

PROCEDE ET DISPOSITIF POUR LA PREPARATION D'UN IMPLANT ISSU D'UNE CULTURE DE CELLULES SOUCHES

La présente invention concerne la préparation d'un greffon implantable, obtenu à partir d'une culture de cellules souches, notamment des cellules souches de mammifères ou de tout autre type permettant d'obtenir des cellules de l'œil. La présente invention s'applique notamment
5 au traitement de maladies de l'épithélium pigmentaire rétinien et de la rétine neurale.

La rétine est la couche sensorielle qui tapisse la face postérieure de l'œil, reçoit l'image formée par la lentille, traduit cette image en impulsions neuronales qui sont transmises au cerveau par le nerf optique. La rétine est
10 un tissu neuronal qui interagit de façon critique avec l'épithélium pigmentaire rétinien qui lui est nécessaire à sa survie et son bon fonctionnement. La macula constituant la partie centrale de la rétine, est enrichie en photorécepteurs capables de percevoir les différentes couleurs et les détails visuels fins. La macula est donc cruciale notamment pour la reconnaissance
15 faciale et la lecture.

De nombreuses maladies peuvent affecter l'épithélium pigmentaire rétinien ou la rétine neurale et entraîner une altération de la vision pouvant conduire à la cécité. Parmi ces maladies, on peut citer en particulier les dégénérescences maculaires héréditaires ou liées à l'âge, les dystrophies
20 maculaires, et les rétinites pigmentaires. L'épithélium rétinien ou la rétine neurale peut également présenter des lésions d'origine traumatique ou infectieuse. Des recherches récentes semblent démontrer que les lésions de la rétine peuvent être retardées, arrêtées, voire être réparées par la transplantation de cellules d'épithélium pigmentaire rétinien ou de cellules
25 rétinienne dans l'espace sous-rétinien, ce qui peut prévenir la réduction des capacités visuelles provoquée par ces maladies ou les améliorer dans le cas de greffes de cellules de la rétine neurale.

On a proposé diverses formes de greffes ou de techniques de transplantation pour tenter de préserver la rétine. Plus récemment, des
30 résultats prometteurs ont été obtenus en transplantant une culture de cellules

d'épithélium pigmentaire rétinien obtenues par différenciation de cellules souches pluripotentes, les cellules étant cultivées sur une membrane.

Pour préparer un implant à partir d'une telle membrane, la membrane doit être retirée d'un support de culture, et être recouverte des deux côtés d'une couche de gélatine. A cet effet, la couche de gélatine est préalablement amincie et uniformisée en lui retirant une couche supérieure à l'aide d'une machine de découpe adaptée, appelée "vibratome". La membrane est ensuite disposée sur la couche de gélatine amincie. La couche de gélatine est à nouveau amincie à l'épaisseur souhaitée en lui retirant une couche inférieure à l'aide de la machine de découpe. Finalement, une goutte de gélatine liquide (à 37°C + ou - 10°C) est versée sur les cellules cultivées sur la membrane, la gélatine étant polymérisée à froid. La membrane qui est ainsi disposée entre deux couches de gélatine polymérisée, est alors conservée et transportée telle qu'elle sur le site d'utilisation. Au moment de la transplantation, la membrane doit être découpée manuellement sensiblement à la forme souhaitée, généralement sous microscope. La transplantation est généralement effectuée à l'aide d'une seringue avec une aiguille ayant un diamètre inférieur aux dimensions de l'implant. Il en résulte que l'implant traverse l'aiguille enroulé sur lui-même.

Il s'avère que ce procédé de préparation présente une grande complexité, nécessitant de nombreuses manipulations manuelles exercées directement sur la membrane, sans que celle-ci soit protégée. Il en résulte de nombreux risques d'altération et d'infection pour la culture. Il s'avère également que les couches de gélatine de chaque côté de la membrane présentent des épaisseurs variables, qui sont en outre non uniformes. En effet, la précision de la machine de découpe s'avère insuffisante et le procédé employé pour former la couche de gélatine supérieure conduit généralement à la réalisation d'une couche bombée. La machine de découpe s'avère également encombrante. De telles variations d'épaisseur entraînent des risques que l'implant reste enroulé sur lui-même lorsqu'il sort de l'aiguille d'injection. Dans le cas de cellules d'épithélium pigmentaire rétinien, l'implant doit être inséré sous la rétine. Il faut donc éviter qu'il soit trop épais lors de son positionnement sous la rétine. Par ailleurs, comme la membrane est séparée de son support de culture, il est difficile de visualiser de quel côté de

la membrane se trouve la culture. Il en résulte des risques importants que l'implant soit positionné du mauvais côté à l'issue de l'opération de transplantation.

Il est donc souhaitable de prévoir un procédé simplifié pour réaliser un tel implant, en éliminant les risques d'altération et de contamination de la culture. Il est également souhaitable que l'implant présente une épaisseur maîtrisée. Il peut être également souhaitable que l'implant présente des dimensions également maîtrisées, en particulier non liées à des opérations manuelles. Il peut être également souhaitable d'éliminer les erreurs de positionnement de l'implant au moment de la transplantation.

Des modes de réalisation concernent un procédé de préparation d'un implant comprenant une culture de cellules sur une membrane, le procédé comprenant des étapes consistant à : fixer la membrane sur un support, disposer le support dans un logement d'un boîtier ménageant deux espaces ayant des hauteurs ajustées, au-dessus et en dessous de la membrane, injecter dans les espaces un liquide apte à se transformer en gel à une température de transport inférieure à une température d'injection du liquide, et porter le boîtier à la température de transport, de manière à former un implant comprenant la membrane et deux couches de gel ayant des épaisseurs ajustées, respectivement sur deux faces opposées de la membrane.

Selon un mode de réalisation, le procédé comprend une étape de découpe de l'implant dans la membrane et les deux couches de gel, la membrane étant fixée au support et disposée dans le logement.

Selon un mode de réalisation, le procédé comprend une étape de fermeture du logement du boîtier recevant la membrane par un couvercle d'extraction, le couvercle d'extraction étant configuré pour recevoir et guider un outil de découpe configuré pour découper l'implant dans la membrane et les deux couches de gel.

Selon un mode de réalisation, l'implant présente une forme dissymétrique.

Selon un mode de réalisation, les espaces au-dessus et en dessous de la membrane sont formés entre le fond du logement et un couvercle de préparation adapté à refermer le logement.

Selon un mode de réalisation, le procédé comprend une étape de remplacement du couvercle de préparation par un couvercle de transport refermant le logement de manière étanche, lorsque le liquide injecté dans le logement s'est polymérisé en gel.

- 5 Selon un mode de réalisation, les liquides injectés dans les espaces supérieur et inférieur sont différents, de manière à ce que la couche de gel supérieure soit moins rigide que la couche de gel inférieure.

- Selon un mode de réalisation, les cellules disposées sur la membrane sont dérivées de cellules souches pluripotentes, de cellules souches adultes
10 multipotentes ou bien sont issues de cultures primaires ou de lignées cellulaires, ou bien correspondent à un type cellulaire de la zone d'implantation, ou bien sont des cellules épithéliales simples ou de différents sous-types, tels que des photorécepteurs, des cellules ganglionnaires, des cellules bipolaires, des cellules amacrines, des cellules de l'épithélium
15 pigmentaire rétinien, des cellules endothéliales. Les cellules souches pluripotentes humaines utilisées pour la mise en œuvre de l'invention ne nécessitent pas la destruction d'embryon humain.

- Des modes de réalisation peuvent également concerner un dispositif de préparation d'un implant à partir d'une culture de cellules sur une
20 membrane, le dispositif comprenant : un support maintenant la membrane, un boîtier comportant un logement pour recevoir le support associé à la membrane, le logement ménageant deux espaces ayant des hauteurs ajustées, au-dessus et en dessous de la membrane, et un orifice de remplissage pour injecter un liquide dans les deux espaces, le liquide étant
25 apte à se transformer en gel à une température de transport inférieure à une température d'injection du liquide, le dispositif étant configuré pour mettre en œuvre le procédé selon l'invention.

- Selon un mode de réalisation, le dispositif comprend un couvercle de préparation configuré pour refermer le logement avec le support, le couvercle
30 de préparation délimitant avec la membrane l'espace supérieur, l'espace inférieur étant délimité par le fond du logement et la membrane, le couvercle de préparation comprenant un orifice de remplissage débouchant dans l'espace supérieur, le boîtier comprenant un orifice de remplissage débouchant dans l'espace inférieur.

Selon un mode de réalisation, le dispositif comprend un couvercle de transport prévu pour refermer le logement de manière étanche.

Selon un mode de réalisation, le dispositif comprend un couvercle d'extraction prévu pour refermer le logement et comportant un conduit pour
5 le passage d'un outil de découpe configuré pour découper un morceau de la membrane incluant des cellules cultivées, le morceau de membrane découpé formant l'implant.

Selon un mode de réalisation, le dispositif comprend au moins l'une des caractéristiques suivantes : les deux espaces présentent une hauteur
10 comprise entre 0,05 et 0,2 mm, ou bien entre 0,13 et 0,17 mm, l'implant présente une surface comprise entre 10 et 20 mm². la membrane est une membrane amniotique, ou une membrane de Bruch, ou une membrane basale, ou une matrice de fibres protéiques telles que des fibres de collagène et/ou de fibrine ou une membrane en un matériau synthétique
15 biocompatible, biodégradable ou non, le liquide se transformant en gel est un hydrogel naturel ou synthétique biocompatible, qui est liquide à la température intérieure du corps humain, le support de membrane présente une forme tronconique comportant une grande ouverture et une petite ouverture, la membrane étant fixée sur le support de manière à obturer la
20 petite ouverture, la culture de cellules étant réalisée sur une face de la membrane disposée à l'intérieur du support, l'outil de découpe est configuré pour découper un morceau de membrane de forme dissymétrique.

Des modes de réalisation peuvent également concerner une utilisation du dispositif précédemment défini, pour réaliser un implant de
25 cellules cultivées sur une membrane.

Des exemples de réalisation de l'invention seront décrits dans ce qui suit, à titre non limitatif en relation avec les figures jointes parmi lesquelles :

les figures 1 et 2 sont des vues en perspective et en vue axiale
30 éclatée d'un dispositif support de culture de cellules, selon un mode de réalisation,

les figures 3 à 5 sont, respectivement une vue de dessus, une vue de profil et une vue de dessous d'un dispositif de manipulation d'une culture de cellules, selon un mode de réalisation,

les figures 6 et 7 sont, respectivement une vue de dessus, une vue de profil d'un couvercle de préparation d'un implant, adapté pour se fixer sur le dispositif de manipulation, selon un mode de réalisation,

la figure 8 est une vue de profil du couvercle de préparation, en coupe
5 suivant un plan BB montré sur la figure 6,

les figures 9 et 10 sont des vues de profil, respectivement éclatée et non éclatée, du dispositif de manipulation montré en coupe suivant le plan AA indiqué sur la figure 3, associé au couvercle de préparation montré en coupe suivant le plan CC indiqué sur la figure 6,

la figure 10A est une vue de profil en coupe détaillée d'une partie du
10 dispositif de manipulation muni du couvercle de préparation,

la figure 11 est une vue de dessus d'un couvercle de transport, adapté pour se fixer sur le dispositif de manipulation, selon un mode de réalisation,

la figure 12 est une vue de profil du couvercle de transport, en coupe
15 suivant le plan DD montré sur la figure 11,

la figure 13 est une vue du dispositif de manipulation en coupe suivant le plan AA montré sur la figure 3, associé au couvercle de transport en coupe suivant le plan DD montré sur la figure 11,

la figure 14 est une vue de dessus d'un couvercle d'extraction de
20 l'implant, selon un mode de réalisation,

les figures 15 et 16 sont des vues de profil en coupe, respectivement éclatée et non éclatée, du dispositif de manipulation muni du couvercle d'extraction, et d'un dispositif de découpe, selon un mode de réalisation, le
25 couvercle d'extraction figurant en coupe suivant le plan EE montré sur la figure 14, le dispositif de préparation figurant en coupe suivant le plan AA montré sur la figure 3, et le dispositif de découpe figurant en coupe suivant le plan FF montré sur la figure 17,

la figure 17 est une vue axiale détaillée de dessous de l'extrémité
30 inférieure du dispositif de découpe et d'une partie du couvercle d'extraction,

la figure 18 est une vue schématique en coupe d'un implant obtenu par le procédé selon un mode de réalisation.

Les figures 1 et 2 représentent un dispositif 30 supportant une culture de cellules, selon un mode de réalisation. Le dispositif support 30 comprend
35 un élément tubulaire 31, de forme tronconique, par exemple à section

circulaire, sur lequel vient s'engager une couronne 32. L'élément tubulaire 31 présente ainsi, respectivement à ses deux extrémités, deux ouvertures ayant des diamètres ou largeurs différentes, l'ouverture de plus petite largeur étant présentée vers le bas sur les figures 1 et 2.

5 La couronne 32 présente également une forme tronconique dont la section présente une forme identique à celle de l'élément tubulaire 31. Le bord de l'ouverture de plus grande largeur de la couronne 32 peut comprendre des picots 33 s'étendant axialement. Les picots permettent de distinguer plus facilement les ouvertures de la couronne 32 pour engager
10 celle-ci sur l'élément tubulaire 31 dans le sens correct.

 La largeur de la couronne 32 est telle que cette dernière peut coulisser seulement le long d'une partie de l'élément tubulaire 31, à partir de l'ouverture de plus petite largeur de l'élément tubulaire 31. Les cellules sont cultivées sur une membrane 34 qui est fixée au dispositif support 30, en
15 étant pincée entre l'élément tubulaire 31 et la couronne 32. Les cellules sur la membrane 34 se trouvent ainsi dans l'élément tubulaire 31, l'ouverture de plus petite largeur de l'élément tubulaire étant fermée par la membrane 34. La culture de cellules peut être réalisée à la suite de la fixation de la membrane 34 à l'extrémité de l'élément tubulaire 31.

20 Si dans l'exemple des figures 1 et 2, le dispositif support présente une section de forme circulaire, toute autre forme de section peut être envisagée, comme une forme carrée, polygonale, rectangulaire, etc.

 La membrane 34 peut présenter une épaisseur comprise entre 50 et 100 μm , et être réalisée en un matériau naturel ou synthétique. Ainsi la
25 membrane peut être réalisée à partir d'une membrane amniotique, d'une membrane de Bruch, d'une membrane basale, ou d'une matrice de fibres protéiques telles que des fibres de collagène et/ou de fibrine. Elle peut également être réalisée en un matériau synthétique biocompatible tel qu'un polymère biodégradable. Il importe que les cellules de la culture adhèrent à
30 la membrane choisie.

 Selon un exemple de réalisation, les cellules de la culture sont des cellules d'épithélium pigmentaire rétinien obtenues à partir de cellules souches pluripotentes humaines disposées sur une membrane amniotique dénudée, puis cultivées durant quatre semaines.

Les figures 3 à 5 représentent un dispositif de manipulation 10 d'une culture de cellules, selon un mode de réalisation. Le dispositif de manipulation 10 comprend un logement 16 prévu pour recevoir le dispositif support 30 et la membrane 34, et des moyens de fermeture 15 et de fixation 13 d'un couvercle permettant de refermer le logement 16, notamment lorsque ce dernier contient le dispositif support 30. Le dispositif de manipulation 10 comporte également un orifice de remplissage 18 réalisé dans le fond du logement 16. Le fond du logement 16 présente également un rebord annulaire 17.

10 Dans l'exemple des figures 3 à 5, le dispositif de manipulation 10 comprend un plateau 11 solidaire du logement 16. Le logement 16 présente une forme cylindrique comportant un bord externe 12 de forme tubulaire, un bord supérieur 12a plan, de forme annulaire, parallèle au plateau 11, et une nervure annulaire 14 prolongeant axialement le bord supérieur plan 12a. Le logement 16 comporte également une gorge annulaire 15 à l'intérieur de la nervure 14, la gorge annulaire entourant le logement 16.

Dans l'exemple des figures 3 à 5, les moyens de fixation 13 comportent des ouvertures 13 ayant la forme d'arcs annulaires, réalisées dans le bord supérieur plan 12a, et comportant chacune deux parties de largeurs différentes.

Les figures 6 à 8 représentent un couvercle 20 de préparation d'un implant, adapté pour se fixer sur le dispositif de manipulation 10, selon un mode de réalisation. Le couvercle de préparation 20 comprend un plateau supérieur 22 de forme annulaire, prolongé à l'extérieur par une couronne extérieure 21, et à l'intérieur, par une extension tubulaire 26, s'étendant coaxialement du côté de la face inférieure du plateau supérieur 22. Le couvercle de préparation 20 comprend également des moyens de fixation 23 s'étendant du côté inférieur du couvercle et conformés pour coopérer avec les moyens de fixation 13 du dispositif de manipulation 10. L'extension tubulaire 26 comporte un fond 27 muni d'un orifice de remplissage 28, s'étendant parallèlement au plateau supérieur 22. Le couvercle de préparation 20 comprend également une nervure annulaire 29 s'étendant du côté inférieur du couvercle, et prévue pour coopérer avec la gorge annulaire 15 formée dans le dispositif de manipulation 10.

Dans l'exemple des figures 6 à 8, les moyens de fixation 23 présentent la forme de crochets prévus pour s'engager simultanément dans la partie la plus large des ouvertures 13. Les crochets 23 comportent une partie axiale prolongée par une partie radiale prévue pour se bloquer dans la partie la plus étroite des ouvertures 13 par un mouvement de rotation du couvercle de préparation 20 autour de son axe par rapport au dispositif de manipulation 10. La figure 5 montre les crochets 23 en traits pleins engagés dans la partie la plus large des ouvertures 13, et en traits interrompus en position de verrouillage, engagés dans la partie la plus étroite des ouvertures 13. Pour faciliter l'entraînement en rotation par la main du couvercle 20, la couronne extérieure 21 peut être munie de crans 25. Des ouvertures 24 peuvent être formées dans le plateau supérieur 22, à l'aplomb des parties radiales des crochets 23 pour des raisons de fabrication. L'orifice 28 peut être prolongé à l'intérieur de l'extension tubulaire 26 par une conduite 28a en forme d'entonnoir.

Les figures 9 et 10 représentent l'ensemble du dispositif de manipulation 10 associé au couvercle de préparation 20 et renfermant le dispositif support 30. Il apparaît sur ces figures que lorsque le couvercle 20 est verrouillé sur le dispositif de manipulation 10, l'ensemble du dispositif support 30 peut être enfermé dans le logement 16. L'étanchéité de la fermeture du logement 16 est assurée grâce à un joint torique 35 disposé dans la gorge annulaire 15, le joint 35 étant comprimé par la nervure annulaire 29 formée sous le couvercle 20.

La figure 10A montre en détail le fond du logement 16, avec l'extrémité inférieure 27 de l'extension tubulaire 26, l'extrémité inférieure du dispositif support 30 et la membrane 34 supportant la culture de cellules. Il apparaît sur la figure 10A que le rebord annulaire 17 formé au fond du logement 16 permet de maintenir le dispositif support 30, et donc la membrane 34, à distance du fond du logement 16, délimitant ainsi entre le fond du logement 16 et la membrane un espace vide 39 en forme de disque dans lequel débouche l'orifice de remplissage 18.

Par ailleurs, l'extension tubulaire 26 présente une longueur telle que lorsque le couvercle 20 est verrouillé sur le dispositif de manipulation 10, l'extrémité inférieure 27 de l'extension tubulaire 26 vient en contact avec la face supérieure de la membrane 34. L'extrémité inférieure 27 de l'extension

tubulaire 26 comporte un rebord annulaire 27a, ménageant entre l'extrémité inférieure 27 de l'extension tubulaire 26 et la membrane 34 un espace vide 38 en forme de disque dans lequel débouche l'orifice de remplissage 28.

Selon un mode de réalisation, les espaces vides 38, 39 qui présentent
5 une hauteur prédéfinie, sont remplis par une substance, telle qu'un hydrogel naturel ou synthétique biocompatible, présentant un état liquide à la température de l'intérieur du corps humain, soit 37°C, et qui se polymérise en gel à une température inférieure.

Selon un exemple de réalisation, l'un des espaces 38, 39, est rempli
10 de la substance sous forme liquide. Le dispositif de manipulation 10 est ensuite refroidi pour que le liquide se polymérise en gel. L'autre espace 38, 39 est rempli de la substance sous forme liquide et le dispositif de manipulation 10 est à nouveau refroidi. Lors du remplissage de l'espace inférieur 39, par exemple à l'aide d'une micropipette, par l'orifice 18, l'air
15 initialement présent dans cet espace s'évacue par des encoches 17a formées dans le rebord annulaire 17 (figure 3). Lors du remplissage de l'espace supérieur 38 par l'orifice 28, l'air présent dans cet espace s'évacue par l'espace entre le dispositif support 30 et l'extension tubulaire 26.

Ainsi, le dispositif de manipulation 10 combiné au couvercle de
20 préparation 20 permet de préparer un implant comprenant la membrane 34 supportant les cellules à transplanter et couverte de chaque côté d'une couche de gel. Cette opération ne nécessite pas de séparer la membrane 34 de son support 30. Les épaisseurs de gel de chaque côté de la membrane sont fixes et définies de manière à ce que l'implant puisse être enroulé sur
25 lui-même et ainsi passer par l'aiguille d'une seringue utilisée pour la transplantation, et présentant en sortie un diamètre de 1,8 à 2,2 mm. Les épaisseurs de gel de chaque côté de la membrane 34 sont également choisies pour que l'implant retrouve une forme sensiblement plane, naturellement sans manipulation, à la sortie de l'aiguille de la seringue. A
30 l'issue de la transplantation, la substance à l'état de gel avant et durant la transplantation, passe progressivement à l'état liquide et se mélange avec les fluides corporels.

Selon un mode de réalisation, l'espace inférieur 39 est rempli de la substance en premier, puis l'espace supérieur 38 est rempli avant que la
35 substance injectée dans l'espace inférieur 39 soit totalement polymérisée. La

quantité de la substance injectée par les deux orifices 18, 28 peut être ajustée de manière à éviter que la membrane 34 se bombe. La concentration de la substance injectée dans l'espace supérieur 38 peut être moindre que celle injectée dans l'espace inférieur 39, afin que l'implant soit moins rigide et
5 donc puisse se courber plus facilement vers le côté de la membrane 34 supportant la culture que vers l'autre côté.

Selon un exemple de réalisation, la substance utilisée pour remplir les espaces 38, 39, est la gélatine qui est à l'état de gel à une température inférieure à 7°C et à l'état liquide à 37°C. La hauteur des espaces 38, 39,
10 c'est-à-dire l'épaisseur de la couche de gel de chaque côté de la membrane 34 est comprise entre 0,05 et 0,2 mm, et de préférence comprise entre 0,13 et 0,17 mm. Le diamètre des orifices 18, 28 peut être de 1 mm (à + ou - 20% près). La gélatine injectée dans l'espace inférieur 39 est diluée à une concentration de 8% (+ ou -2%) dans du sérum physiologique, et est laissée
15 polymérisée pendant 3 minutes à une température de 4°C (+ ou -3°C), la polymérisation complète étant obtenue au bout de 5 minutes à ces températures. La gélatine injectée dans l'espace supérieur 38 est diluée à une concentration de 5% (+ ou -2%) dans du sérum physiologique. L'ensemble du dispositif de manipulation 10 et du couvercle 20, incluant la
20 culture est ensuite maintenu à une température inférieure à 7°C pendant plus de 5 minutes.

Les figures 11 et 12 représentent un couvercle de transport 40, adapté pour se fixer sur le dispositif de manipulation 10, selon un mode de réalisation. La figure 13 montre le couvercle de transport 40 fixé sur le
25 dispositif de manipulation 10. Une fois que la substance requise a été injectée dans les espaces 38, 39 et s'est polymérisée en gel par réfrigération, le couvercle de préparation 20 est retiré et remplacé par le couvercle de transport 40. Le couvercle de transport 40 associé au support 30 et au dispositif de manipulation 10 assure le maintien de l'implant durant le
30 transport afin de prévenir toute dissociation des couches de gélatine, notamment sous l'effet de vibrations.

Un liquide adapté peut être préalablement utilisé pour remplir le volume au-dessus de la couche de gel dans l'élément tubulaire 31 du support 30, notamment afin de maintenir la couche en gel en milieu humide.
35 Ce liquide peut être par exemple un liquide utilisé pour le transport de cornée

humaine tel que le STEM ALPHA. 1 commercialisé par la société STEM ALPHA. Ainsi le dispositif de manipulation 10 associé au couvercle de transport permet de transporter l'implant jusqu'au site où il doit être transplanté et de le conserver à froid (à une température inférieure à 10°C) jusqu'au moment de la transplantation.

Le couvercle de transport 40 présente une forme similaire à celle du couvercle de préparation 20, mais sans extension tubulaire 26. Ainsi, le couvercle 40 comprend un plateau supérieur 42 en forme de disque, prolongé à l'extérieur par une couronne extérieure 41. Le couvercle de transport 40 comprend également des moyens de fixation 43 s'étendant du côté inférieur du couvercle et conformés pour coopérer avec les moyens de fixation 13 du dispositif de manipulation 10. Le couvercle de transport 40 comprend également une nervure annulaire 47 s'étendant du côté inférieur du couvercle, et prévue pour coopérer avec le joint torique 35 disposé dans la gorge annulaire 15 formée dans le dispositif de manipulation 10, pour assurer l'étanchéité de la fermeture du logement 16. Ainsi, le logement 16 est fermé de manière étanche, l'orifice de remplissage 18 étant obturé par le gel.

Dans l'exemple des figures 11 à 13, les moyens de fixation 43 présentent la forme de crochets prévus pour s'engager simultanément dans la partie la plus large des ouvertures 13. Les crochets 43 comportent une partie axiale prolongée par une partie radiale prévue pour se bloquer dans la partie la plus étroite des ouvertures 13 par un mouvement de rotation du couvercle de transport 40 autour de son axe par rapport au dispositif de manipulation 10. Pour faciliter l'entraînement en rotation par la main du couvercle 40, la couronne extérieure 41 peut être munie de crans 45. Des ouvertures 44 peuvent être formées dans le plateau supérieur 42, à l'aplomb des parties radiales des crochets 43 pour des raisons de fabrication. Le plateau 42 peut comprendre une gorge annulaire 48 formant côté intérieur du couvercle un rebord annulaire assurant le maintien de la partie supérieure du support 30.

La figure 14 représente un couvercle 50 d'extraction de l'implant, selon un mode de réalisation. Les figures 15 et 16 représentent le dispositif de manipulation 10 muni du couvercle d'extraction 50, et d'un dispositif de découpe 60, selon un mode de réalisation. Une fois arrivé au site de

transplantation, le couvercle de transport 40 est retiré et remplacé par le couvercle d'extraction 50. Le dispositif de découpe 60 est inséré dans le couvercle d'extraction 50 pour prélever l'implant en découpant un morceau de la membrane supportant la culture de cellules à implanter et recouverte
5 des deux côtés de la couche de gel.

Le couvercle d'extraction 50 présente une forme similaire à celle du couvercle de préparation 20, dans lequel l'extension tubulaire inférieure 26 est remplacée par une extension tubulaire supérieure 56 formant un conduit tubulaire traversant le couvercle 50, permettant le passage du dispositif de
10 découpe 60. Ainsi, le couvercle d'extraction 50 comprend un plateau supérieur 52 de forme annulaire, prolongé à l'extérieur par une couronne extérieure 51. Le couvercle d'extraction 50 comprend également des moyens de fixation 53 s'étendant du côté inférieur du couvercle et conformés pour coopérer avec les moyens de fixation 13 du dispositif de manipulation 10. Le
15 couvercle d'extraction 50 comprend également une nervure annulaire 57 s'étendant du côté inférieur du couvercle, et prévue pour coopérer avec le joint torique 35 disposé dans la gorge annulaire 15 formée dans le dispositif de manipulation 10, pour assurer l'étanchéité de la fermeture du logement 16. La nervure annulaire 57 délimite un logement 58 pour recevoir la partie
20 supérieure du dispositif support 30.

Dans l'exemple des figures 14 à 16, les moyens de fixation 53 présentent la forme de crochets prévus pour s'engager simultanément dans la partie la plus large des ouvertures 13. Les crochets 53 comportent une partie axiale prolongée par une partie radiale prévue pour se bloquer dans la
25 partie la plus étroite des ouvertures 13 par un mouvement de rotation du couvercle d'extraction 50 autour de son axe par rapport au dispositif de manipulation 10. Pour faciliter l'entraînement en rotation par la main du couvercle 50, la couronne extérieure 51 peut être munie de crans 55. Des ouvertures 54 peuvent être formées dans le plateau supérieur 52, à l'aplomb
30 des parties radiales des crochets 53 pour des raisons de fabrication.

L'extension tubulaire supérieure 56 est prévue pour recevoir le dispositif de découpe 60. Le dispositif de découpe 60 comprend un plateau supérieur 61 en forme de disque dont la face inférieure est prolongée axialement par une extension tubulaire 62 munie d'un conduit central axial

traversant 63 comportant un épaulement 64 contre lequel vient en appui un outil de découpe 65 engagé par l'ouverture inférieure du conduit axial 63.

Dans l'exemple de la figure 15, l'extension tubulaire supérieure 56 comprend une nervure axiale 69 prévue pour coopérer avec une rainure formée dans la paroi interne du conduit axial 63, de manière à forcer l'orientation angulaire du dispositif de découpe 60 par rapport au couvercle 50 suivant un angle précis. L'extension tubulaire 62 peut comprendre un ergot 67 formé au voisinage de l'extrémité libre d'une languette axiale 66. L'ergot 67 est prévu pour qu'en fin de course du dispositif de découpe 60 dans le couvercle 50, l'ergot 67 s'efface en exerçant un frottement sur l'extension tubulaire supérieure 56. Ainsi l'opérateur est obligé d'appuyer sur le plateau 61 jusqu'à ce qu'il soit en butée contre le bord supérieur de l'extension tubulaire supérieure 56, ce qui permet d'assurer que l'outil de découpe 65 a bien traversé la membrane 34 et ses deux couches de gel. En effet, comme cela apparaît sur la figure 16, l'outil de découpe 65 arrive au contact du fond du logement 16 lorsque le plateau 61 arrive en butée contre le bord supérieur de l'extension tubulaire supérieure 56.

La figure 17 représente plus en détail l'extrémité inférieure du dispositif de découpe 60, et en particulier la nervure radiale 69 qui coopère avec la rainure radiale 59 du couvercle 50 et la forme de l'outil de découpe 65. L'outil de découpe 65 présente la forme d'un emporte-pièce de forme tubulaire, avec un bord inférieur tranchant pour découper un morceau de la membrane 35 supportant la culture de cellules à implanter recouverte des deux côtés d'une couche de gel. L'outil de découpe 65 permet de découper un morceau de membrane ayant une forme non symétrique, de manière à pouvoir déterminer sur quelle face de l'implant se trouve la culture de cellule. Cette disposition permet de disposer l'implant correctement dans le corps du patient, en particulier s'il doit être placé sur une surface. Le couvercle d'extraction 50 assure ainsi des fonctions de guidage et d'orientation de l'outil de découpe 65.

Dans l'exemple de la figure 17, l'outil de découpe 65 permet de découper un morceau d'implant sensiblement en forme de rectangle dont un coin a été retiré pour lui donner une forme non symétrique. L'orientation de l'outil de découpe 65 obtenu grâce à la nervure radiale 69 qui coopère avec

la rainure radiale 59 du couvercle 50, peut être définie de manière à ce que la lame de l'outil de découpe soit à distance de l'orifice de remplissage 18.

La figure 18 représente l'implant 70 extrait de la membrane, obtenu après l'opération de découpe à l'aide du dispositif de découpe 60. L'implant
5 70 comprend les deux couches de gel 71, 72 couvrant d'un côté la membrane 34 et de l'autre la culture de cellules 73 formée sur la membrane 34.

Lorsqu'on retire l'outil de découpe 60 du couvercle d'extraction 50, il peut arriver que l'implant 70 ainsi découpé reste dans l'outil de découpe 50.
10 Comme le dispositif de découpe 60 et l'outil de découpe 65 présentent une forme tubulaire, il est possible d'introduire une tige par l'ouverture supérieure du conduit axial 63 au travers du plateau 61, pour pousser l'implant 70 hors de l'outil de découpe 65, la tige présentant un diamètre inférieur à celui de l'épaule 64. Si l'implant 70 reste dans le logement 16, il peut être extrait
15 de ce dernier à l'aide d'une spatule.

Pour un implant de cellules d'épithélium pigmentaire de rétine humaine, l'outil de découpe 65 permet de découper un morceau de membrane 34 de 2 à 6 mm par 1,2 à 4 mm, par exemple de 5 par 3 mm ou de 2,5 par 1,5 mm, soit une surface comprise entre 10 et 20 mm², par
20 exemple 15 mm² (ces valeurs pouvant varier dans des proportions de 20%). Ces dimensions permettent d'extraire de la membrane 34 un implant comportant quelques centaines de milliers de cellules.

L'implant 70 ainsi obtenu présente une épaisseur et des dimensions parfaitement maîtrisées. Il peut être observé que durant toute la préparation
25 et le transport de l'implant 70, jusqu'à son extraction au moment de réaliser la transplantation, la membrane 34 reste fixée à son support 30. On évite ainsi tout risque de détérioration de la culture de cellules. Les périodes où le boîtier renfermant la membrane associée à son support est ouvert sont limitées aux étapes de changement de couvercle et à l'étape de découpe de
30 l'implant. Les risques de contamination de l'implant restent donc limités. En outre, le fait de maintenir la membrane 34 fixée à son support 30 jusqu'à la découpe de l'implant 70, et de prévoir une forme dissymétrique pour l'implant, permet de conserver la mémoire de la face de la membrane supportant la culture de cellules jusqu'à l'opération de transplantation. Par
35 ailleurs, les seuls outils qui peuvent être nécessaires en plus des éléments

précédemment décrits sont limités à une tige poussoir pour, le cas échéant, faire sortir l'implant de l'outil de découpe 65, la seringue de transplantation et une spatule pour attraper et disposer l'implant dans la seringue.

Il apparaîtra clairement à l'homme de l'art que la présente invention
5 est susceptible de diverses variantes de réalisation et diverses applications. En particulier, l'invention n'est pas limitée à un boîtier dans lequel les couches de gel sont définies entre un logement et un couvercle. En effet, il peut être prévu d'utiliser un boîtier muni d'une fente dans laquelle est insérée la membrane séparée de son support, la fente présentant une largeur
10 calibrée.

Il n'est pas non plus nécessaire de disposer d'un couvercle de transport. En effet, il peut être prévu de disposer le boîtier utilisé pour le moulage des couches de gel (dispositif de manipulation 10 + le couvercle de préparation 20) dans un sachet étanche, les couches de gel ne pouvant
15 s'écouler par les orifices 18, 28 tant que le boîtier est maintenu à une température suffisamment faible. Il peut également être envisagé de fermer de manière étanche les orifices 18, 28.

Il n'est pas non plus nécessaire de disposer d'un couvercle d'extraction. En effet, le morceau de membrane à implanter peut être
20 découpé et extrait directement du logement 16 à l'aide d'un emporte-pièce. Il peut également être découpé par exemple au moyen d'un scalpel ou de ciseaux.

Il n'est pas non plus nécessaire que l'implant présente une forme dissymétrique. D'autres moyens peuvent être aisément imaginés pour
25 repérer la face de la membrane supportant la culture de cellules. Ainsi, par exemple, la couche de gel formée sur l'une des deux faces de la membrane peut être colorée au moyen d'un colorant mélangé au liquide injecté par l'un des deux orifices 18, 28.

Il est également à noter que la préparation de l'implant à l'aide du
30 couvercle de préparation 20 et l'utilisation de l'implant après découpe de la membrane peuvent être effectuées dans des sites éloignés géographiquement. Par conséquent, l'étape d'extraction de l'implant par découpe de la membrane peut ne pas être effectuée.

Il peut être également prévu de remplir simultanément les espaces
35 supérieur 38 et inférieur 39 de chaque côté de la membrane 34, par exemple

en prévoyant des passages latéraux dans le rebord 27a (ou en supprimant ce rebord) et dans l'élément tubulaire 31 du support 30. Dans ce cas, un seul des deux orifices 18, 28 est nécessaire.

5 Par ailleurs, tout autre moyen de fixation des couvercles 20, 40, 50 sur le dispositif de préparation 10 que celui décrit peut être envisagé. Ainsi, les couvercles 20, 40, 50 peuvent également se visser sur le dispositif de préparation 10 ou être fixés à ce dernier par clipsage.

10 L'invention peut s'appliquer à d'autres implants que des implants de cellules d'épithélium pigmentaire rétinien. En effet, l'invention peut s'appliquer à la transplantation de cellules de la rétine de sous-types variés et utilisés seuls ou en association (par exemple pour la rétine: des photorécepteurs, des cellules ganglionnaires, des cellules bipolaires, des cellules amacrines, des cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien, des cellules endothéliales). Ces cellules peuvent être associées en monocouches
15 ou en couches pluristratifiées de façon à reconstruire une rétine artificielle. Il peut s'agir également notamment de cellules de la cornée ou de tout autre type de cellules épithéliales. Plus généralement, l'invention peut s'appliquer à tout type d'épithélium ou de culture de cellules en monocouche sur une membrane biologique ou synthétique.

20