li>• Biological: Bacteriophage preparation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• The Mount Sinai Hospital, New York, New York, United States</li> </ul>
14	The Effect of Supraglottic and Oropharyngeal Decontamination on the Incidence of Ventilator-associated Pneumonia	Active, not recruiting	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Trauma Injury</li> <li>• Brain Injuries</li> <li>• Abdominal Sepsis</li> <li>• Pancreatitis</li> <li>• Meningitis</li> <li>• Encephalitis</li> <li>• Seizures</li> <li>• Acute Respiratory Distress Syndrome</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Drug: Control</li> <li>• Drug: Antiseptic Solution</li> <li>• Drug: Bacteriophage</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Budgetary Healthcare Institution of Arkhangelsk Region "Severodvinsk City Clinical Emergency Hospital # 2", Severodvinsk, Arkhangelsk Region, Russian Federation</li> </ul>
15	Phase II Trial of Stathmin as Predictive Biomarker for T PF Induction Chemotherapy in OSCC	Recruiting	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neoplasm-Neck</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Drug: docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, China</li> </ul>
16	Use of Provodine to Protect HCW Hands (Aim II.1)	Suspended	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Infection</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Other: Provodine</li> </ul>	
17	Safety, Tolerability, and PK of LBP-EC01 in Patients With Lower Urinary Tract Colonization Caused by E. Coli	Recruiting	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Urinary Tract Infections</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Drug: LBP-EC01</li> <li>• Drug: Lactated Ringers Solution for Injection</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pinnacle Research Group, Anniston, Alabama, United States</li> <li>• Tilda Research, Irvine, California, United States</li> <li>• Universal Axon Clinical Research, Doral, Florida, United States</li> <li>• AMPM Research Clinic, Miami Gardens, Florida, United States</li> <li>• Ralph H. Johnson VA Medical Center, Charleston, South Carolina, United States</li> </ul>
18	Phase I Study of BMS-188667 (CTLA4Ig) in Patients With Psoriasis Vulgaris	Completed	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Psoriasis Vulgaris</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Drug: Abatacept</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Local Institution, Boston, Massachusetts, United States</li> <li>• Local Institution, Ann Arbor, Michigan, United States</li> <li>• Local Institution, New York, New York, United States</li> <li>• Local Institution, Philadelphia, Pennsylvania, United States</li> <li>• Local Institution, Pittsburgh, Pennsylvania, United States</li> </ul>
19	Safety Study of Topical Human FGF-1 for Wound Healing	Unknown status	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diabetic Foot Ulcers</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Drug: FGF-1 141</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dedicated Phase I, Phoenix, Arizona, United States</li> </ul>
20	T4N5 Liposomal Lotion in Preventing The Recurrence of Nonmelanoma Skin Cancer in Patients Who Have Undergone a Kidney Transplant	Completed	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Actinic Keratosis</li> <li>• Basal Cell Carcinoma of the Skin</li> <li>• Recurrent Skin Cancer</li> <li>• Squamous Cell Carcinoma of the Skin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Drug: liposomal T4N5 lotion</li> <li>• Other: placebo</li> <li>• Other: laboratory biomarker analysis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• UAB Comprehensive Cancer Center, Birmingham, Alabama, United States</li> </ul>
21	Gluten-free Diet in Gluten-genetically Predisposed Subjects	Active, not recruiting	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Genetic Predisposition to Disease</li> <li>• Celiac Disease</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dietary Supplement: Gluten-free diet</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• IRCCS Burlo Garofolo, Trieste, Friuli Venezia Giulia, Italy</li> </ul>
22	Study of Immune Responses and Safety of Recombinant Human CD40 Ligand in Patients With X-Linked Hyper-IgM Syndrome	Completed	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immunoproliferative Disorder</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Drug: Bacteriophage</li> <li>• Drug: rhuCD40L</li> <li>• Drug: KLH</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID), Bethesda, Maryland, United States</li> </ul>
23	Immune Responses in Patients Treated With Raltegravir	Withdrawn	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HIV Infections</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biological: Various vaccines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Immune Deficiency Treatment Centre, Montreal General Hospital, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada</li> </ul>

24	Ascending Dose Study of the Safety of AB-SA01 When Topically Applied to Intact Skin of Healthy Adults	Completed	No Results Available	• Healthy Volunteers	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biological: AB-SA01 (10<sup>8</sup> PFU per phage)</li> <li>• Biological: AB-SA01 (10<sup>9</sup> PFU per phage)</li> <li>• Biological: Placebo (for Cohort 10<sup>8</sup>)</li> <li>• Biological: Placebo (for Cohort 10<sup>9</sup>)</li> </ul>	• Clinical Trials Center, WRAIR, Silver Spring, Maryland, United States
25	Safety Study of Syntropin (Human Growth Hormone) for the Treatment of Growth Hormone Deficiency	Completed	No Results Available	▲ Growth Hormone Deficiency	▲ Drug: Syntropin	▲ Novum Pharmaceutical Research Services, Houston, Texas, United States
26	Clinical Course and Changes in the Respiratory Microbiota Based on Antibiotic Treatment in Patients With Cystic Fibrosis	Unknown status	No Results Available	▲ Bronchopulmonary Infection	▲ Other: sputum samples	▲ Assistance Publique Hopitaux de Marseille, Marseille, France
27	Ph 1B B-701 in Combination With Pembrolizumab in Metastatic Transitional Cell Carcinoma of the Urothelial Tract	Terminated	No Results Available	• Bladder Cancer	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Drug: B-701</li> <li>• Drug: Pembrolizumab</li> </ul>	• Dana-Farber Cancer Institute, Boston, Massachusetts, United States
28	Age and Response to Flu Vaccines	Recruiting	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Influenza</li> <li>▲ Influenza Immunisation</li> </ul>	▲ Biological: Influenza Virus Quadrivalent Inactivated Vaccine	▲ University of Rochester Medical Center—Strong Memorial Hospital—Infectious Diseases, Rochester, New York, United States
29	Probiotics After Discharge	Unknown status	No Results Available	<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Microbiota</li> <li>▲ Bacteriophages</li> <li>▲ Infantile Colic</li> <li>▲ Growth</li> </ul>	▲ Dietary Supplement: Probiotic Continuation	▲ Newcastle Neonatal Service, Newcastle Upon Tyne, Tyne And Wear, United Kingdom
30	Evaluation of the Effects of Age, Prior Exposure, and Previous Vaccination on Response to the Flu Vaccine	Recruiting	No Results Available	▲ Influenza, Human	▲ Biological: Fluarix	▲ University of Rochester Medical Center, Vaccine Research Unit Room 3-5000, Rochester, New York, United States
31	Interleukin-2 Plus Anti-HIV Therapy in HIV-Infected Children With Weakened Immune Systems	Completed	No Results Available	▲ HIV Infections	<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Biological: Diphtheria &amp; Tetanus Toxoids &amp; Acellular Pertussis Vaccine Adsorbed</li> <li>▲ Biological: Diphtheria and Tetanus Toxoids Adsorbed</li> <li>▲ Biological: Tetanus and Diphtheria Toxoids Adsorbed</li> <li>▲ Drug: Bacteriophage phi X-174</li> <li>▲ Drug: Aldesleukin</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▲ Long Beach Memorial Med. Ctr., Miller Children's Hosp., Long Beach, California</li> <li>▲ USC La Nichd Crs, Los Angeles, California,</li> <li>▲ UCSD Maternal, Child, and Adolescent HIV CRS, San Diego, California</li> <li>▲ UCSF Pediatric AIDS CRS, San Francisco, California</li> <li>▲ Children's National Med. Ctr., Washington DC NICHD CRS, Washington, District of Columbia</li> <li>▲ Children's National Med. Ctr., ACTU, Washington, District of Columbia</li> <li>▲ Univ. of Miami Ped. Perinatal HIV/AIDS CRS, Miami, Florida</li> <li>▲ USF—Tampa NICHD CRS, Tampa, Florida</li> <li>▲ Tulane/LSU Maternal/Child CRS, New Orleans, Louisiana</li> <li>▲ HMS—Children's Hosp. Boston, Div. of Infectious Diseases, Boston, Massachusetts</li> <li>▲ and 4 more</li> </ul>

U.S. National Library of Medicine | U.S. National Institutes of Health | U.S. Department of Health & Human Services

Extraction des études interventionnelles concernant les phages référencées sur Clinicaltrials.gov au 07/07/2020. Les études ne s'intéressant pas à la sécurité ou à l'efficacité des bactériophages ont été barrées.

**Concentration maximale autorisée pour les particules en suspension dans l'air**

	<i>Au repos</i>		<i>En activité</i>	
<i>Classe</i>	<i>Nombre maximal autorisé de particules par m<sup>3</sup> de taille égale ou supérieure aux tailles précisées.</i>			
	<i>0.5 µm (d)</i>	<i>5 µm</i>	<i>0.5 µm (d)</i>	<i>5 µm</i>
<i>A</i>	3520	20	3520	20
<i>B</i>	3520	29	352000	2900
<i>C</i>	352000	2900	3520000	29000
<i>D</i>	3520000	29000	<i>Non défini</i>	<i>Non défini</i>

**Contamination microbiologique maximale autorisée**

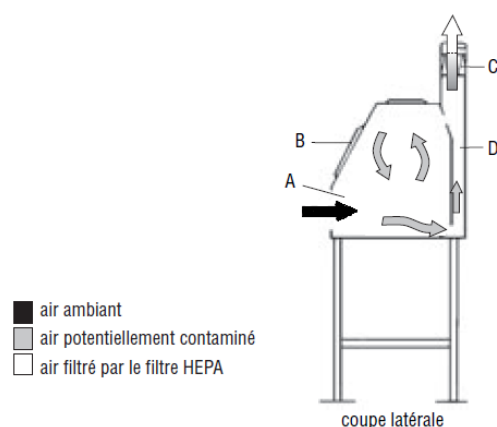
<i>Limites recommandées de contamination microbiologique (a)</i>				
<i>Classe</i>	<i>Echantillon d'air ufc/m<sup>3</sup></i>	<i>Boîtes de Pétri (diam.: 90 mm), ufc/4heures (b)</i>	<i>Géloses de contact (diam. : 55 mm), ufc/plaque</i>	<i>Empreintes de gant (5 doigts) ufc/gant</i>
<i>A</i>	<1	<1	<1	<1
<i>B</i>	10	5	5	5
<i>C</i>	100	50	25	-
<i>D</i>	200	100	50	-

*Notes :*

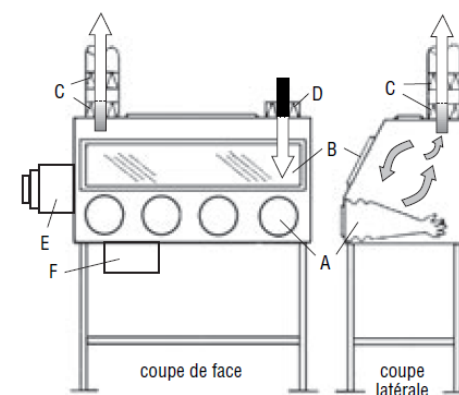
*(a) Il s'agit de valeurs moyennes.*

*(b) Certaines boîtes de Pétri peuvent être exposées pendant moins de quatre heures.*

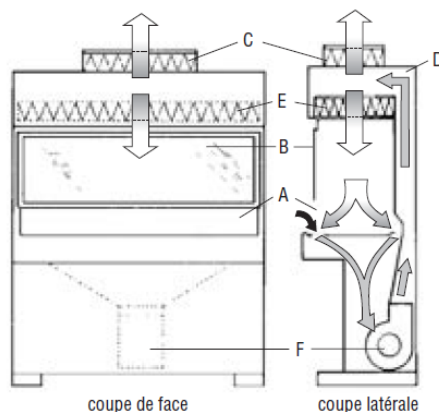
Annexe 10 : Représentation des PSM de classe I, IIa, IIb et III (OMS, 2005)



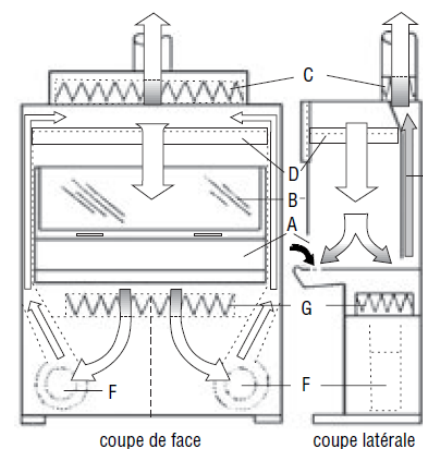
**Représentation schématique d'une enceinte de sécurité biologique de classe I.**  
A, ouverture frontale; B, panneau d'observation à guillotine; C, filtre HEPA monté sur la conduite d'évacuation; D, gaine d'évacuation.



**Représentation schématique d'une enceinte de sécurité biologique de classe III**  
A, orifices de fixation des manchons à gants; B, panneau d'observation à guillotine; C, deux filtres HEPA d'évacuation montés en série; D, filtre HEPA d'admission; E, autoclave à deux portes ou sas de passage; F, cuve de désinfection chimique. Il est nécessaire de raccorder le circuit d'évacuation de l'enceinte à un circuit d'évacuation du bâtiment indépendant.



**Représentation schématique d'une enceinte de sécurité biologique de classe II type A1.**  
A, ouverture frontale; B, panneau d'observation à guillotine; C, filtre HEPA d'évacuation; D, chambre de distribution arrière; E, filtre HEPA d'admission; F, ventilateur.



**Représentation schématique d'une enceinte de sécurité biologique de classe II, type B1.**  
A, ouverture frontale; B, panneau d'observation à guillotine; C, filtre HEPA d'évacuation; D, filtre HEPA d'admission; E, gaine d'évacuation en dépression; F, ventilateur; G, filtre HEPA d'admission d'air. Il est nécessaire de raccorder le circuit d'évacuation de l'enceinte au circuit général d'évacuation du bâtiment.

## Annexe 11 : Contrôle qualité des bactériophages de l'essai PHAGOBURN (95)

Quality control	Methods	Description	Status of the method
<b>Viability</b>	<b>Titration</b>	Titration of bacteriophage on LB agar plate inoculated with specific bacteria. The enumeration of bacteriophage corresponds to the count of lysis plaque on serial dilution of the product.	Developed and validated (GMP-grade: release test for phages banks, drug substances and pharmaceutical products)
<b>Identity</b>	<b>Host range</b>	Evaluation of the range of bacteria that each bacteriophage could infect.	Developed w/o validation (supporting characterisation)
	<b>Full genome sequence</b>	Determination of the whole sequence of each phage by High-Throughput Sequencing	Outsourced without validation (supporting characterisation)
	<b>DNA restriction profile</b>	Digestion by specific enzyme of the DNA bacteriophage and migration on the bioanalyzer system to obtain digestion restriction profile.	Developed and validated (GMP-grade: release test for phages banks and drug substances)
	<b>Genotyping – RAPDPCR based method</b>	Random Amplified Polymorphic DNA assay performed by end point PCR. A single primer hybridized randomly on the DNA sequence to generate a specific PCR products profile observed by migration on the bioanalyzer system.	Developed and validated (GMP-grade: release test for phages banks and drug substances)
	<b>Protein profile</b>	Determination of the protein profile related to the bacteriophage by migration of protein extract on the bioanalyzer system	Developed w/o validation (supporting characterisation)
	<b>Morphotype by e.m.</b>	Observation of the morphology and the size of each bacteriophage by electronic microscopy	Outsourced w/o validation (supporting characterisation)
<b>Purity</b>	<b>Sterility</b>	Automated contaminant microbial detection with the Bac T/Alert system.	Validated method available before project start (GMP-grade: release test for phages banks, drug substances and pharmaceutical products)
	<b>Bioburden</b>	Quantitative measurement of the bacterial load	Validated method available before project start (GMP-grade: release test for drug substances and pharmaceutical products)
	<b>Endotoxins</b>	Chromogenic quantitative and kinetic assay for the detection of Gram negative bacterial endotoxins	Validated method available before project start (GMP-grade: release test for drug substances and pharmaceutical products)
	<b>Host Cell DNA</b>	Quantification by real time PCR of host cell DNA (Assay E. Coli)	Validated method available before project start (GMP-grade: release test for drug substances and pharmaceutical products)
		Quantification by real time PCR of host cell DNA (Assay P. Aeruginosa)	Developed and validated (GMP-grade: release test for drug substances and pharmaceutical products)
	<b>Total proteins</b>	Measurement of total protein concentration by spectrophotometry with a BCA assay	Developed w/o validation (supporting characterisation)
	<b>Visual aspect</b>	Observation by two operators of the visual aspect of the product	Developed and validated (GMP-grade: release test for pharmaceutical products)
<b>Chemistry</b>	<b>pH</b>	Determination with a pH-meter of the pH of the product	Developed and validated (GMP-grade: release test for pharmaceutical products)
<b>Viability</b>	<b>Titration</b>	Titration of bacteria on LB agar plate. The enumeration of bacteria corresponds to the count of colony on serial dilution of the product.	Developed and validated (GMP-grade: release test for bacteria banks)
<b>Identity</b>	<b>Full genome sequence</b>	Determination of the whole sequence of each bacterium by High-Throughput Sequencing	Outsourced w/o validation (supporting characterisation)
	<b>Strain Characterization</b>	Analyse by sequencing of the 16S DNA sequence of each bacteria and comparison to available public databases	Outsourced w/o validation (GMP-grade: release test for bacteria banks)
	<b>Genotyping – RAPD-PCR based method</b>	Random Amplified Polymorphic DNA assay performed by end point PCR. A single primer hybridized randomly on the DNA sequence to generate a specific PCR products profile observed by migration on the bioanalyzer system	Developed and validated (GMP-grade: release test for bacteria banks)
	<b>Plating</b>	After isolation on LB agar plate, macroscopic observation of the colonies.	Developed and validated (GMP-grade: release test for pharmaceutical products)
<b>Purity</b>	<b>Prophages detection</b>	After induction with Mitomycin C	Developed w/o validation (supporting characterisation)



## Annexe 12 : Analyse des risques d'une préparation de bactériophages au CHU de Rennes

Etape générique	Danger générique	Etape du circuit	Situation dangereuse	Type d'événement	Cause	Evénement redouté	Traitements déjà existants	Gi	Vi	Cr	Actions de réduction des risques	Gr	Vr	Cr
ETAPE D : Validation pharmaceutique de la prescription	Qualité	D2: Validation du volet technique de la prescription	Absence de procédures qualité en interne	.4 : Impact sur le Patient	Dilution prescrite ne permet pas d'obtenir un titre suffisant dans la préparation ou ne prend pas en compte les volumes nécessaires aux contrôles	Réalisation d'une préparation inadaptée et/ou contrôles impossibles ou insuffisants		5	4	3	16	3	4	3
ETAPE E : Contrôle des moyens de production	Matériel	E2: Matière première	Vigilance (pharmaco et matériovigilance)	.4 : Impact sur le Patient	Qualification de la matière première impossible	Matière première utilisée non conforme aux spécifications attendue (qualitativement ou quantitativement)		5	4	3	9	4	4	3
ETAPE E : Contrôle des moyens de production	Juridique	E2: Matière première	Absence de prise en compte de la réglementation en vigueur	.6 : Juridique/Réglementaire	Qualification de la matière première impossible.	Non respect des Bonnes Pratiques de Préparation.		2	4	2	9	2	4	2
ETAPE E : Contrôle des moyens de production	Matériel	E2: Matière première	Absence de stock en matière première/ DM	.1 : Délai de dispensation	Défaut de livraison / réception / stockage	Intervention chirurgicale à reprogrammer	Traitement à adresser au pharmacien responsable, qui assurera la réception et le stockage à température réfrigérée contrôlée. Réception à programmer au moins plusieurs jours avant l'intervention prévue.	4	5	3		4	2	2
ETAPE E : Contrôle des moyens de production	Matériel	E2: Matière première	Vigilance (pharmaco et matériovigilance)	.4 : Impact sur le Patient	Qualification de la matière première impossible	Intolérance locale ou systémique		5	4	3	1 et 8	4	3	3
ETAPE E : Contrôle des moyens de production	Matériel	E2: Matière première	Vigilance (pharmaco et matériovigilance)	.4 : Impact sur le Patient	Qualification de la matière première impossible	Inefficacité par défaut qualitatif ou quantitatif des bactériophages		4	4	3	1 et 11	4	3	3
ETAPE E : Contrôle des moyens de production	Matériel	E2: Matière première	Vigilance (pharmaco et matériovigilance)	.4 : Impact sur le Patient	Qualification de la matière première impossible	Risque infectieux pour le patient		5	4	3	1 et 10	4	3	3
ETAPE E : Contrôle des moyens de production	Juridique	E2: Matière première	Absence de prise en compte de la réglementation en vigueur	.6 : Juridique/Réglementaire	Produit non pharmaceutique, en l'absence d'un cadre juridique adapté à une production industrielle.	Engagement de la responsabilité du Pharmacien Hospitalier.		1	4	1	12	1	4	1
ETAPE E : Contrôle des moyens de production	Matériel	E1: Vérification de la zone de production	Equipement défaillant	.1 : Délai de dispensation	Défaut de maintenance	Equipement de production inutilisable	Qualification et maintenance régulière des équipements	3	1	1		3	1	1
ETAPE E : Contrôle des moyens de production	Matériel	E1: Vérification de la zone de production	Equipement défaillant	.4 : Impact sur le Patient	Défaut de maintenance	Risque infectieux pour le patient	Qualification et maintenance régulière des équipements	5	1	1		5	1	1
ETAPE E : Contrôle des moyens de production	Environnement	E1: Vérification de la zone de production	Défaut d'asepsie	.4 : Impact sur le Patient	Défaut de formation ou de vigilance	Risque infectieux pour le patient	Formation, traçabilité des contrôles	5	1	1		5	1	1
ETAPE E : Contrôle des moyens de production	Environnement	E1: Vérification de la zone de production	Interne (incendie, inondation...)	.1 : Délai de dispensation	Détérioration de l'environnement de production	Environnement de production inutilisable	Autre ZAC de production	3	1	1		3	1	1


ETAPE F : Production	Qualité	F5: Préparation	Absence de procédures qualité en interne	.1: Délai de dispensation	Préparation magistrale à partir d'une matière première non pharmaceutique : jamais réalisé	Préparation réalisée non conforme au produit attendu ou de qualité insuffisante, impossible à refaire faute de matières premières disponibles.		4	4	3	3	4	1	1
ETAPE F : Production	Environnement	F7 : Bionettoyage (nettoyage des surfaces, élimination des déchets)	Défaut d'asepsie	.2: Impact sur le circuit	Matière première virale	Contamination des préparations réalisées dans l'environnement après la production de phages.		4	4	3	15	4	1	1
ETAPE F : Production	Environnement	F6: Conditionnement et étiquetage de la préparation	Défaut d'asepsie	.5: Impact sur le produit	Absence de double emballage stérile	Présentation non compatible avec une administration au bloc chirurgical		3	2	2	3	3	1	1
ETAPE F : Production	Environnement	F5: Préparation	Défaut d'asepsie	.4 : Impact sur le Patient	Non respect des procédures	Risque infectieux pour le patient	Manipulateur : formé et habilité. Filtration stérilisante.	5	1	1		5	1	1
ETAPE F : Production	Ressources Humaines	F5: Préparation	Risques psychosociaux	.3: Impact sur le personnel	Bactériophages = virus	Refus de manipulation		2	3	2	4	2	2	1
ETAPE F : Production	Ressources Humaines	F5: Préparation	Risques toxiques pour le personnel	.3: Impact sur le personnel	Bactériophages = virus	Contamination du manipulateur	Respect des procédures: (Au vu de leur écologie et cycle infectieux, les bactériophages ne sont pas jugés à risque pour le manipulateur)	1	4	1		1	4	1
ETAPE F : Production	Qualité	F5: Préparation	Absence de procédures qualité en interne	.4 : Impact sur le Patient	Préparation magistrale à partir d'une matière première non pharmaceutique : jamais réalisé	Risque infectieux, d'intolérance ou d'inefficacité pour le patient.		5	4	3	3	4	3	3
ETAPE F : Production	Ressources Humaines	F5: Préparation	Retard, absence	.1: Délai de dispensation	Accident, maladie, ...	Préparation non réalisée		4	2	2	2	4	1	1
ETAPE F : Production	Environnement	F4: Préparation de la zone de travail	Défaut d'asepsie	.4 : Impact sur le Patient	Non respect des procédures	Risque infectieux pour le patient	Personnel : formé et habilité	5	1	1		5	1	1
ETAPE F : Production	Ressources Humaines	F3: Accès à la zone de production (lavage des mains, habillage, bijoux, maquillage, ...)	Non respect des procédures	.4 : Impact sur le Patient	Non respect des procédures	Risque infectieux pour le patient	Personnel : formé et habilité	5	1	1		5	1	1
ETAPE F : Production	Ressources Humaines	F2: Décontamination des consommables et matières premières	Non respect des procédures	.4 : Impact sur le Patient	Manque de formation, manque de temps	Risque infectieux pour le patient	Temps dédié pour PPH et pharmaciens qualifiés	5	1	1		5	1	1

ETAPE G : Stockage avant dispensation	Environnement	G1: Stockage de la préparation après production	Intervention externe accidentelle (visiteurs,...)	.5 : Impact sur le produit	Pas d'emplacement de stockage prévu.	Préparation jetée ou déplacée	Préparation étiquetée et emplacement de stockage identifié	5	2	2			4	1	1
ETAPE H : Contrôle de la préparation	Matériel	H5: Qualification et quantification des bactériophages	Equipement existant inadapté ou de mauvaise qualité	.4 : Impact sur le Patient	Technique de qualification par PCR non disponible à la pharmacie	Intolérance ou inefficacité du traitement		4	3	3	13		4	1	1
ETAPE H : Contrôle de la préparation	Qualité	H5: Qualification et quantification des bactériophages	Absence de procédures qualité en interne	.5 : Impact sur le produit	Test pas réalisé par la pharmacie du CHU	Qualification de la préparation insuffisante		4	4	3	6		4	1	1
ETAPE H : Contrôle de la préparation	Qualité	H7 : Test d'intégrité du filtre	Absence de procédures qualité en interne	.4 : Impact sur le Patient	Test pas réalisé au CHU	Risque infectieux ou d'intolérance pour le patient		5	4	3	14		4	3	3
ETAPE H : Contrôle de la préparation	Matériel	H3: Contrôles stérilité	Equipement existant inadapté ou de mauvaise qualité	.4 : Impact sur le Patient	Délai d'obtention des résultats > stabilité connue de la préparation.	Administration d'une solution non stérile au patient.	Filtration stérilisante	5	4	3	5		4	3	3
ETAPE I : Dispensation	Qualité	I1 : Libération pharmaceutique	Absence de procédures qualité en interne	.5 : Impact sur le produit	Délais d'obtention des résultats variables selon les contrôles effectués	Péremption de la préparation avant sa libération		4	4	3	7		4	1	1
ETAPE I : Dispensation	Ressources Humaines	I1: Libération pharmaceutique	Retard, absence	.1: Délai de dispensation	Accident, maladie ...	Contrôles non effectués, préparation non libérée		4	4	3	2		4	1	1
ETAPE J : Transport	Ressources Humaines	J3: Contrôle à la réception dans l'unité	Erreur humaine	.5 : Impact sur le produit	Préparation livrée dans un mauvais secteur	Préparation mal conservée, égarée	Réception et contrôle effectué dans le service par une personne préalablement identifiée	5	1	1			5	1	1
ETAPE K : Administration	Ressources Humaines	K3: Administration	Erreur humaine	.4 : Impact sur le Patient	Conditionnement en seringue	Erreur de patient	Etiquetage au nom du patient avec la mention "POUR USAGE COMPASSIONNEL UNIQUEMENT"	5	2	2			5	1	1
ETAPE K : Administration	Ressources Humaines	K3: Administration	Erreur humaine	.4 : Impact sur le Patient	Conditionnement en seringue	Erreur de voie d'administration	Etiquetage avec la mention "POUR ADMINISTRATION IN SITU UNIQUEMENT - NE PAS INJECTER PAR VOIE PARENTERALE"	5	2	2			5	1	1

*Annexe 13 : Actions à mettre en place pour la réalisation d'une préparation de bactériophages*

Numéro de l'action	Nom de l'action	Description de l'action	Date de début	Date de fin	Statut	Danger générique	Etape générique
1	Voie d'administration	Convenir avec le médecin que l'administration ne peut être envisagée que par voie locale. Le produit préparé ne sera pas administré par voie intraveineuse.	juin-20	juin-20	Terminé	Matériel	ETAPE K : Administration
15	Désinfection	Vérifier l'activité du produit habituellement utilisé sur les bactériophages. Se procurer un produit adéquat si besoin et établir une procédure de désinfection après les préparations de bactériophages.	août-20	août-20	Terminé	Environnement	ETAPE F : Production
13	Sous traitance PCR	Réalisation en microbiologie	août-20	août-20	Terminé	Matériel	ETAPE H : Contrôle de la préparation
12	Qualification de la matière première	Déterminer la liste des contrôles à effectuer	août-20	août-20	Terminé	Juridique	ETAPE E : Contrôle des moyens de production
7	Contrôles libérateurs	Etablir parmi les contrôles à effectuer lesquels sont libérateurs.	août-20	août-20	Terminé	Qualité	ETAPE I : Dispensation
3	Fabrication et contrôles	Rédaction d'un mode opératoire détaillé pour la fabrication et les contrôles à effectuer	août-20	août-20	Terminé	Qualité	ETAPE F : Production
16	Validation prescription	Description des éléments de la prescription à contrôler	août-20	août-20	Terminé	Qualité	ETAPE D : Validation pharmaceutique de la prescription
14	Test d'intégrité du filtre	Rédiger procédure à suivre	août-20	août-20	Terminé	Matériel	ETAPE H : Contrôle de la préparation
6	Sous traitance PCR	Qualification par PCR établie en lien avec les microbiologistes	août-20	août-20	En cours	Qualité	ETAPE H : Contrôle de la préparation
11	Caractérisation et quantification des phages	Technique PCR	sept-20	sept-20	Programmé	Matériel	ETAPE E : Contrôle des moyens de production
10	Contrôle de la stérilité de la préparation	Bactec pour échantillon du produit fini	sept-20	sept-20	Programmé	Matériel	ETAPE E : Contrôle des moyens de production
9	Qualification de la préparation par le Pharmacien Hospitalier	Echantillons pour qualification sur produit fini + échantillonnage.	sept-20	sept-20	Programmé	Juridique	ETAPE E : Contrôle des moyens de production
8	Contrôles physico-chimiques et endotoxines	pH, osmolarité, mirage des particules visibles, endotoxines	sept-20	sept-20	Programmé	Matériel	ETAPE E : Contrôle des moyens de production
5	Test d'intégrité du filtre	Tester l'intégrité du filtre pour valider la qualité de la filtration	sept-20	sept-20	Programmé	Matériel	ETAPE H : Contrôle de la préparation
4	Information	Formation du personnel à la biologie et écologie des phages	août-20	sept-20	A programmer	Ressources Humaines	ETAPE F : Production
2	Ressources humaines	Disposer, le jour prévu, de multiples ressources qualifiées pouvant être mobilisées.	sept-20	sept-20	A programmer	Ressources Humaines	ETAPE F : Production ETAPE H : Contrôle de la préparation ETAPE I : Dispensation

Annexe 14 : Dossier de lot d'une préparation magistrale de bactériophages à usage compassionnel au CHU de Rennes

	<b>Dossier de lot d'une préparation magistrale de bactériophage à usage compassionnel</b>			Codification : <b>ZPI-EN 022</b>
				Version : 1
Emetteur : Pharmacotechnie	Processus : 3.3	Date d'application : 01/09/20	Pages : 1/6	

<u>Rédacteur(s)</u>	<u>Approbateur(s) (signature - date)</u>	<u>Gestionnaire</u>	<u>Destinataire(s)</u>
* A. Jouvance-Le Bail, interne	* M.A Lester, Pharmacien	* Secrétariat pôle pharmacie	<input checked="" type="checkbox"/> Pharmaciens <input type="checkbox"/> PPH <span style="margin-left: 20px;"> <input type="checkbox"/> Internes  <input type="checkbox"/> Etudiant 5<sup>ème</sup> AHU         </span>

**1. Identification du patient**

<b>Nom</b>	
<b>Prénom</b>	
<b>Date de naissance</b>	

Les éléments suivants doivent être intégrés au dossier de lot :

- Compte rendu de la RCP
- Consentement du patient
- Phagogramme
- Avis de l'ANSM
- Prescription

**2. Volume de la préparation prescrite**

Volume à administrer	ml	
Volume nécessaire aux contrôles	Ensemencement flacons Bactec	ml
	Echantillothèque	ml
	Contrôles de pH et d'osmolarité	ml
	Contrôle des endotoxines	ml
	Contrôles par PCR	ml
<b>VOLUME TOTAL A PREPARER</b>		ml

**3. Identification des phages actifs sur la souche pathogène**

Souche bactérienne	Bactériophages actifs	Concentration Minimale de Lyse (PFU/ml)	Titre des flacons (PFU/ml)	Titre de la préparation prescrite (PFU/ml)

Seule la version intranet est valable et maîtrisée
Trame utilisée : DQ Form- 02-14 – V2 du 01/09/2009

## 4. Réception

La réception est réalisée conformément à ZPI-IT 030.

<b>Produits</b> (nom, lot, péréemption, quantité)	
<b>Date</b>	
<b>Heure</b>	
<b>Conformité</b>	<input type="checkbox"/> Conditionnement intact <input type="checkbox"/> Conforme aux produits commandés (nom et titre des phages, conditionnement, quantité) <input type="checkbox"/> Conforme aux certificats d'analyse <input type="checkbox"/> Transport à 2-8°C
<b>Nom et signature du pharmacien</b>	

Les certificats d'analyse et bons de livraison seront joints au dossier de lot.

## 5. Stockage

Le stockage est réalisé conformément à ZPI-IT 030.

	Date	Heure	Nom
<b>Entrée</b>			
<b>Sortie</b>			

Si il y a lieu, description de l'évènement intercurrent et validation de la conformité du produit :

.....

.....

.....

.....

## 6. Fiche de fabrication

La préparation a été réalisée conformément à ZPI-IT 031, selon les éléments ci-dessous :

Matières premières						Préparation	
Description	Fournisseur	Titre ou concentration	Volume par unité	Lot	Péremption	Volume prélevé (ml)	Titre final
Bactériophages XXXXX							
Bactériophages XXXXX							
NaCl							
Volume total de la préparation (ml)							
Répartition du volume total (ml)						Seringue de la préparation à administrer	Nombre : ..... Volume : ....ml
						Ensemencement flacons Bactec	Nombre : ..... Volume : ....ml
						Seringue pour l'échantillonnage	Nombre : ..... Volume : ....ml
						Seringue pour contrôles pH et osmolarité	Nombre : ..... Volume : ....ml
						Seringues pour contrôles des endotoxines	Nombre : ..... Volume : ....ml
						Seringue pour contrôles par PCR	Nombre : ..... Volume : ....ml
Numéro de lot							
Date et heure						...../...../..... .....h.....	
Manipulateurs							
Péremption						...../...../..... .....h.....	
Visa pharmacien							

## 7. Etiquetage

Coller ci-dessous un double des étiquettes utilisées pour la préparation, l'échantillothèque et les seringues destinées aux contrôles.

Seringue délivrée au service destinée à l'administration au patient	Coller ici l'étiquette
Seringue conservée pour l'échantillothèque	Coller ici l'étiquette
Seringues destinées aux contrôles	Coller ici l'étiquette

Nom : .....

Le : .....





## Dossier de lot d'une préparation magistrale de bactériophage à usage compassionnel

Codification : **ZPI-EN 022**

Version : 1

Emetteur : Pharmacotechnie

Processus : 3.3

Date d'application : 01/09/20

Pages : 5/6

### 8. Contrôles

Les contrôles ont été réalisés conformément à ZPI-IT 032. Les résultats sont indiqués dans le tableau ci-dessous.

Nature du contrôle	Norme	Résultat	Date et heure	Visa pharmacien
Mirage des particules	Exempt de particules visibles			
pH	Compris entre .....et ..... (seuil défini selon ZPI-IT 032)			
Osmolarité	Comprise entre .....et .....mOsm/l (seuil défini selon ZPI-IT 032)			
Endotoxines	Inférieur à : .....UI/ml (seuil défini selon ZPI-IT 032)			
Intégrité du filtre	Valeur de point de bulle supérieure ou égale à : ..... (spécification fabricant)			
Etiquetage	Chaque seringue porte les mentions décrites dans l'Annexe 1 de ZPI-IT 031. Ces informations sont conformes aux données de la fiche de fabrication et de la prescription. Un double conforme de chaque étiquette est consigné dans le dossier de lot.			
Conditionnement	Seringues correctement fermées. Double emballage stérile pour la préparation à administrer, simple pour les contrôles.			
Caractérisation et quantification par PCR	Phages XXX et XXX identifiés et quantifiés à un titre de l'ordre de ..... PFU/ml (d'après ZPI-IT 029)			
Stérilité	Détection de microorganismes aérobies et anaérobie : négatif			
Contrôles environnementaux	Empreinte de gant : < 1 UFC par gélose Sédimentation : < 1 UFC par gélose			

Joindre les documents édités relatifs à ces contrôles au dossier de lot.

Seule la version intranet est valable et maîtrisée

Trame utilisée : DQ Form- 02-14 – V2 du 01/09/2009



## Dossier de lot d'une préparation magistrale de bactériophage à usage compassionnel

Codification : ZPI-EN 022

Version : 1

Emetteur : Pharmacotechnie

Processus : 3.3

Date d'application : 01/09/20

Pages : 6/6

### 9. Libération

Conformément à ZPI-IT 032 et au vu de la stabilité du produit, la libération peut être décidée sans attendre les résultats de la caractérisation et de la quantification par PCR ainsi que des contrôles relatifs à la stérilité de la préparation et aux contrôles environnementaux. Ceux-ci seront toutefois consignés au dossier de lot dès réception.

La libération est effectuée si les éléments ci-dessous sont présents et conformes :

☐ Documents

- ☐ Compte rendu de la RCP
- ☐ Consentement du patient
- ☐ Phagogramme
- ☐ Avis de l'ANSM
- ☐ Prescription
- ☐ Certificats d'analyse de chaque bactériophage
- ☐ Bon de livraison

☐ Contrôles

- ☐ Mirage des particules
- ☐ pH
- ☐ Osmolarité
- ☐ Endotoxines
- ☐ Intégrité du filtre
- ☐ Etiquetage
- ☐ Conditionnement

Libération validée par : ....., pharmacien

Le : .....

Les éléments ci-dessous sont ajoutés au dossier de lot après la libération de la préparation :

- ☐ Bordereau de livraison au service
- ☐ Caractérisation et quantification des bactériophages par PCR
- ☐ Stérilité de la préparation
- ☐ Contrôles environnementaux

Validation finale par : ....., pharmacien

Le : .....

## BIBLIOGRAPHIE

1. Directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil du 6 novembre 2001 instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain. Journal officiel des Communautés européennes nov 28, 2001 p. 67-128.
2. Règlement (CE) n°1394/2007 du Parlement européen et du Conseil du 13 novembre 2007 concernant les médicaments de thérapie innovante et modifiant la directive 2001/83/CE ainsi que le règlement (CE) n°726/2004. Journal officiel de l'Union européenne déc 10, 2007 p. 121-37.
3. Lannoy N, Hermans C. Thérapie génique en 2017 : état des lieux et perspectives. Louvain Méd. 2017;(136):1-8.
4. Galanopoulo L. CRISPR-Cas9 : des ciseaux génétiques pour le cerveau [Internet]. CNRS Le journal. 2016 [cité 13 juill 2020]. Disponible sur: <https://lejournel.cnrs.fr/articles/crispr-cas9-des-ciseaux-genetiques-pour-le-cerveau>
5. Pinturaud M, Vasseur M, Odou P. Rôle du pharmacien hospitalier dans le circuit d'une catégorie de Médicament de Thérapie Innovante : les lymphocytes T exprimant un Récepteur Chimérique à l'Antigène. Bull Cancer (Paris). 1 déc 2018;105(Suppl 2):S205-213.
6. Manuel du HCB pour l'utilisation confinée d'organismes génétiquement modifiés. Haut Conseil des Biotechnologies; 2019 juill.
7. Chabannon C, Sabatier F, Rial-Sebbag E, Calmels B, Veran J, Magalon G, et al. Les unités de thérapie cellulaire à l'épreuve de la réglementation sur les médicaments de thérapie innovante. Médecine Sci. 1 mai 2014;30(5):576-83.
8. Directive 2004/23/CE du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 relative à l'établissement de normes de qualité et de sécurité pour le don, l'obtention, le contrôle, la transformation, la conservation, le stockage et la distribution des tissus et cellules humains. Journal officiel de l'Union européenne avr 7, 2004 p. 48-58.

9. Directive 2009/120/CE de la Commission du 14 septembre 2009 modifiant la directive 2001/83/CE du Parlement européen et du Conseil instituant un code communautaire relatif aux médicaments à usage humain en ce qui concerne les médicaments de thérapie innovante. Journal officiel de l'Union européenne sept 15, 2009 p. 3-12.
10. Loi n°2011-302 du 22 mars 2011 portant diverses dispositions d'adaptation de la législation au droit de l'Union européenne en matière de santé, de travail et de communications électroniques. Journal officiel de la République française mars 23, 2011.
11. Décret n°2012-1236 du 6 novembre 2012 relatif aux médicaments de thérapie innovante. Journal officiel de la République française nov 6, 2012.
12. Loi n°2016-41 du 26 janvier 2016 de modernisation de notre système de santé. Journal officiel de la République française janv 27, 2016.
13. Arrêté du 4 février 2013 fixant le contenu des demandes d'autorisation initiale, de renouvellement d'autorisation ou de modification d'autorisation des médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement et des établissements ou organismes qui préparent ces produits. Journal officiel de la République française févr 13, 2013.
14. Article R4211-32. Code de la Santé Publique nov 18, 2016.
15. Médicaments de thérapie innovante préparé ponctuellement et préparations : Synthèse du cadre réglementaire applicable pour la fabrication, le développement et la mise sur le marché de ces produits. ANSM; 2012 juin p. 32.
16. Chabannon C, Larghero J. Réglementations applicables aux CAR-T cells : comment les établissements de santé français peuvent-ils s'organiser pour participer à la production et permettre la délivrance de ces immunothérapies innovantes ? Bull Cancer (Paris). 1 déc 2018;105(Suppl 2):S198-204.
17. Directive 2002/98/CE du Parlement européen et du Conseil du 27 janvier 2003 établissant des normes de qualité et de sécurité pour la collecte, le contrôle, la transformation, la conservation et la distribution du sang humain, et des composants

sanguins, et modifiant la directive 2001/83/CE. Journal officiel de l'Union européenne févr 8, 2003 p. 30-40.

18. Directive 2001/20/CE du Parlement Européen et du Conseil du 4 avril 2001 concernant le rapprochement des dispositions législatives, réglementaires et administratives des États membres relatives à l'application de bonnes pratiques cliniques dans la conduite d'essais cliniques de médicaments à usage humain. Journal officiel des Communautés européennes mai 1, 2001 p. 34-44.
19. Directive 2005/28/CE de la Commission du 8 avril 2005 fixant des principes et des lignes directrices détaillées relatifs à l'application de bonnes pratiques cliniques en ce qui concerne les médicaments expérimentaux à usage humain, ainsi que les exigences pour l'octroi de l'autorisation de fabriquer ou d'importer ces médicaments. Journal officiel de l'Union européenne avr 9, 2005 p. 13-9.
20. Guidelines on Good Clinical Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products. European Commission; 2019 oct.
21. Règlement (UE) n°536/2014 du Parlement européen et du Conseil du 16 avril 2014 relatif aux essais cliniques de médicaments à usage humain et abrogeant la directive 2001/20/CE. Journal officiel de l'Union européenne mai 27, 2014 p. 1-76.
22. Règlement (CE) n°726/2004 du Parlement européen et du Conseil du 31 mars 2004 établissant des procédures communautaires pour l'autorisation et la surveillance en ce qui concerne les médicaments à usage humain et à usage vétérinaire, et instituant une Agence européenne des médicaments. Journal officiel de l'Union européenne avr 30, 2004 p. 1-33.
23. Directive 2003/94/CE de la Commission du 8 octobre 2003 établissant les principes et lignes directrices de bonnes pratiques de fabrication concernant les médicaments à usage humain et les médicaments expérimentaux à usage humain. Journal officiel de l'Union européenne oct 14, 2003 p. 22-6.

24. Biologicals: active substance [Internet]. European Medicines Agency. 2018 [cité 14 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/research-development/scientific-guidelines/biologicals/biologicals-active-substance>
25. Guidelines on Good Manufacturing Practice specific to Advanced Therapy Medicinal Products. European Commission; 2017 nov.
26. Guide des Bonnes Pratiques de Fabrication. ANSM; 2019 mai.
27. Bonnes Pratiques de Préparation. AFSSAPS; 2007 déc.
28. Recommandations S.F.P.O. sur le circuit hospitalier des Médicaments de Thérapies Innovantes (MTI). SFPO; 2015.
29. Arrêté du 28 mars 2019 limitant l'utilisation de médicament de thérapie innovante à base de lymphocytes T génétiquement modifiés dits CAR-T Cells autologues indiqués dans le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique à cellules B et/ou du lymphome à grande cellule B, à certains établissements de santé en application des dispositions de l'article L. 1151-1 du Code la Santé Publique. Journal officiel de la République française avr 10, 2019.
30. Décret n°2019-489 du 21 mai 2019 relatif aux pharmacies à usage intérieur. Journal officiel de la République française mai 21, 2019.
31. Article R5126-25. Code de la santé publique mai 21, 2019.
32. Barkats M. Amyotrophie spinale infantile - De la découverte du gène à la thérapie génique. Médecine Sci. 1 févr 2020;36(2):137-40.
33. Thérapie génique - Une recherche de longue haleine qui porte ses fruits [Internet]. Inserm. 2018 [cité 11 août 2020]. Disponible sur: <https://www.inserm.fr/information-en-sante/dossiers-information/therapie-genique>
34. Cordelier P, Buscail L. La thérapie génique : une réalité pour demain ? Gastroentérologie Clin Biol. juin 2005;29(6-7):724-31.

35. Ceppi F, Renella R, Diezi M, Ansari M, Duchosal MA, Arber C, et al. Progrès récents et orientations futures de la thérapie avec cellules CAR-T en oncologie pédiatrique. *Rev Médicale Suisse*. 2019;15:85-91.
36. Rubio M-T, Galaine J, Borg C, Daguindau É. Biologie, concepts et principes des CAR-T cells. *Bull Cancer (Paris)*. 1 déc 2018;105(Suppl 2):S135-146.
37. Hugerot H. Définition et mise en œuvre des prérequis à l'ouverture d'une unité de préparation de médicaments de thérapie génique au CHRU de Brest [Thèse Pharm]. Université de Nantes; 2018.
38. Ravat F, Jault P, Gabard J. Bactériophages et phagothérapie : utilisation de virus naturels pour traiter les infections bactériennes. *Ann Burns Fire Disasters*. mars 2015;XXVIII(1):13-20.
39. Dufour N, Debarbieux L. La phagothérapie : une arme crédible face à l'antibiorésistance. *Med Sci*. avr 2017;33(4):410-6.
40. Cornuault J, Petit M-A, De Paepe M. Bactériophages et dysbiose intestinale. *Assoc Anc Elèves Inst Pasteur*. mars 2016;58(226):7-10.
41. De Paepe M, Petit M-A. Bactériophages et microbiote intestinal. *Assoc Anc Elèves Inst Pasteur*. mars 2016;58(226):4-6.
42. Dufour N, Chevallereau A, Debarbieux L. Les bactériophages: Comment ces virus alliés fonctionnent-ils? *Biofutur*. 1 févr 2016;35(373):31-4.
43. Abedon ST, Thomas-Abedon C, Thomas A, Mazure H. Bacteriophage prehistory. *Bacteriophage*. 2011;1(3):174-8.
44. Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris JG. Bacteriophage Therapy. *Antimicrob Agents Chemother*. 1 mars 2001;45(3):649-59.
45. Article L5111-1. Code de la Santé Publique févr 27, 2007.
46. Article L5121-1. Code de la Santé Publique janv 1, 2019.

47. Règlement (CEE) n°2309/93 du Conseil du 22 juillet 1993 établissant des procédures communautaires pour l'autorisation et la surveillance des médicaments à usage humain et à usage vétérinaire et instituant une agence européenne pour l'évaluation des médicaments. Journal officiel des Communautés européennes août 24, 1993 p. 1-21.
48. Jordan B. Cent ans après, le retour de la phagothérapie ? Med Sci. 2019;35(10):806-089.
49. Article L5121-6. Code de la Santé Publique juin 22, 2000.
50. Patey O, McCallin S, Mazure H, Liddle M, Smithyman A, Dublanche A. Clinical indications and compassionate use of phage therapy: personal experience and literature review with a focus on osteoarticular infections. Viruses. 2018;11(18):1-21.
51. Pirnay J-P, Verbeken G, Ceyssens P-J, Huys I, De Vos D, Ameloot C, et al. The magistral phage. Viruses. 2018;10(64):1-7.
52. Hyman P. Phages for Phage Therapy: Isolation, Characterization, and Host Range Breadth. Pharmaceuticals. 11 mars 2019;12(1):1-23.
53. Comité Scientifique Spécialisé Temporaire. Phagothérapie - Retour d'expérience et perspectives. ANSM; 2019 mars.
54. Dublanche A, Ricard J-D. Les bactériophages utilisés comme médicament : nouveau concept thérapeutique. Assoc Anc Elèves Inst Pasteur. mars 2016;58(226):16-20.
55. Pirnay J-P, Verbeken G, Ceyssens P-J, Huys I, De Vos D, Ameloot C, et al. The magistral phage - supplement. Viruses. 2018;10(64):1-3.
56. Górski A, Ważna E, Dąbrowska B-W, Dąbrowska K, Świtała-Jeleń K, Międzybrodzki R. Bacteriophage translocation. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006;46(3):313-9.
57. Dubos RJ, Straus JH, Pierce C. The multiplication of bacteriophage in vivo and its protective effect against an experimental infection with *Shigella dysenteriae*. J Exp Med. 1 sept 1943;78(3):161-8.



58. Wiggins BA, Alexander M. Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Appl Environ Microbiol.* janv 1985;49(1):19-23.
59. Dufour N, Ricard J-D, De Paepe M. La phagothérapie dans les infections pulmonaires. *Assoc Anc Elèves Inst Pasteur.* mars 2016;58(226):11-5.
60. Hughes KA, Sutherland IW, Jones MV. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack : the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiology.* 1998;144:3039-47.
61. Pires DP, Oliveira H, Melo LDR, Sillankorva S, Azeredo J. Bacteriophage-encoded depolymerases: their diversity and biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* mars 2016;100(5):2141-51.
62. Morris J, Kelly N, Elliott L, Grant A, Wilkinson M, Hazratwala K, et al. Evaluation of Bacteriophage Anti-Biofilm Activity for Potential Control of Orthopedic Implant-Related Infections Caused by *Staphylococcus aureus*. *Surg Infect.* janv 2019;20(1):16-24.
63. Akanda ZZ, Taha M, Abdelbary H. The rise of bacteriophage as a unique therapeutic platform in treating peri-prosthetic joint infections. *J Orthop Res.* 2018;36(4):1051-60.
64. Ferry T, Leboucher G, Fevre C, Herry Y, Conrad A, Josse J, et al. Salvage 'DAIR' (debridement, antibiotics and implant retention) with local injection of a selected cocktail of bacteriophages: is it an option for an elderly patient with relapsing *S. aureus* prosthetic-joint infection? *Open Forum Infect Dis.* 24 oct 2018;1-4.
65. Ferry T, Boucher F, Fevre C, Perpoint T, Chateau J, Petitjean C, et al. Innovations for the treatment of a complex bone and joint infection due to XDR *Pseudomonas aeruginosa* including local application of a selected cocktail of bacteriophages. *J Antimicrob Chemother.* 1 oct 2018;73(10):2901-3.
66. Saussereau E, Vachier I, Chiron R, Godbert B, Sermet I, Dufour N, et al. Effectiveness of bacteriophages in the sputum of cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect.* 1 déc 2014;20(12):O983-990.

67. Febvre HP, Rao S, Gindin M, Goodwin NDM, Finer E, Vivanco JS, et al. PHAGE Study: Effects of Supplemental Bacteriophage Intake on Inflammation and Gut Microbiota in Healthy Adults. *Nutrients*. 20 mars 2019;11(3):1-12.
68. Rhoads DD, Wolcott RD, Kuskowski MA, Wolcott BM, Ward LS, Sulakvelidze A. Bacteriophage therapy of venous leg ulcers in humans: results of a phase I safety trial. *J Wound Care*. juin 2009;18(6):237-43.
69. Leitner L, Sybesma W, Chanishvili N, Goderdzishvili M, Chkhotua A, Ujmajuridze A, et al. Bacteriophages for treating urinary tract infections in patients undergoing transurethral resection of the prostate: a randomized, placebo-controlled, double-blind clinical trial. *BMC Urol*. 26 sept 2017;17(1):1-6.
70. Wright A, Hawkins CH, Änggard EE, Harper DR. A controlled clinical trial of a therapeutic bacteriophage preparation in chronic otitis due to antibiotic-resistant *Pseudomonas aeruginosa*; a preliminary report of efficacy. *Clin Otolaryngol*. 2009;34:349-57.
71. Jault P, Leclerc T, Jennes S, Pirnay JP, Que Y-A, Resch G, et al. Efficacy and tolerability of a cocktail of bacteriophages to treat burn wounds infected by *Pseudomonas aeruginosa* (PhagoBurn): a randomised, controlled, double-blind phase 1/2 trial. *Lancet Infect Dis*. janv 2019;19(1):35-45.
72. Sarker SA, Sultana S, Reuteler G, Moine D, Descombes P, Charton F, et al. Oral phage therapy of acute bacterial diarrhea with two coliphage preparations: a randomized trial in children from bangladesh. *EBioMedicine*. 5 janv 2016;4:124-37.
73. Górski A, Międzybrodzki R, Łobocka M, Głowacka-Rutkowska A, Bednarek A, Borysowski J, et al. Phage Therapy: What Have We Learned? *Viruses*. 28 2018;10(6):1-28.
74. Speck P, Smithyman A. Safety and efficacy of phage therapy via the intravenous route. Millard A, éditeur. *FEMS Microbiol Lett*. févr 2016;363(3):1-5.
75. Alisky J, Iczkowski K, Rapoport A, Troitsky N. Bacteriophages show promise as antimicrobial agents. *J Infect*. janv 1998;36(1):5-15.

76. Ujmajuridze A, Chanishvili N, Goderdzishvili M, Leitner L, Mehnert U, Chkhotua A, et al. Adapted Bacteriophages for Treating Urinary Tract Infections. *Front Microbiol.* 7 août 2018;9:1-7.
77. Berger Savin M. La phagothérapie : historique et potentielle utilisation contre les infections à bactéries multirésistantes [Thèse]. Faculté de médecine de Créteil; 2014.
78. Article R4421-3. Code du travail mai 1, 2008.
79. Bleux C, Brion P, Jacquier M, Montfort P, Munch S, Nicolas S, et al. Les cahiers de prévention - risques biologiques. CNRS; 2012 août p. 80.
80. Lecchi L, Giovanelli S, Gagliardi B, Pezzali I, Ratti I, Marconi M. An update on methods for cryopreservation and thawing of hemopoietic stem cells. *Transfus Apher Sci.* juin 2016;54(3):324-36.
81. Woods EJ, Thirumala S, Badhe-Buchanan SS, Clarke D, Mathew AJ. Off the shelf cellular therapeutics: Factors to consider during cryopreservation and storage of human cells for clinical use. *Cytotherapy.* 2016;18(6):697-711.
82. Recommandations de bonne pratique - Cryopréservation de tissus, cellules et liquides biologiques issus du soin. HAS; 2009 sept.
83. Guide OGM en milieu confiné. Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche; 2013 juin.
84. Directive 2009/41/CE du Parlement Européen et du Conseil du 6 mai 2009 relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés. *Journal officiel de l'Union européenne* mai 21, 2009 p. 75-97.
85. Arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en oeuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyses, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être

exposés à des agents biologiques pathogènes. Journal officiel de la République française août 4, 2007 p. 13106.

86. Pinturaud M, Nassar C, Vasseur M, Odou P. Prise en charge des Médicaments de Thérapie Innovante (MTI) à l'hôpital : circuits envisagés au CHRU de Lille. In GERPAC; 2017.
87. Bernard C, Escalup L, Hild P. Le pharmacien hospitalier face aux MTI : quelle pharmacotechnie ? In GERPAC; 2017.
88. Pernot C, Mureau P, Hargreaves J, Bernard C. Conception d'une installation pour la fabrication des MTI. In GERPAC; 2017.
89. Décret n°94-352 du 4 mai 1994 relatif à la protection des travailleurs contre les risques résultant de leur exposition à des agents biologiques et modifiant le code du travail. Journal officiel de la République française, 105 mai 6, 1994.
90. Carbasse C, Deluca B, Bertault Peres P, Pourroy B. Médicaments de Thérapie Innovante : Qualification d'un autoclave compact en vue du traitement des déchets de production des préparations de Talimogène laherparepvec. In GERPAC; 2018.
91. Manuel de sécurité biologique en laboratoire, 3ème édition. Organisation Mondiale de la Santé; 2005.
92. Pignard J, Bernard L, Chennell P, Sautou V. Gestion pharmaceutique des études cliniques de thérapie génique en France. Pharm Hosp Clin. 1 déc 2015;50(4):434-43.
93. Quincampoix JC, Mainardi JL. Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. Réanimation. 1 mai 2001;10(3):267-75.
94. Ferry T, Leboucher G, Lustig S, Boucher F, Fanneau de la Horie G-C, Gabard J, et al. Complex bone and joint infections: treatment with bacteriophages as salvage therapy. AMR Control. 2018;104-10.
95. PhagoBurn - Evaluation of phage therapy for the treatment of Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa burn wound infections (Phase I-II clinical trial) [Internet]. [cité 156

- 1 sept 2020]. Disponible sur: <https://cordis.europa.eu/docs/results/601/601857/final1-phagoburn-final-publishable-summary-report.pdf>
96. Novagen. Protocole TB261 Benzonase® Nuclease [Internet]. [cité 24 août 2020]. Disponible sur: [https://www.merckmillipore.com/FR/fr/product/Benzonase-Nuclease-Purity-990-0,EMD\\_BIO-70664#anchor\\_BRO](https://www.merckmillipore.com/FR/fr/product/Benzonase-Nuclease-Purity-990-0,EMD_BIO-70664#anchor_BRO)
97. Regulski K, Champion-Arnaud P, Gabard J. Bacteriophage manufacturing: from early twentieth-century processes to current GMP. In: Harper DR, Abedon ST, Burrowes BH, McConville ML, éditeurs. Bacteriophages. Springer International Publishing; 2018. p. 1-31.
98. Bouslamti R. L'adsorption des phages chez rhizobium meliloti : rôle des lipopolysaccharides [Thèse Sci]. Université des sciences et techniques de Lille Flandres Artois; 1989.
99. Rotunda AM, Weiss SR, Rivkin LS. Randomized double-blind clinical trial of subcutaneously injected deoxycholate versus a phosphatidylcholine-deoxycholate combination for the reduction of submental fat. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al*. mai 2009;35(5):792-803.
100. Salti G, Ghersetich I, Tantussi F, Bovani B, Lotti T. Phosphatidylcholine and sodium deoxycholate in the treatment of localized fat: a double-blind, randomized study. *Dermatol Surg Off Publ Am Soc Dermatol Surg Al*. janv 2008;34(1):60-6.
101. Odo MEY, Cucé LC, Odo LM, Natrielli A. Action of Sodium Deoxycholate on Subcutaneous Human Tissue: Local and Systemic Effects. *Dermatol Surg*. 2007;33(2):178-89.
102. GIBCO. Buffered Saline Solutions [Internet]. 2019 [cité 1 sept 2020]. Disponible sur: [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0018562\\_BufferedSalineSolutions\\_IFU.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0018562_BufferedSalineSolutions_IFU.pdf)

103. DPBS, no calcium, no magnesium [Internet]. ThermoFischer. [cité 1 sept 2020]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/technical-resources/media-formulation.147.html>
104. Solution saline dans un tampon phosphate de Dulbecco (DPBS) Gibco™ sans calcium ni magnésium [Internet]. ThermoFischer. [cité 1 sept 2020]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/14190144>
105. Outil régional de gestion des risques et guide méthodologique [Internet]. [cité 1 sept 2020]. Disponible sur: <https://www.iledefrance.ars.sante.fr/nutrition-parenterale-pediatrique>
106. Pharmacopée Européenne. 9<sup>e</sup> éd. EDQM; 2016. 1-1736 p.
107. BD. BACTEC Plus Aerobic/F Culture Vials et BACTEC Plus Anaerobic/F Culture Vials (Flacons de culture) [Internet]. [cité 2 sept 2020]. Disponible sur: [https://www.dufortlavigne.com/system/files/fiches/techniques\\_fr/BEC442023.pdf](https://www.dufortlavigne.com/system/files/fiches/techniques_fr/BEC442023.pdf)
108. Integrity Testing. In: Sterile Filtration. Springer-Verlag; 2006. p. 143-80. (Adv Biochem Engin/Biotechnol).
109. Wenten IG, Khoiruddin K, Hakim AN, Himma NF. Chapter 11 - The Bubble Gas Transport Method. In: Hilal N, Ismail AF, Matsuura T, Oatley-Radcliffe D, éditeurs. Membrane Characterization. Elsevier; 2017. p. 199-218.
110. Horibe A, Fukusako S, Yamada M. Surface tension of low-temperature aqueous solutions. Int J Thermophys. 1 mars 1996;17(2):483-93.
111. Etiquetage des préparations magistrales, officinales et hospitalières : Logigramme A Etiquetage d'une préparation administrée directement au patient [Internet]. ANSM; 2013 mars [cité 5 août 2020]. Disponible sur: <https://ansm.sante.fr/S-informer/Points-d-information-Points-d-information/Etiquetage-des-preparations-magistrales-officinales-et-hospitalieres-precisions-et-recommandations-relatives-a-l-application-du-decret-n-2012-1201-Point-d-information>

## ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné (e) Alexia Jouvance-Le Bail

Déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiés constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée. (*Décret n°92-657 du 13 juillet 1992*)

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce mémoire.

Signature :



**SIGNATURES DU DIRECTEUR DE THESE ET DU DOYEN**

N° Étudiant : 21609722

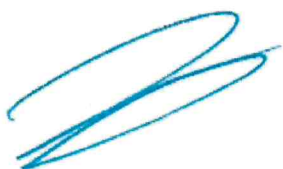
N° Thèse : 46

Nom et Prénom : JOUVANCE-LE BAIL Alexia

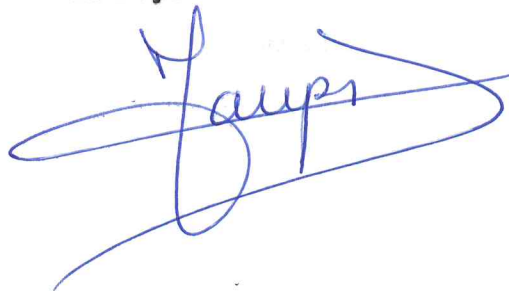
Sujet : Nouvelles thérapeutiques et médicaments de thérapie innovante : quelles  
organisation à mettre en place à la PUI du CHU de Rennes ?

Tours, le : 02/10/20

Le(s) Directeur(s) de Thèse :



Vu et Transmis :  
Le Doyen





NOM, PRÉNOM de l'étudiant : JOUVANCE-LE BAIL Alexia

N°46

#### TITRE DE LA THÈSE

« Nouvelles thérapeutiques et médicaments de thérapie innovante :  
quelles organisations à mettre en place à la PUI du CHU de Rennes ? »

#### RÉSUMÉ DE LA THÈSE

Les médicaments de thérapie innovante bénéficiant désormais d'un cadre légal adapté, il est devenu nécessaire pour les pharmacies hospitalières d'obtenir une autorisation expresse concernant cette activité, comme spécifié par le décret du 21 mai 2019 relatif aux Pharmacies à Usage Intérieur (PUI). Ces médicaments, en particulier ceux relevant de la thérapie génique, imposent toutefois un certain nombre de contraintes pharmacotechniques.

A l'inverse, si les bactériophages utilisés à visée thérapeutique répondent à la définition de médicament, ils ne bénéficient pour l'instant pas d'une réglementation adaptée au niveau français ou européen, bloquant ainsi le développement pharmaceutique de ces traitements. La phagothérapie peut donc être utilisée pour l'instant uniquement dans le cadre d'un usage compassionnel, à partir d'une matière première non pharmaceutique. Les bactériophages, qui pourraient se voir classés comme médicaments biologiques, voir même comme médicaments de thérapie innovante, doivent donc dorénavant être pris en compte dans les réflexions relatives à l'évolution de la conception des locaux et équipements des PUI, notamment dans le cadre du décret PUI concernant les MTI.

Au vu de leur intérêt potentiel dans le traitement des infections liées à des bactéries multi-résistantes, et en attendant l'évolution de la réglementation, la PUI du CHU de Rennes s'est préparée afin d'accompagner le CRIOGO dans la mise à disposition, en dernier recours, de la phagothérapie compassionnelle pour les patients souffrant d'infections ostéoarticulaires chroniques. En fonction de l'avis de l'ANSM, un premier patient pourrait ainsi accéder à ce traitement en Bretagne.

La pharmacotechnie du CHU de Rennes s'est également engagée dans une démarche d'évolution afin d'obtenir l'autorisation à la préparation de MTI, conformément au décret PUI de 2019. Outre la pérennisation de l'activité MTI déjà développée, cette autorisation permettra la préparation de médicaments OGM de classe C2.

MOTS-CLÉS SIGNIFICATIFS : médicament de thérapie innovante, MTI, OGM, thérapie génique, CAR-T cells, bactériophage, phagothérapie, agent biologique, agent infectieux, pharmacotechnie

#### JURY

PRÉSIDENTE : Mme FOUCAULT-FRUCHARD Laura, AHU, Faculté de pharmacie – TOURS

MEMBRES : Mme LESTER Marie-Antoinette, PH, CHU de Pontchaillou – RENNES

Mme POTIN Sophie, MCU-PH, Faculté de pharmacie – RENNES

Mme GOUGEON Anne, PU-PH, Faculté de pharmacie – RENNES

DATE ET LIEU DE SOUTENANCE : 02 octobre 2020 - Faculté de Pharmacie "Philippe-Maupas"