

UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE : 2018

THÈSE 2018/TOU3/2019

THÈSE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement

par

Loïc Marc André FIEVET

Né le 12 mai 1990 à Bar-Le-Duc (55)

**ÉTAT DE L'ART SUR LE DÉVELOPPEMENT DES MÉDICAMENTS
DE THÉRAPIE INNOVANTE : ENJEUX ET PERSPECTIVES**

Le 29 juin 2018

Directrice de thèse : Hélène BROCHOT-DECHET

JURY

Président :	Monsieur le Professeur Daniel CUSSAC
1 ^{er} assesseur :	Madame le Docteur Hélène BROCHOT-DECHET
2 ^{ème} assesseur :	Madame le Docteur Anaïs GRAND
3 ^{ème} assesseur :	Monsieur le Docteur Pierre LAYROLLE
4 ^{ème} assesseur :	Madame le Docteur Anne FIALAIRE-LEGENDRE

**PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 08 janvier 2018**

Professeurs Emérites

M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. CHAVANT L.	Mycologie
M. MOULIS C.	Pharmacognosie
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SIE P.	Hématologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BARRE A.	Biologie
Mme BAZIARD G.	Chimie pharmaceutique
Mme BENDERBOUS S.	Mathématiques – Biostat.
Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
M. GAIRIN J-E.	Pharmacologie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
Mme MULLER-STAUMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. SALLES B.	Toxicologie
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires

M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
Mme DE MAS MANSAT V. (*)	Hématologie
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique
Mme SERONIE-VIVIEN S.	Biochimie
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie

Universitaires

Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme BON C.	Biophysique
M. BOUJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme BOUTET E. (*)	Toxicologie - Sémiologie
M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme CABOU C.	Physiologie
Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
Mme COLACIOS-VIATGE C.	Immunologie
Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
M. DELCOURT N.	Biochimie
Mme DERAEEVE C.	Chimie Thérapeutique
Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
Mme FALLONE F.	Toxicologie
Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
Mme LEFEVRE L.	Physiologie
Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
M. LEMARIE A.	Biochimie
M. MARTI G.	Pharmacognosie
Mme MIREY G. (*)	Toxicologie
Mme MONFERRAN S.	Biochimie
M. Olichon A.	Biochimie
Mme REYBIER-VUATTOUX K. (*)	Chimie Analytique
M. Sainte-Marie Y.	Physiologie
M. Stigliani J-L.	Chimie Pharmaceutique
M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
Mme TOURRETTE-DIALO A.	Pharmacie Galénique
Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires

Mme COOL C.	Physiologie
M. MOUMENI A.	Biochimie
M. METSU D.	Pharmacologie
Mme PALUDETTO M.N.	Chimie thérapeutique
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique
M. PERES M.	Immunologie
Mme SALABERT A.S	Biophysique



SERMENT DES APOTHICAIRES

« JE JURE EN PRÉSENCE DES MAÎTRES DE LA FACULTÉ,
DES CONSEILLERS DE L'ORDRE DES PHARMACIENS ET DE MES CONDISCIPLES :

D'HONORER CEUX QUI M'ONT INSTRUIT DANS LES PRÉCEPTES DE MON ART
ET DE LEUR TÉMOIGNER MA RECONNAISSANCE
EN RESTANT FIDÈLE À LEUR ENSEIGNEMENT.

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 L'HONNEUR,
DE LA PROBITÉ ET DU DÉsINTÉRESSEMENT.

DE NE JAMAIS OUBLIER MA RESPONSABILITÉ
ET MES DEVOIRS ENVERS LE MALADE ET SA DIGNITÉ HUMAINE ;
EN AUCUN CAS, JE NE CONSENTIRAI À UTILISER MES CONNAISSANCES
ET MON ÉTAT POUR CORROMPRE LES MŒURS
ET FAVORISER DES ACTES CRIMINELS.

QUE LES HOMMES M'ACCORDENT LEUR ESTIME
SI JE SUIS FIDÈLE À MES PROMESSES.

QUE JE SOIS COUVERT D'OPPROBRE
ET MÉPRISÉ DE MES CONFRÈRES SI J'Y MANQUE ».



REMERCIEMENTS

À MONSIEUR LE PROFESSEUR DANIEL CUSSAC,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse et d'avoir accepté de juger ce travail (malgré le congrès de Physiologie). Je vous adresse mes remerciements respectueux et ma profonde reconnaissance.

À MADAME LE DOCTEUR ANNE FIALAIRE-LEGENDRE,

Je vous suis très reconnaissant de me faire l'honneur de composer ce jury et d'avoir accepté de juger ce travail qui fait parti de votre quotidien. Je vous remercie pour votre gentillesse et votre disponibilité, et espère un jour suivre vos pas à l'EFS. Vous trouverez ici l'expression de mon plus grand respect.

À MADAME LE DOCTEUR ANAÏS GRAND,

Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury de thèse. Ce fut un plaisir de travailler avec vous (à mi-temps mais quand même) sur la mise en place du circuit des MTI à l'Hôpital. Il m'a permis d'ouvrir ma vision à d'autres horizons et d'ancrer ce travail dans des problématiques concrètes. Je vous exprime ici ma profonde gratitude.

À MONSIEUR LE DOCTEUR PIERRE LAYROLLE,

Pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail, et pour le soutien que vous m'apportez dans le déroulement de ma thèse universitaire depuis Nantes. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance ainsi que de mon profond respect.

À MADAME LE DOCTEUR HÉLÈNE DECHET-BROCHOT,

Je vous remercie d'avoir encadré ce travail et de la confiance que vous m'avez accordée. Je tiens à vous remercier chaleureusement de m'avoir apporté de nombreuses connaissances dans le domaine de la production et de la qualité. Je tiens également à vous remercier pour votre soutien indéfectible et vos encouragements constants qui m'ont permis d'aboutir à ce mémoire, témoin de ma sincère reconnaissance et de mon amitié.

À TOUTES LES PERSONNES QUI ONT PARTICIPÉ DE PRÈS OU DE LOIN À CES TRAVAUX

AUX PERSONNELS ET ÉTUDIANTS DE STROMALAB, BIOTIS, DE L'EFS ET DE L'IUC,
POUR VOTRE TRAVAIL, VOTRE DISPONIBILITÉ ET VOTRE SYMPATHIE.

À MES PARENTS,

À MON GRAND PÈRE ANDRÉ,

À MES DEUX FRÈRES, YOANN ET KEVIN,

À TOUT LE RESTE DE LA FAMILLE ET DE MA CHÈRE BELLE FAMILLE,

À MES AMIS DU LYCÉE, DE LA FACULTÉ DE NANCY, ET DE L'INTERNAT DE TOULOUSE,

ET SURTOUT

À MA BIEN AIMÉE EMILIE ET SON SOUTIEN INDÉFACTIBLE,

JE TIENS À TOUS VOUS REMERCIER POUR VOTRE SOUTIEN ET VOS ENCOURAGEMENTS.

SANS VOUS, RIEN N'AURAIT ÉTÉ POSSIBLE !

TABLE DES MATIÈRES

Table des matières	1
Liste des abréviations	4
Liste des figures	8
Liste des tableaux	10
Introduction	11
Chapitre I : Situation mondiale des MTI en 2018	13
1. Cadre réglementaire et classification des MTI	13
1.1.Contexte réglementaire	13
1.2.Classification des MTI	15
2. Processus de développement d'un MTI	16
2.1.Les dispositifs de soutien à la recherche académique	17
2.2.Les études pré-cliniques	19
2.3.Centres producteurs et système qualité pharmaceutique	21
2.3.1.Centres producteurs en France	21
2.3.2.Système qualité pharmaceutique.....	22
2.4.Recherche clinique et MTI.....	24
2.4.1.Contexte réglementaire des essais cliniques (EC)	24
2.4.2. Essais cliniques des MTI	28
2.5.L'autorisation de mise sur le marché des MTI	31
2.5.1.Sur le marché européen.....	32
2.5.2. Sur le marché américain.....	36
Chapitre II : Contributions technologiques à l'avènement des MTI	39
1. Thérapie cellulaire	39
1.1.Utilisation de cellules souches	40
1.1.1.La cellule souche totipotente.....	42
1.1.2.Les cellules souches pluripotentes	42
1.1.3.Les cellules souches adultes multipotentes.....	45
1.1.4.Les cellules souches adultes unipotentes.....	53
1.1.5.Résumé sur l'utilisation des cellules souches	53
1.2.Immunothérapie cellulaire	54
1.2.1.Les lymphocytes T.....	54
1.2.2.Les cellules dendritiques.....	57

2. Ingénierie cellulaire et tissulaire	58
2.1. Ingénierie cellulaire	59
2.2. Ingénierie tissulaire et médicaments combinés.....	59
2.2.1. Cultures 2D versus 3D.....	59
2.2.2. Méthodes de culture 3D.....	61
3. Thérapie génique.....	65
3.1. Le type de gène transféré	66
3.2. Les méthodes de transfert.....	66
3.3. Le type de vecteur utilisé.....	67
3.3.1. Les vecteurs viraux.....	67
3.3.2. Les vecteurs plasmidiques.....	70
3.3.3. Les vecteurs synthétiques.....	72
3.4. Le choix des cellules cibles	75
3.5. Cas des cellules CAR-T	76
3.6. Edition du génome	79
3.6.1. CRISPR/Cas9.....	80
3.6.2. TALENs	81
3.6.3. Zinc Finger Nucléases.....	83
4. Résumé des technologies utilisées.....	84
Chapitre III : Les défis du développement des MTI en pratique	85
1. L'approvisionnement des matières premières	85
1.1. Gérer la grande variabilité des matières de départ	85
1.2. Le contrôle des matières premières : un enjeu sécuritaire.....	87
1.3. La stabilité des matières de départ influence le modèle de production.....	90
2. Les défis de la mise en place d'une plateforme de production.....	93
2.1. La conception et qualification des locaux de production	93
2.1.1. La conception des locaux de production.....	93
2.1.2. La qualification des locaux de production	95
2.2. Validation d'un procédé de production	96
2.3. La gestion du personnel	98
2.4. Les défis des contrôles qualité d'un MTI.....	100
2.4.1. Les tests de sécurité microbiologique	100
2.4.2. Les tests de caractérisation biologique et pureté	101
2.4.3. Les tests de fonctionnalité.....	104

2.4.4. Internaliser ou externaliser les CQ ?	107
2.5. Les critères de certification/libération du produit fini	109
3. Les enjeux technologiques post-production	109
3.1. Le conditionnement final et la cryoconservation	109
3.2. La traçabilité et l'intégrité des données	113
4. L'adaptation nécessaire du circuit hospitalier	115
4.1. Le défi du stockage des MTI dans les pharmacies à usage intérieur	115
4.2. Reconstitution et gestion des déchets MTI	116
4.3. Sécurité et prise en charge des effets indésirables	119
5. Les défis de la commercialisation des MTI	121
5.1. Investissements dans le champ des MTI	121
5.2. Remboursement des MTI	122
Discussion	125
Bibliographie	129
Annexes	142

LISTE DES ABRÉVIATIONS

2D : Deux dimensions

3D : Trois dimensions

AAV : Virus Adéno-Associés

ABM : Agence de BioMédecine

ABR : Résistance aux Antibiotiques

Ac : Anticorps

ACT : Immunothérapie Adoptive

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADSC : Cellules stromales du tissu adipeux

Ag : Antigène

ALCOLA : « Attributable, Legible, Contemporaneous, Original, and Accurate »

ALS : Sclérose Latérale Amyotrophique

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ANR : Agence Nationale de la Recherche

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament et des produits de Santé

ARN : Acide ribonucléique

ARS : Agence Régionale de Santé

ASMR : Amélioration du Service Médical Rendu

ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation

AV : Adénovirus

BDNF : Facteur neurotrophique issu du cerveau

BLA : « Biologics License Application »

BPC : Bonnes Pratiques Cliniques

BPF : Bonnes Pratiques de Fabrication

BPL : Bonnes pratiques de Laboratoires

BSL : « Biological Safety Levels »

CAIX : Anhydrase Carbonique 9

CAR : Récepteur antigénique chimérique

CAT : Committee for Advanced Therapies

CD : Cluster de différenciation

CEPS : Comité Économique des Produits de Santé

CFU-F : « Colony Forming Unit Fibroblasts »

CHMP : Comité des médicaments à usage humain

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CNIL : Commission nationale de l'informatique et des libertés

COMEDIMS : COMités des MÉdicaments et des DISpositifs Médicaux Stériles

CPA : Cellule Présentatrice d'antigènes

CPP : Comité de Protection des Personnes

CQ : Contrôle qualité

CRISPR / Cas9 : « Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/RNA-guided nuclease CAS9 »

CRS : Syndrome de Relargage Cytokinique

CS : Cellule souche

CSA : Cellules Souches Adultes

CSE : Cellules Souches Embryonnaires

CSH : Cellules Souches Hématopoïétiques

CSM : Cellules Souches Mésenchymateuses

CSM-MO : Cellules Stromales Mésenchymateuses de la Moelle Osseuse.

CTA : Centrale de Traitement d'Air

CTL : Lymphocytes T Cytotoxiques

CTNF : Facteur neurotrophique ciliaire

CXCL : Protéine chimiokine de type CXC

DASRI : Déchet d'Activité de Soins à Risques Infectieux

DC : Cellules dendritiques

DLI : Injection de lymphocytes du donneur

DMLA : Dégénérescence Maculaire ILée à l'Âge

DMSO : DiMethylSulfOxide

DU : Diplôme Universitaire

EBMT : « European society for Blood and Marrow Transplantation »

EC : Essai Clinique

EFS : Etablissement Français du Sang

EGF : Facteur de croissance épidermique

EMA : « European Medicines Agency » ou Agence Européenne du médicament

EP : Etablissement Pharmaceutique

FACS : Cytométrie de flux

FDA : « Food and Drug Administration »

FDCA : « Food and Drug Act »

FGF : Facteur de croissance fibroblastique

G-CSF : Facteur de croissance granulocytaire

GM-CSF : Facteur neurotrophe dérivé de la glie

GM-CSF : Facteur de croissance granulocytaire-macrophagique

GMP : « Good Manufacturing Practices »

GOI : Gènes d'Intérêts

GTMP : médicament de thérapie génique

GvHD : Maladie du greffon contre l'Hôte

GvL : Réaction du greffon contre la leucémie

FBS : Sérum de Veau Foetal

FR : France

HCB : Haut Conseil des Biotechnologies

HEPA : à Haute Efficacité sur les Particules Aériennes

HGF : Facteur de croissance hepatocytaire

HLA : « Human Leukocyte Antigen »

HPL : Lysat Plaquettaire Humain

HSV : Herpes Simplex Virus

IDO : « Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase »

IL : Interleukine

IMPD : « Investigational Medicinal Product Dossier »

IND : « Investigational New Drug »

iPSC : « induced Pluripotent Stem Cell » ou cellule souche pluripotente induite

J : Jour

KFDA : « Korea Food and Drug Administration »

LAL : Leucémie Aiguë Lymphoblastique

LT : Lymphocyte T

LB : Lymphocyte B

LV : Lentivirus

MEC : Matrice Extra-Cellulaire

MFT : « Media Fill Test »

MoA : Mode d'action

MPT : « Media Process Test »

MRD : Maladie minimale résiduelle

MTI / ATMP : Médicaments de Thérapie Innovante / « Advanced Therapies Medicinal Product »

MTI-Exp : Médicament de thérapie innovante expérimentaux

MTI-PP : Médicament de thérapie innovante préparé ponctuellement

MVA : « Modified Vaccinia Ankara »

NGF : Facteur de croissance neural

NGS : Séquençage haut débit de nouvelle génération

NT-3 : Neutrophine 3

NK : « Natural Killer »

NO : Oxyde nitrique

OGM : Organisme Génétiquement Modifié

pb : Paire de bases

PBS : Tampon Phosphate Salin

PGE2 : Prostaglandine E2

Ph.E. : Pharmacopée Européenne

PHRC : Programme Hospitalier de Recherche Clinique

PHRIP : Programme Hospitalier de Recherche Infirmière et Paramédicale

PMDA : « Pharmaceuticals and Medical Devices Agency »

PME : Petite et Moyenne Entreprises

PIP : Plan d'Investigation Pédiatrique

PREPS : Programme de recherche sur la performance du système des soins

PRIME : « PRiority MEdecine » ou médicament prioritaire

PRME : Programme de recherche médico-économique

PRT : Programme de recherche translationnelle

PSM : Poste de Sécurité Microbiologique

PTC : Préparation de thérapie cellulaire

PtS : PhosphatidylSérine

PUI : Pharmacie à Usage Intérieur

QALY : Année de Vie Pondérée par la Qualité

QC : Qualification de la Conception

QI : Qualification de l'Installation

QO : Qualification Opérationnelle

QP : Qualification des Performances

qPCR : « quantitative Polymerase Chain Reaction »

RBA : « Risked-Based Approach » ou Approche basée sur le Risque

RIPH : Recherches Impliquant la Personne Humaine

RPE : « Retinal pigment epithelium »

RTV : Rétrovirus

SBTS : « Sleeping Beauty System »

SCF : Facteur de croissance des cellules souches

scFv : Fragment variable à chaîne unique

SCID-ADA : déficit immunitaire combiné sévère en adénosine désaminase

sCTMP : Médicaments de Thérapie Cellulaire somatique

SEP : Sclérose en plaques

SMR : Service médical Rendu

TALEN : Nucléases Effectrices de type Activateur de Transcription

TCR : Récepteur des lymphocytes T

TEP : Médicaments issus de l'ingénierie tissulaire et cellulaire

TGFb : Facteur de croissance transformant bêta

TIL : Lymphocytes infiltrants la tumeur

TNFa : Facteur de nécrose tumorale alpha

Treg : Lymphocytes T régulateurs

TRL : « Technology Readiness Level »

UCART : «Universal Chimeric Antigen Receptor T-cells»

UE : Union Européenne

USA : Etats-Unis d'Amérique

UFC : Unité Formant Colonie

UTC : Unité de Thérapie Cellulaire

UTG : Unité de Thérapie Génique

VEGF : Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VMP : Validation Master Plan

ZFN : Nucléases à Doigt de Zinc

X-ALD : adrénoleucodystrophie liée au chromosome X

\$US : Dollar américain

ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Vue générale du développement des médicaments de thérapie innovante.....	17
Figure 2 : Investissement mondial dans le domaine des MTI au premier trimestre 2018 2.	17
Figure 3 : Les différents niveaux de maturité technologique des projets de recherche 3.	19
Figure 4 : Industries de production des MTI au premier trimestre 2018 2.	21
Figure 5 : L'approche basée sur le risque (RBA).....	23
Figure 6 : Démarche nationale de demande d'autorisation des essais cliniques MTI en France avant 2019.	26
Figure 7 : Démarche centralisée de demande d'autorisation des essais cliniques MTI en Europe après 2019.	28
Figure 8 : Comparaison des phases cliniques de développement d'un médicament classique (A) par rapport aux MTI (B).	29
Figure 9 : Essais cliniques en cours au premier trimestre 2018 selon la classification américaine. 2.	30
Figure 10 : Classification des essais cliniques de MTI entre 1999 et 2015 12.....	30
Figure 11 : Indications des MTI dans les essais cliniques en 2015 12 en 2018 2 et des demandes de classification au CAT de l'EMA entre 2009-2018.	31
Figure 12 : Les différents modules composant le dossier d'AMM.	33
Figure 13: Schéma des différentes programmes et dénominations pour la commercialisation de MTI en Europe selon le degré de données cliniques disponibles 15.....	33
Figure 14 : Probabilité de rejet immunologique selon le type de cellule utilisée en thérapie cellulaire 18.	40
Figure 15 : Schéma cellules souches humaines 19.	41
Figure 16 : Schéma de la division cellulaire.	41
Figure 17 : Les étapes de l'embryogenèse 21.	42
Figure 18 : Génération d'iPSC 35.....	44
Figure 19 : Le microenvironnement (niche) détermine le devenir des CSH.	46
Figure 20 : L'hématopoïèse - Hiérarchie des cellules sanguines normale et pathologique (leucémie myéloïde chronique)	47
Figure 21 : Historique de dénomination des CSM.	49
Figure 22 : Schéma des voies de différenciations des cellules stromales/souches mésenchymateuses 67.	50
Figure 23 : Fonctions anti-inflammatoires et pro-régénératives des CSM selon leur viabilité 86.	52
Figure 24 : Procédé de génération de TIL « tumour-infiltrating lymphocytes » 90.	55
Figure 25 : Les stratégies d'immunothérapies adoptives antivirales à base de lymphocytes T 101.	56
Figure 26 : Traitement des patients atteints de cancer avec des cellules dendritiques activées par l'ARN tumoral 107.	58
Figure 27 : Propriétés cellulaires des cellules cultivées en 2D en comparaison à l'inclusion dans un gel en 3D 112.	60
Figure 28 : Généralités d'expression des gènes dans une cellule eucaryote.	65
Figure 29 : Méthodes de transfert de gènes.....	66
Figure 30 : Efficacité et sûreté des méthodes de transfert de gènes 127.	68
Figure 31: Fabrication d'ADN Minicercle à partir d'un plasmide parent contenant seulement les gènes d'intérêts (GOI).	71
Figure 32 : Génération de minivecteur à ADN 137.....	72

Figure 33 : Principales fonctions des vecteurs synthétiques 138.....	73
Figure 34 : Transposition de Sleeping Beauty 163.	74
Figure 35 : Les différentes générations de CAR-T 143.....	76
Figure 36 : Le processus de génération des cellules CAR-T 143.	77
Figure 37 : Essor clinique des technologies à base de cellules CAR-T dans le monde 143.	79
Figure 38 : Schéma d'action de la technologie d'édition du génome Crispr/cas9 162.....	80
Figure 39 : La technologie TALEN 164.....	81
Figure 40 : Schéma du circuit d'un MTI 168.....	85
Figure 41 : Schéma de la gestion des stocks cellulaires allogéniques dans un établissement pharmaceutique.....	86
Figure 42 : Exemple d'une fiche de spécifications et d'acceptabilité d'un sérum de veau foetal (FBS) en condition BPF 172.	90
Figure 43 : Diagramme décisionnel du modèle de développement des MTI selon la complexité du circuit 168.	92
Figure 44 : Illustration des différentes zones et matériaux composant une zone de production de MTI de qualité BPF	95
Figure 45 : Schéma du procédé classique de fabrication d'un MTI.....	97
Figure 46 : Illustration des automates de détection microbienne BD Bactec™ (gauche) et BacT/ALERT™ (droite).	101
Figure 47 : Évaluation des risques des produits à base de cellules souches 173.	102
Figure 48 : Attributs des tests de fonctionnalité 175.....	105
Figure 49 : Détermination des tests de fonctionnalité (« Potency ») lors du développement clinique d'un MTI 175.	108
Figure 50 : Technologie Crystal AT-Closed-Vial® par Aseptic Technologies.	110
Figure 51 : Poche de cryoconservation de sang de cordon de Macopharma.	111
Figure 52 : Seringues pré-remplies de MBCP™ Technology - In'Oss™	113
Figure 53 : Extrait des points clés de la directive 21 CFR PART 11 des BPF 187.	114
Figure 54 : Explication du concept de l'ALCOA de contrôle de la qualité 187.....	114
Figure 55 : Illustration de dispositifs de décongélation automatisée ThawSTAR™, CellSeal Automated Thawing System™ et VIA THAW CB1000™	117
Figure 56 : Système BD Phaseal™ de transfert en milieu fermé adaptable à la reconstitution hors BPF de médicaments de thérapie génique à la PUI.	118
Figure 57 : Exemple de mise en place et interactions du circuit hospitalier des cellules CAR-T.	121

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification du CAT	15
Tableau 2 : Définitions réglementaires des MTI selon la directive N°1394/2007.	16
Tableau 3 : La réglementation des centres producteurs selon la classification du CAT.....	22
Tableau 4 : Liste des médicaments développés à l'aide du schéma PRIME en mai 2018 15.	34
Tableau 5 : Désignation des MTI commercialisés sur le marché Européen.....	35
Tableau 6 : Accès rapides au marché Européen 15.....	36
Tableau 7 : Résumé des programmes de développement des thérapies innovantes américaines	38
Tableau 8 : Différences clés entre les systèmes de culture 2D versus 3D 115.	61
Tableau 9 : Pertinence scientifique et clinique de l'utilisation de biomatériaux	63
pour l'ingénierie tissulaire.....	63
Tableau 10 : Pertinence scientifique et clinique des technologies sans biomatériaux	65
pour l'ingénierie tissulaire.....	65
Tableau 11 : Liste non-exhaustive de vecteurs viraux utilisés comme MTI 130	70
Tableau 12 : Comparaison des systèmes de transferts viraux versus transposons 141.....	75
Tableau 13 : Résumé des technologies d'édition du génome	83
Tableau 14 : Recommandations BPF des limites des contaminations particulaire et microbiologique selon les différentes classes et l'activité (UFC : Unité Formant Colonie)7.	94
Tableau 15 : Liste de tests de fonctionnalité histologiques proposés par Apligraf® (Organogenesis Incorporated) 174.	106

INTRODUCTION

Le secteur des médicaments de thérapie innovante (MTI) est en plein essor ces dernières années. Les MTI sont distincts des traditionnels médicaments de biothérapie et des molécules chimiques, puisqu'ils contiennent des cellules actives ou une construction génétique, qui engendrent des effets métaboliques, immunologiques, génétiques ou d'autres mécanismes d'action pharmacologique. Une nouvelle législation européenne encadre un large panel de technologies et d'indications ; telles que les étonnantes découvertes en médecine régénérative à partir de cellules souches, les technologies novatrices d'ingénierie tissulaire, mais également les avancées phénoménales en thérapie génique dans la lutte contre les cancers et les maladies orphelines. Autant de technologies maintenant regroupées sous cette dénomination de médicament. Dès lors qu'il s'agit de médicament, la profession pharmaceutique joue un rôle majeur dans son développement. Ces évolutions technologiques récentes, couplées aux manques de connaissances de la profession sur ces thématiques, ont été le moteur d'élaboration de cette revue de la littérature sur le développement des MTI : enjeux et perspectives.

Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à la situation des MTI dans le monde en 2018, afin d'en ressortir les diverses problématiques. En réalisant une analyse approfondie des nouvelles législations encadrant ces thérapies disruptives, nous avons mis en lumière la méthode de classification des différents produits de thérapie cellulaire et génique par l'agence européenne du médicament (EMA). Puis, dans le but de comprendre la complexité du développement, nous avons détaillé l'ensemble des étapes : du financement de la recherche jusqu'à l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché (AMM) en Europe et aux Etats-Unis. Enfin, nous avons complété cette première partie par un exposé minutieux des différentes spécialités actuellement sur le marché mondial, un résumé des essais cliniques en cours et des MTI en devenir, afin de donner des pistes aux actuels et futurs acteurs de ce circuit.

La promesse d'une remarquable performance a fortement attiré l'attention sur ces nouvelles thérapies, mais qu'en est-il de leur réelle efficacité clinique ? Dans la seconde partie, nous nous sommes donc consacrés à la description littéraire des tenants et aboutissants des différentes techniques utilisées pour générer ces MTI. C'est seulement en reprenant les bases fondamentales et expérimentales de chaque technologie que nous pouvions mieux appréhender les résultats des essais cliniques. L'objectif de cette étude rétrospective est donc de définir spécifiquement l'état de développement (pré-clinique, essai clinique, commercialisation) des thérapies cellulaires (cellules souches, immunothérapies), d'ingénierie tissulaire (mode de cultures en trois dimensions, biomatériaux), et géniques (vecteurs viraux et non-viraux, cellules génétiquement modifiées, édition du génome) afin de critiquer leurs applications en regard des premiers résultats cliniques publiés. Ce travail a pour objectif de ressortir les candidats aux plus grands potentiels et de déterminer les indications pertinentes selon la technologie utilisée.

Outre l'efficacité clinique de ces traitements, l'identification des différents obstacles à surmonter, au cours de chaque étape du développement pharmaceutique, nous semblait important d'être extrait de ces expériences.

« L'Homme sage apprend de ses erreurs, l'Homme plus sage apprend des erreurs des autres. »

Confucius

Cette citation du philosophe chinois fait sens dans l'évolution des procédés de fabrication de ces MTI, puisqu'un succès clinique n'est pas toujours un gage de réussite commerciale ; c'est pourquoi apprendre des erreurs d'autrui et des siennes est primordial. Soumis à des textes réglementaires que sont les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF), de nouvelles structures dédiées à la production de MTI ont vu le jour, telles que les établissements pharmaceutiques (EP) de l'Etablissement Français du Sang (EFS) et du Centre de Transfusion Sanguine des Armées, mais également des industriels comme CELLforCure ou YposKesi (AFM-Téléthon) pour les maladies rares. La composante labile de ces thérapies engendre de nombreux défis dans la mise en place de tels centres de production. Il s'agit de problématiques complexes comme le contrôle des matières premières, l'établissement de tests de fonctionnalité libérateurs, le conditionnement aseptique, la cryoconservation, ou encore la gestion des flux de transports. Le lot de médicament une fois certifié par le pharmacien responsable de la production BPF est envoyé dans les pharmacies à usage intérieur des hôpitaux pour leur reconstitution, libération et administration. Ce circuit des MTI à l'hôpital est en pleine création et la confrontation des centres hospitaliers aux défis d'accessibilité et de remboursement vise à confirmer l'intérêt de notre étude. Ces travaux nous ont donc amenés, dans une dernière partie, à la nécessité d'établir un lien entre les défis scientifiques et ceux de leur mise en pratique. Ainsi, nous posons les différentes problématiques rencontrées lors du circuit de production de ces MTI jusqu'à leur administration et tentons d'y apporter des solutions concrètes.

CHAPITRE I : SITUATION MONDIALE DES MTI EN 2018

1. Cadre réglementaire et classification des MTI

1.1. Contexte réglementaire

Depuis 2007 et la directive n°1394/2007, les médicaments de thérapie innovante (MTI) sont considérés comme une classe à part entière en Europe également appelés en anglais : « *Advanced Therapy Medicinal Products* » (ATMP). En effet, certains produits, considérés initialement par les textes français comme des « préparations de thérapie cellulaire » ou « préparations de thérapie génique » changent de statut pour devenir des « médicaments de thérapie innovante ». Ces changements de statut impactent à plusieurs niveaux la réglementation, que ce soit pour les produits eux-mêmes, ou pour les autorisations que doivent obtenir les établissements qui souhaitent les produire ; du fait notamment de l'évolution des standards et référentiels en termes de production qui passent des bonnes pratiques tissus / cellules aux **bonnes pratiques de fabrication** (BPF) applicables aux médicaments. De plus, leur distribution en France dans le cadre d'essais cliniques, compte tenu du monopole pharmaceutique (L4211-1 Partie IV livre 2 du code de la santé publique), est désormais exclusivement réalisée par les pharmacies à usage intérieur (PUI) des établissements de santé.

Les MTI étant couverts par le règlement européen n°1394/2007 ainsi que la directive 2001/83/CE (relative aux médicaments à usage humain), leur mise sur le marché est gérée au niveau européen. Selon l'agence nationale du médicament et des produits de santé (ANSM) et émanant des directives de l'« European Medicines Agency » (EMA), un médicament est considéré comme une thérapie innovante s'il subit des **modifications substantielles** et/ou si sa **fonction essentielle n'est pas la même** chez le donneur et le receveur.

Le règlement ne décrit pas les modifications substantielles, il liste uniquement des manipulations qui ne sont pas considérées comme substantielles comme :

- le découpage, broyage, façonnage, centrifugation, trempage dans des solutions antibiotiques ou antimicrobiennes,
- la stérilisation, l'irradiation, la séparation, concentration ou purification de cellules,
- la filtration, lyophilisation, congélation, cryoconservation, vitrification.

Une modification est considérée comme substantielle si elle entraîne « une modification des propriétés biologiques initiales des cellules ou du tissu » selon l'Annexe I de la directive 2001/83/CE. On peut citer comme modification substantielle : la culture cellulaire *ex vivo* (amplification) ou la transfection de gène d'intérêt dans des cellules. Il est à noter qu'une succession de modifications, chacune non substantielle, peut conduire à un procédé qui modifie les propriétés de cellules / tissus et constituer au final une modification substantielle.

En ce qui concerne la fonction essentielle, si on prend le cas des cellules souches hématopoïétiques (CSH) triées depuis du sang total (via le CD34+) afin de reconstituer l'hématopoïèse d'un individu après irradiation alors ces cellules ne sont pas considérées comme un MTI. Par contre si ces mêmes CSH sont utilisées pour régénérer des tissus ou pour lutter contre des pathologies auto-immunes ou cancéreuses (ce qui n'est pas leur fonction première), alors elles répondent à la définition d'un MTI.

Par ailleurs, ce règlement européen définit deux exceptions :

- « **L'exception éthique** » dans laquelle il importe que la réglementation des MTI au niveau communautaire ne doit pas porter atteinte aux décisions prises par les États membres concernant l'opportunité d'autoriser l'utilisation de tel ou tel type de MTI (ex. les cellules souches embryonnaires, ou les cellules animales) ;
- Et « **l'exemption hospitalière** » créant les MTI préparés ponctuellement (MTI-PP) selon des normes de qualité spécifiques (non BPF), et utilisés au sein du même État membre, dans un hôpital, sous la responsabilité professionnelle exclusive d'un médecin, pour exécuter une prescription médicale déterminée pour un produit spécialement conçu à l'intention d'un malade déterminé. Elle est transposée en droit français par l'arrêté du 4 février 2013 fixant le contenu des demandes d'autorisation initiale, de renouvellement d'autorisation ou de modification d'autorisation des MTI-PP, et établit le fait que des établissements ou organismes non pharmaceutiques ont le droit de produire ces MTI-PP. Seulement, à la suite de la forte exploitation de cette exemption hospitalière pour réaliser des essais cliniques hors BPF, la réglementation va évoluer une dernière fois. Depuis la modernisation du système de santé Français, le décret du 15 novembre 2016 relatif aux MTI définit que les MTI-PP expérimentaux (dans le cadre des recherches biomédicales) peuvent désormais être importés ou exportés mais doivent répondre aux BPF. Toutefois, ce décret conserve la dérogation aux unités de thérapie cellulaire et génique (UTC/UTG) des établissements de santé à produire ces MTI seulement expérimentaux sans être établissement pharmaceutique, donc sans le besoin de pharmacien pour la certification.

Enfin, ce règlement ne déroge pas aux principes fondamentaux énoncés dans la directive 2004/23/CE 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 mais introduit des exigences supplémentaires. Ainsi lorsqu'un MTI contient des cellules ou des tissus humains, la directive 2004/23/CE s'applique uniquement en ce qui concerne le don, l'obtention et le contrôle du tissu ou des cellules qui serviront de matière première de départ à l'élaboration et la production du MTI, mais aussi pour les préparations de thérapie cellulaire (PTC) qui ne sont pas des médicaments. Les PTC ne sont pas modifiées de façon substantielle et sont destinées à être utilisées pour la même fonction essentielle chez le donneur et le receveur. Ils ont des bonnes pratiques spécifiques décrites dans la décision du 27 octobre 2010 : règles de bonnes pratiques relatives à la préparation, à la conservation, au transport, à la distribution et à la cession des tissus, des cellules et des PTC.

Ces classifications sont complexes et soumises à débats ([Tableau 1](#)) ; elles détaillent trois types de produits aujourd'hui, chacun relevant d'un cadre réglementaire spécifique :

- les médicaments de thérapie innovante (MTI)
- les médicaments de thérapie innovante préparés ponctuellement (MTI-PP)
- les préparations de thérapie cellulaire (PTC)

Tableau 1 : Classification du CAT.

Produits	MTI 	MTI-PP 	PTC
Définition	Médicaments de thérapie génique, de thérapie cellulaire somatique, issus de l'ingénierie cellulaire.	MTI expérimentaux préparé de façon ponctuelle à l'attention d'un patient déterminé.	Cellules à effet thérapeutique qui ne sont pas des MTI.
Mise sur le marché	Européenne procédure centralisée obligatoire EMA-CAT 2001/83/CE modifiée	Européenne décret 2016-1536 du 15/11/16 <i>avant cette date : Nationale</i>	Nationale décret 2008-968 du 16/12/08 et arrêté du 27/10/11
Importation / Exportation	Oui	Oui (depuis 2016)	Oui
Vigilance	Pharmacovigilance	Pharmacovigilance	Biovigilance

Les objectifs de cette nouvelle législation sont d'une part d'assurer un accès au marché à l'ensemble des Etats Membres de l'Union Européenne (UE) via une procédure d'AMM centralisée. Une fois octroyée par la Commission Européenne l'AMM s'impose alors dans tous les pays de l'UE. D'autre part, les objectifs sont de développer la qualité et la sécurité de ces nouveaux produits à partir de référentiels adaptés applicables sur l'ensemble de l'UE avec une obligation de traçabilité c'est-à-dire de suivi de la sécurité et de l'efficacité une fois le produit mis sur le marché : la pharmacovigilance. Enfin, le projet que porte cette nouvelle législation est d'améliorer l'évaluation de ces produits innovants via un comité des thérapies innovantes à l'EMA : le « *Committee for Advanced Therapies* » (CAT) assurant l'évaluation scientifique dans tous les domaines que couvrent ces produits (bio-ingénierie, biologie cellulaire et moléculaire, etc...).

1.2. Classification des MTI

Les MTI sont actuellement répartis en 4 sous-catégories, selon la classification de l'EMA ([Tableau 2](#)), en :

- médicaments issus de l'ingénierie tissulaire et cellulaire (TEP)
- médicaments de thérapie cellulaire somatique (sCTMP)
- médicaments de thérapie génique (GTMP)
- médicaments combinés de thérapie innovante (Combined ATMP)

Tableau 2 : Définitions réglementaires des MTI selon la directive N°1394/2007.

Dénomination	Définition réglementaire
Médicament de Thérapie innovante (MTI)	- un médicament de thérapie génique est défini dans le Partie IV de l'Annexe I de la directive 2001/83/CE, - un médicament de thérapie cellulaire somatique est défini dans le Partie IV de l'Annexe I de la directive 2001/83/CE, - un médicament issu de l'ingénierie tissulaire et cellulaire est défini par l'Article 2.1(b) de la réglementation N°1394/2007
Médicament issu de l'ingénierie tissulaire et cellulaire (TEP)	a) contient ou est constitué de cellules ou de tissus modifiés, et b) est présenté comme ayant des propriétés ou est utilisé ou administré à des êtres humains en vue de régénérer, de réparer ou de remplacer un tissu humain.
Médicament de thérapie cellulaire somatique (sCTMP)	a) contient ou est constitué de cellules ou de tissus qui ont fait l'objet de manipulations importantes de sorte que les caractéristiques biologiques, les fonctions physiologiques ou les propriétés structurales pertinentes pour l'utilisation clinique prévue ont été modifiées, ou de cellules ou de tissus qui ne sont pas destinés à la (les) même (s) fonction (s) essentielle (s) chez le receveur et le donneur ; b) est présenté comme ayant des propriétés ou est utilisé ou administré à des êtres humains en vue de traiter, prévenir ou diagnostiquer une maladie par l'action pharmacologique, immunologique ou métabolique de ses cellules ou tissus.
Médicament de thérapie génique (GTMP)	a) il contient une substance active qui contient ou consiste en un acide nucléique recombinant utilisé ou administré à des êtres humains en vue de réguler, réparer, remplacer, ajouter ou supprimer une séquence génétique ; b) son effet thérapeutique, prophylactique ou diagnostique est directement lié à la séquence d'acide nucléique recombinante qu'il contient, ou au produit de l'expression génétique de cette séquence.
Médicament combiné de thérapie innovante (Combined ATMP)	a) doit incorporer, en tant que partie intégrante du produit, un ou plusieurs dispositifs médicaux au sens de l'article 1er, paragraphe 2, point a), de la directive 93/42/CEE ou un ou plusieurs dispositifs médicaux implantables actifs au sens de l'article 1 (2) (c) de la Directive 90/385/CEE, et b) sa partie cellulaire ou tissulaire doit contenir des cellules ou des tissus viables, ou c) sa partie cellulaire ou tissulaire contenant des cellules ou des tissus non viables doit être susceptible d'agir sur le corps humain avec une action qui peut être considérée comme primaire par rapport à celle des dispositifs visés.

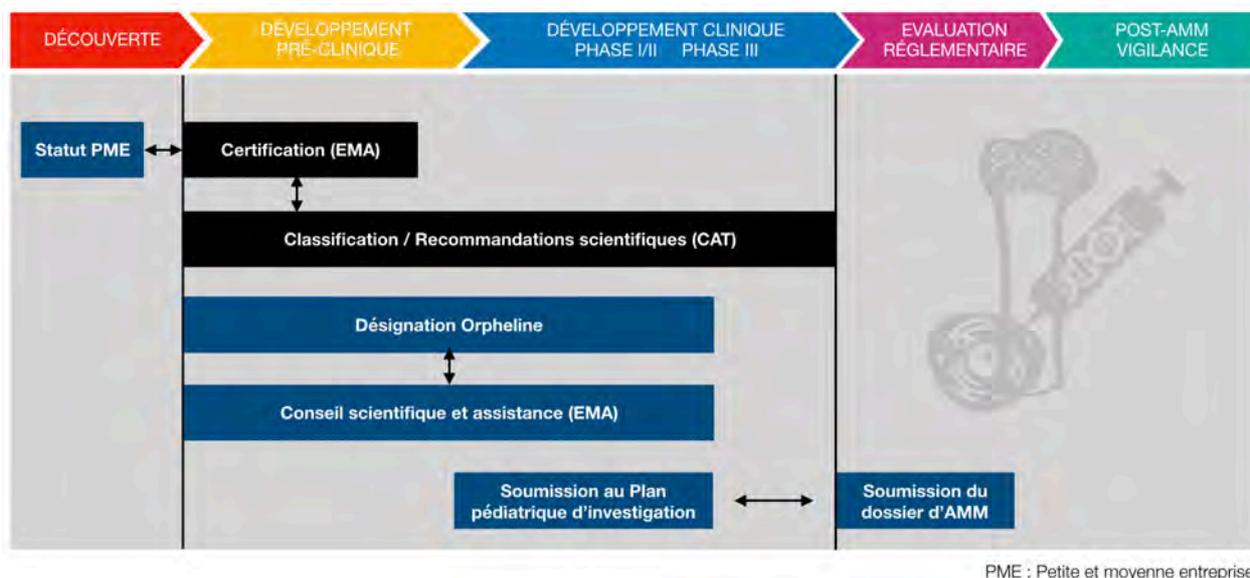
-

La méthode de classification par le CAT est détaillée dans l'[Annexe 1](#).

2. Processus de développement d'un MTI

Le développement des médicaments de thérapie innovante ne déroge pas au processus classique des médicaments ([Figure 1](#)). Une découverte par un laboratoire de recherche académique (le plus souvent) ou privé est vérifiée par des études pré-cliniques sur des modèles *in vitro* et *in vivo* réalisées selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). Par la suite un dossier compilant l'ensemble des données pré-cliniques est envoyé à l'EMA pour obtenir l'autorisation d'un essai clinique. Le MTI expérimental est alors fabriqué par un établissement soumis aux BPF pour les phases cliniques. Du fait de la rareté de l'indication des MTI, ils suivent des essais cliniques de phase I/II puis III avant la soumission du dossier d'AMM et leur commercialisation.

Figure 1 : Vue générale du développement des médicaments de thérapie innovante



2.1. Les dispositifs de soutien à la recherche académique

Si les essais cliniques des MTI sont particulièrement coûteux, l'existence de dispositifs de soutien de la recherche permet d'encourager les développeurs. Aujourd'hui une grande part des produits pharmaceutiques en développement sont des bio-médicaments (médicaments issus du vivant) sur un marché pharmaceutique mondial de plus de 7,5 milliards de dollars en 2017 ¹. Au sein de ces biomédicaments, l'investissement total au premier trimestre 2018 dans les domaines des MTI fait état de près de 4 milliards de dollars avec une prédominance de fonds dans le développement des thérapies géniques à hauteur de 3,1 milliards de dollars (Figure 2).

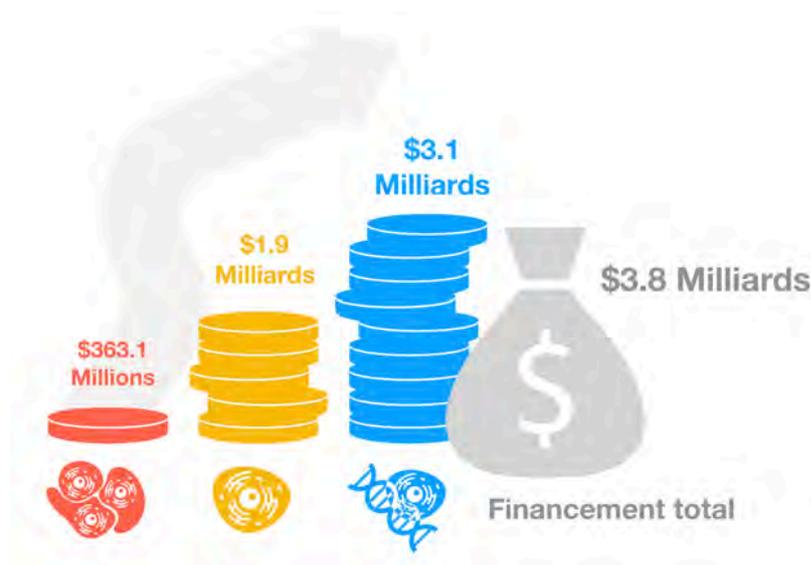


Figure 2 : Investissement mondial dans le domaine des MTI au premier trimestre 2018 ².

Les TEP en rouge, les sCTMP en jaune et les GTMP en bleu.

Historiquement, la France est pionnière dans le domaine des médicaments issus de la chimie mais prend le virage des médecines personnalisées cellulaires et géniques. L'introduction et l'utilisation de ces technologies innovantes et pertinentes favorables à la prise en charge des patients dans leur parcours de soins, sont les résultats de recherches s'inscrivant dans un *continuum*. Pour alimenter ce *continuum*, des programmes de recherche existent et sont financés par le Ministère en charge de la santé, les crédits de recherche alloués par l'Agence nationale de la recherche (ANR), par la Banque publique d'investissement de France (les pôles de compétitivité, le fonds unique interministériel et les projets industriels d'avenir) ou par le Commissariat général à l'investissement, etc...

Ces projets de recherche concourent, d'une part, au développement de technologies de santé à la fois nouvelles et innovantes et, d'autre part, à remettre en question la pertinence des technologies de santé actuellement mises en œuvre. Dans ce dernier cas, il s'agit de comparer les stratégies de prise en charge alternatives, afin de sélectionner les plus efficaces. Enfin, ces projets de recherche concourent à l'optimisation de l'organisation des soins et des parcours de soins.

Les 5 programmes de recherche soutenus par le Ministère en charge de la santé et explicités ci-après s'adressent à des projets de recherche dont le niveau de maturité technologique ([Figure 3](#)), ou TRL pour « *Technology Readiness Level* », est compris entre les niveaux 4C et 9 (inclus).

1) La recherche translationnelle évalue la transposabilité en recherche clinique d'un concept innovant identifié lors d'une recherche fondamentale et cognitive : elle définit le champ du **programme de recherche translationnelle (PRT)**.

2) La recherche clinique évalue la sécurité, la tolérance, l'efficacité et la faisabilité des technologies de santé : elle définit le champ du **programme hospitalier de recherche clinique (PHRC)**.

3) La recherche médico-économique évalue l'efficacité des technologies de santé : elle définit le champ du **programme de recherche médico-économique (PRME)**.

4) La recherche organisationnelle évalue l'efficacité des offreurs de soins et des dispositifs destinés à améliorer la qualité des soins et des pratiques : elle définit le champ du **programme de recherche sur la performance du système de soins (PREPS)**.

5) La recherche sur les pratiques et les organisations de soins mises en œuvre par les auxiliaires médicaux évalue leur sécurité, leur efficacité et leur efficacité : elle définit le champ du **programme hospitalier de recherche infirmière et paramédicale (PHRIP)**.

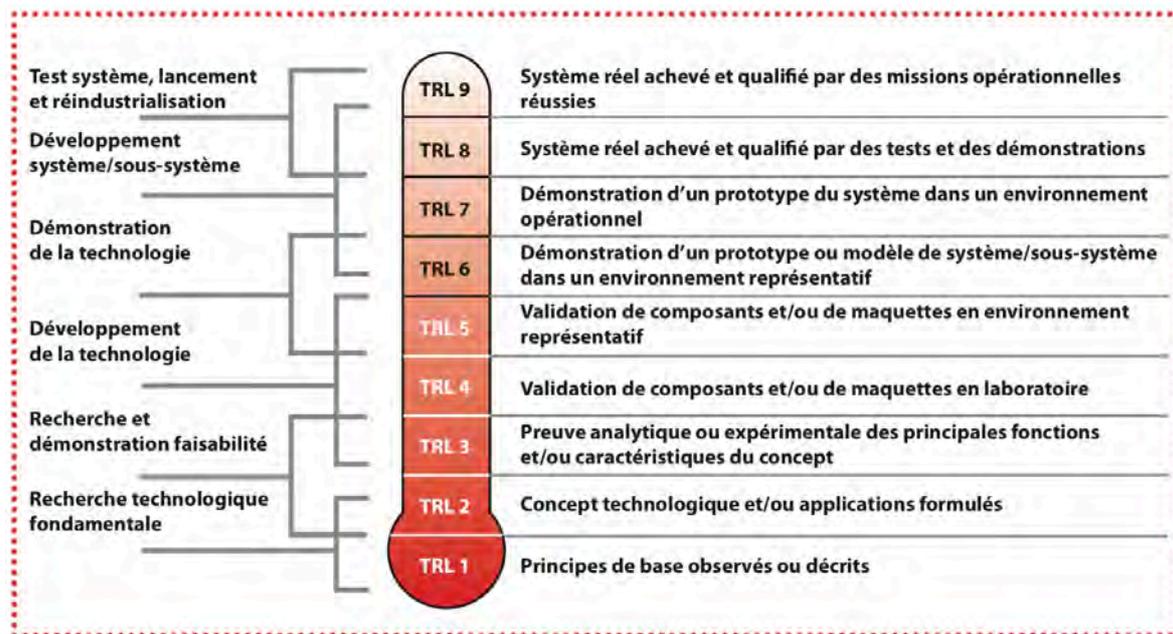


Figure 3 : Les différents niveaux de maturité technologique des projets de recherche ³.

Certains programmes de recherche se déclinent même en plusieurs appels à projets :

- le Programme de recherche translationnelle en santé, PRT-S ;
- le Programme de recherche translationnelle en cancérologie, PRT-K ;
- le Programme hospitalier de recherche clinique national, PHRC-N ;
- le Programme hospitalier de recherche clinique national en cancérologie, PHRC-K ;
- le Programme hospitalier de recherche clinique inter-régional, PHRC-I ;

2.2. Les études pré-cliniques

Les données pré-cliniques présentées dans une demande de certification doivent être en adéquation avec une démonstration de l'**efficacité** (preuve de concept), et une évaluation préliminaire de la **sûreté** du MTI.

L'ensemble minimal requis de données non cliniques pour la certification est explicité par une directive européenne du 15 octobre 2010 émis par le CAT ⁴ faisant référence à :

- a) Des données d'une preuve de concept ou de **pharmacodynamique** qui comprennent l'ensemble des études *in vitro* et, si possible, au moins une étude sur un ou plusieurs modèles animaux *in vivo* pertinents reflétant l'utilisation clinique prévue.
- b) Des données de **pharmacocinétique** sur la biodistribution qui sont essentielles pour soutenir la pharmacodynamie et la sécurité du MTI (ex. le devenir des cellules souches modifiées ou les cellules

génétiqnement modifiées injectées par voie intraveineuse). L'absence de données de biodistribution doit être justifiée.

c) Au moins une étude de **sécurité toxicologique ou pharmacologique** doit être fournie. Ces études devraient être de qualité et de fiabilité appropriées et suivre les lignes directrices pertinentes le cas échéant. Elles sont tenues d'être menées conformément aux principes et aux normes des BPL. Dans certains cas scientifiquement justifiés, une étude de preuve de concept (par exemple, dans un modèle de pathologie) comprenant des critères de sécurité pertinents peut également être considérée comme une étude de toxicologie.

Selon les directives de la « Food and Drug Administration » (FDA) aux Etats-Unis sur l'évaluation pré-clinique des thérapies innovantes expérimentales, les objectifs généraux de la recherche pré-clinique sont semblables à ceux de l'EMA ^{5 6} :

- Établissement de la plausibilité biologique.
- Identification des niveaux de dose biologiquement actifs.
- Sélection de la dose de départ potentielle, du plan d'augmentation de la dose et du schéma posologique pour les essais cliniques.
- Établissement de la faisabilité et l'innocuité raisonnable de la voie d'administration clinique proposée pour le produit expérimental.
- Prise en charge des critères d'éligibilité des patients.
- Identification des paramètres physiologiques pouvant guider la surveillance clinique.
- Identification des risques potentiels pour la santé publique (par exemple, pour le grand public, les soignants, les membres de la famille, les contacts étroits et les contacts intimes).

Pour les thérapies innovantes, en particulier les thérapies cellulaires, le développement pré-clinique offre également l'opportunité d'atténuer l'incertitude en aval en optimisant et en validant un processus de fabrication évolutif en amont. Au vu des dépenses de temps et de capital nécessaires pour entreprendre des modifications de procédé et les études de comparabilité associées à un développement clinique tardif, il apparaît plus pertinent d'investir dans une optimisation pré-clinique ou biologique précoce des bio-procédés.

Développer une compréhension globale de la biologie intrinsèque du produit et de son mécanisme d'action est une priorité essentielle. Les connaissances générées par le développement pré-clinique éclairent sur les paramètres critiques, dont les spécifications précises et complètes sont essentielles pour un système de fabrication robuste.

2.3. Centres producteurs et système qualité pharmaceutique

Ces études pré-cliniques élaborées dans des laboratoires de recherche doivent transférer leur technologie dans des centres de production agréés par les agences réglementaires du pays. Il existe plus de 861 industriels développeurs de médicaments de thérapie innovante à travers le monde dont 233 en Europe (Figure 4).

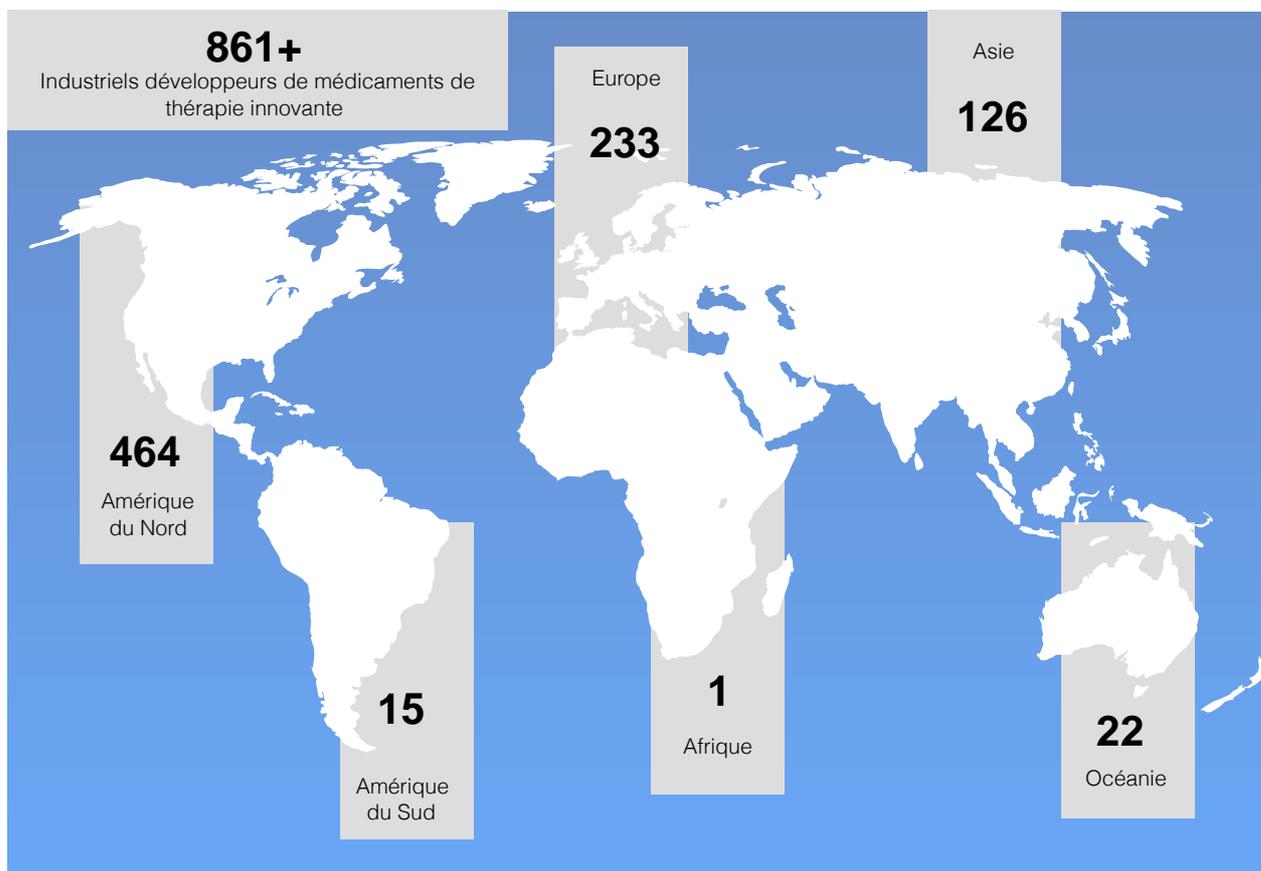


Figure 4 : Industrielles de production des MTI au premier trimestre 2018 ².

2.3.1. Centres producteurs en France

En France, les MTI sont des médicaments très contrôlés, de ce fait leur conception est restreinte à des structures pouvant assurer ces contraintes réglementaires (Tableau 3). A la différence des PTC, les MTI et MTI expérimentaux sont soumis aux BPF. Mettre en place ces BPF n'est pas suffisant, la structure qui les produit doit être autorisée en qualité d'établissement pharmaceutique selon l'arrêté du 22 mars 2011 (L5124-9-1 et L5124-1). Il est à noter que les spécificités des MTI sont telles que le législateur européen a ressenti la nécessité de décrire celles-ci dans des BPF appropriées, qui seront applicables à compter de mai 2018 ⁷.

Plus récemment, l'article L4211-9-1 modifié par la loi du 26 janvier 2016 et le décret paru le 15 novembre 2016 élargissent le champ de production des MTI utilisés en recherche expérimentale (définie

par la L1121-1) aux **établissements de santé** (de type UTC, UTG) notamment pour promouvoir les essais cliniques issus de la recherche académique.

Tableau 3 : La réglementation des centres producteurs selon la classification du CAT

Classification	MTI	MTI-PP et MTI-Exp	PTC
Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF)	BPF médicaments (L5121-5 alinéa 1er)	BPF médicaments pour les établissements pharmaceutiques (L5121-5 alinéa 1er) BPF spécifiques MTI pour les établissements autorisés non établissements pharmaceutiques (L5121-5 alinéa 3)	Bonnes pratiques tissus cellules (L1245-6)
Centre producteur	Etablissement pharmaceutique (L5124-9-1 ou L5124-1) Etablissement de santé (L4211-9-1) et décret 15-11-2016 (médicament expérimentaux EC)	Etablissement pharmaceutique (L5124-9-1 ou L5124-1) ou établissement autorisé par l'ANSM pour la fabrication de MTI expérimentaux (L4211-9-1)	Unités de thérapie cellulaire autorisées par l'ANSM (L1243-2)

2.3.2. Système qualité pharmaceutique

A. Les Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF)

La production de MTI est soumise aux directives BPF qui ont pour objectif de garantir la sécurité, l'efficacité et la qualité d'un produit industriel et notamment des médicaments. Ainsi, les BPF établissent des normes pour que les médicaments fabriqués dans n'importe quel établissement pharmaceutique ou de santé soient conformes à une utilisation clinique dans le cadre d'essais ou d'AMM. Ces exigences de haut niveau s'appliquent durant tout le processus de fabrication des MTI, c'est-à-dire du prélèvement de la matière première biologique de départ jusqu'à la libération du produit fini, et garantissent selon des normes de qualité leur préparation, contrôle, conservation et transport. D'autant plus que des lignes directrices BPF spécifiques aux MTI ont été publiées le 22 Novembre 2017 avec une entrée en vigueur le 22 mai 2018 ⁷.

Ce système qualité pharmaceutique mis place par le producteur a pour but de mettre en adéquation la production de MTI avec des directives BPF concernant :

- (iv) l'habilitation du personnel avec des responsabilités claires et définies
- (v) la qualification et la maintenance des équipements utilisés
- (vi) la mise en place d'un système de documentation adéquat
- (vii) une production constante et de qualité
- (viii) l'indépendance du contrôle qualité par rapport à la production
- (ix) l'évaluation prospective des changements
- (x) le management de la qualité
- (xi) la traçabilité

Ces lignes directrices n'ont pas pour but de freiner le développement et l'innovation. Les MTI nécessitent donc une **flexibilité réglementaire** suffisante pour anticiper l'évolution rapide de la science et des technologies. Les exigences techniques sont donc explorées plus en détail dans plusieurs lignes directrices spécifiques à l'EMA ^{8 9}. Pour créer plus de flexibilité, la législation et les directives concernant les MTI en vigueur recommandent aux producteurs d'utiliser une approche basée sur le risque pendant le développement ^{10 ; 11}.

B. Approche basée sur le risque (RBA)

L'EMA a défini l'approche basée sur le risque ou « Risk Based Approach » (RBA) comme « une stratégie visant à déterminer l'étendue des données de qualité, non cliniques et cliniques à inclure dans l'AMM, conformément aux directives scientifiques relatives à la qualité, à la sécurité et à l'efficacité des médicaments et à justifier toute dérogation aux exigences techniques définies à l'annexe I, partie IV, de la directive 2001/83/CE ». Le but de la RBA est donc d'obtenir un profil des risques engendrés par le développement des MTI (Figure 5). Pour établir ce profil, il est nécessaire d'identifier au préalable les différents risques associés à l'utilisation clinique des MTI, puis de déterminer les facteurs de risques spécifiques au produit contribuant à chaque risque identifié.

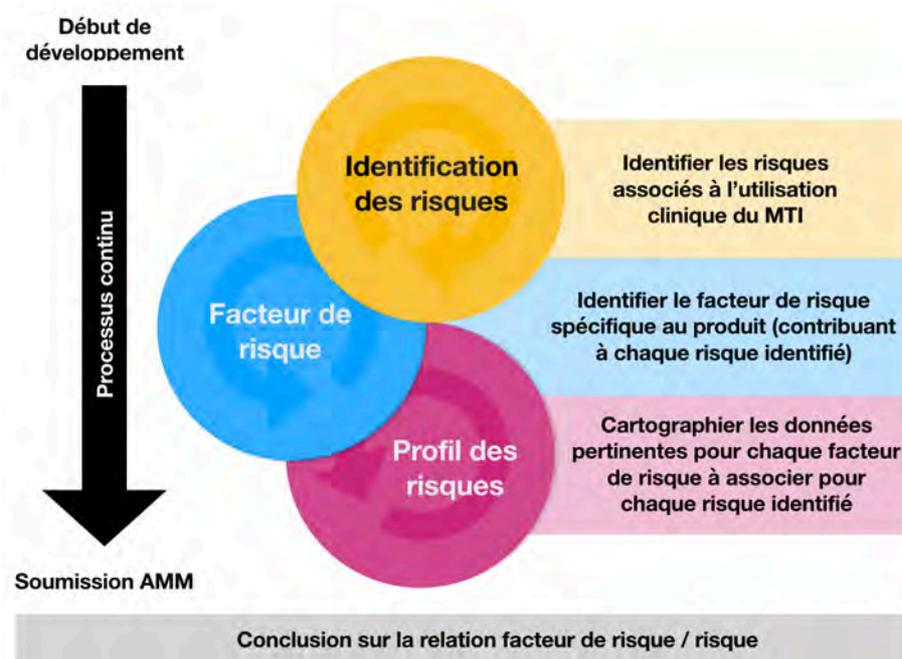


Figure 5 : L'approche basée sur le risque (RBA)

Par exemple pour une thérapie cellulaire : le risque de contamination microbiologique du MTI produit découle de plusieurs facteurs de risques comme la façon de prélever la matière première, les changements de milieux de culture lors de l'expansion, ou encore l'utilisation d'un conditionnement final non stérile. Cette RBA permettra de mettre en place des **actions préventives** pour diminuer ce risque ; dans cet exemple l'écriture de procédures pour le prélèvement de la matière première, le changement de mi-

lieux, le conditionnement ou encore l'habillage ainsi que la mise en place de contrôles microbiologiques environnementaux par exemple.

C. Les contrôles qualité des MTI

Les contrôles qualité (CQ) sont impliqués dans tout au long de la chaîne de production des MTI, des matières premières (biologiques ou non), du produit intermédiaire (« *in process* ») jusqu'au produit fini : le médicament au sens propre du terme. Les CQ d'un MTI sont établis au cours du développement et décrits lors de la soumission du dossier pour effectuer les premières phases d'essai clinique par les promoteurs et les centres producteurs des essais. Les analyses réalisées sur ces produits doivent non seulement répondre aux exigences BPF, mais également de la Pharmacopée Européenne (Ph.E.). Les objectifs de réaliser des CQ pour les MTI sont de pouvoir évaluer leur :

- Identité ou caractérisation biologique
- Pureté
- Activité : tests de fonctionnalité
- Sécurité microbiologique et génique : Innocuité

Les défis des contrôles qualité (choix, développement, limites...) seront détaillés dans le [chapitre III](#), particulièrement le développement de tests de fonctionnalité personnalisés selon le type de MTI.

2.4. Recherche clinique et MTI

2.4.1. Contexte réglementaire des essais cliniques (EC)

Cette nouvelle donne en matière de conditions d'autorisation des établissements producteurs, impose de resituer la réglementation relative aux essais cliniques.

A. Dispositif réglementaire

En termes de recherche clinique, les MTI et les MTI-PP suivent les dispositions réglementaires suivantes :

- La **directive 2001/20/CE** applicable aux essais cliniques de médicaments à usage humain et la Communication 2010/C 82/01 (« CT-1 ») confirmant que les essais doivent être réalisés dans le respect des Bonnes Pratiques Cliniques (BPC) ;
- Le **règlement (UE) n°536/2014** relatif aux essais cliniques de médicaments abrogeant la directive 2001/20/CE dont l'entrée en vigueur est attendue au plus tard en 2019 sous réserve de la mise à disposition du portail européen et de la base de données européenne ;
- La **réglementation des Recherches Impliquant la Personne Humaine ou RIPH** (décret n° 2016-1537 du 16 novembre 2016 et décret rectificatif n° 2017-884 du 9 mai 2017); les recherches sur les MTI et MTI-PP relèvent des RIPH de type 17 (recherche interventionnelle qui comporte une intervention sur la personne humaine non justifiée par sa prise en charge habituelle);
- Les BPC (L. 1121-3) spécifiques aux MTI apportent des exigences et des adaptations complémentaires.

Pour tout essai clinique impliquant des organismes génétiquement modifiés (OGM), les dispositions suivantes doivent être également respectées :

- La directive **98/81/CE** sur l'utilisation confinée des OGM.
- La directive **2001/18/CE** relative à la dissémination volontaire d'OGM dans l'environnement et abrogeant la directive 90/220/CEE du Conseil.
- La **loi du 25 juin 2008** réglementant l'utilisation des OGM.
- L'**arrêté du 19 mars 2007** (2007/358) relatif à la dissémination volontaire à toute autre fin que la mise sur le marché de produits composés en tout ou partie d'organismes génétiquement modifiés

La directive 2001/20/CE est maintenue de manière transitoire jusqu'à l'entrée en vigueur du règlement européen et la mise en place opérationnelle du portail et de la base de données européens.

B. Autorisations préalables avant l'autorisation d'essai clinique

Les autorisations préalables à un essai clinique de MTI ou de MTI expérimental nécessaires sont :

- une autorisation de **prélèvement** (si applicable) octroyée par l'Agence régionale de santé (ARS) référente du site ;
- une autorisation de **fabrication** du site du MTI ou du MTI expérimental (établissements pharmaceutiques autorisés ou établissements de santé autorisés) conformément aux BPF ;
- une autorisation d'**importation ou d'exportation** de la matière première de départ et/ou du MTI ou MTI expérimental si besoin ;
- un avis du **Haut Conseil des Biotechnologies** (HCB) concernant le classement du produit de thérapie génique et des mesures de confinement à mettre en place pour sa manipulation.

C. Procédure actuelle de demande d'autorisation de RIPH pour un MTI en France

Le promoteur dépose un dossier de demande auprès de l'ANSM et auprès d'un **Comité de Protection des Personnes** (CPP) tiré au sort. La date de réception du dossier complet du promoteur à l'ANSM marque le début du calendrier réglementaire (J0). Le CPP veille principalement à la protection des personnes qui se prêtent à une RIPH et a 35 jours pour émettre son avis favorable ou défavorable sur l'éthique de la recherche. La déclaration ou l'autorisation de la Commission nationale de l'informatique et des libertés (CNIL) concernant la protection des données individuelles doit également être fournie ainsi que l'assurance de l'essai clinique ([Figure 6](#)).

La procédure diffère selon la nature du MTI :

- Pour les **médicaments cellulaires, tissulaires ou combinés de thérapie cellulaire ou tissulaire**, l'ANSM dispose d'un délai de 90 jours pour évaluer la demande (période de recevabilité technico-réglementaire incluse) suivant la date de réception du dossier complet. Toutefois, si l'ANSM estime que des informations complémentaires, consultations ou études particulières sont nécessaires pour lui permettre de se prononcer sur la demande, elle peut prolonger ce délai de 90 jours supplémentaires.

L'Agence de la biomédecine (ABM) est également sollicitée et dispose de 40 jours pour transmettre son avis.

- Pour les **médicaments de thérapie génique ou combinés de thérapie génique**, l'ANSM dispose d'un délai de 120 jours pour évaluer la demande (période de recevabilité technico-réglementaire incluse) suivant la date de réception du dossier complet. Le délai peut être prolongé selon la durée qu'elle estime nécessaire pour compléter les informations demandées. L'HCB est aussi sollicité par l'ANSM concernant l'agrément des sites impliqués dans l'essai clinique et les mesures de confinement devant être mises en place pour le patient auquel sera administré le MTI ou MTI expérimental.

Une absence de réponse de l'ANSM à l'issue du délai équivaut à un rejet de la demande d'autorisation. La recherche ne peut donc démarrer qu'après une autorisation expresse de l'ANSM et un avis favorable du CPP. La distribution du MTI sera assurée par la PUI tandis que celle du MTI expérimental sera faite par le site de fabrication (souvent les UTC).

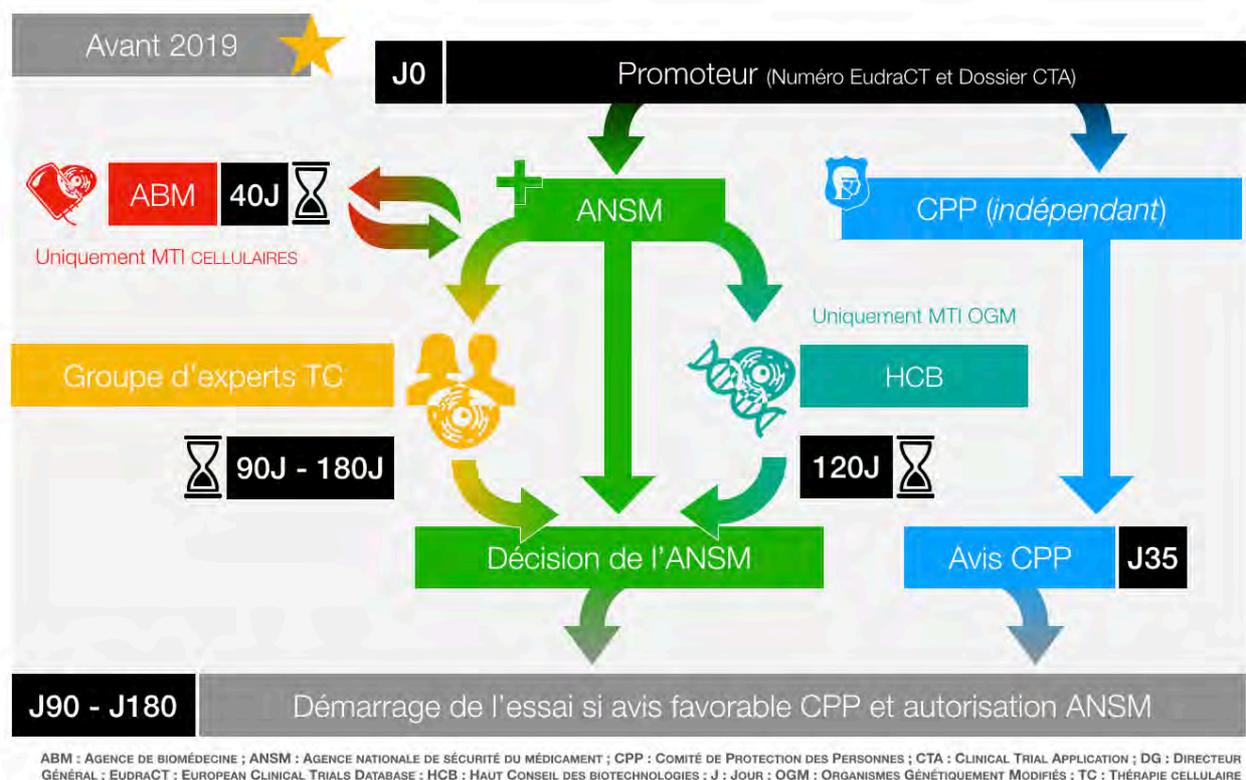


Figure 6 : Démarche nationale de demande d'autorisation des essais cliniques MTI en France avant 2019.

D. Procédure de demande d'autorisation de RIPH pour un MTI ou MTI-PP après entrée en vigueur du règlement (UE) 536/2014

En 2019, lors de l'entrée en vigueur du règlement (UE) 536/2014, les changements par rapport à la procédure actuelle seront les suivants (Figure 7) :

- Le dépôt de la demande d'autorisation se fera sur le portail européen unique.

- L'évaluation de la demande s'effectuera en parallèle avec l'examen de deux parties distinctes : **scientifique** et **éthique**. L'évaluation de la partie scientifique sera centralisée pour tous les états membres et coordonnée par un état membre rapporteur. Chaque état membre devra se prononcer individuellement concernant la partie éthique. Il est à noter :
 - Si le promoteur envisage de mettre en place des centres de recrutement en France alors l'autorité compétente française - ici l'ANSM - devra communiquer à l'Etat membre rapporteur son avis scientifique. De même, l'organisme en charge de l'éthique - ici le CPP - donnera son avis pour la partie éthique.

 - Pour les médicaments cellulaires, tissulaires ou combinés de thérapie cellulaire ou tissulaire, l'avis de l'ABM ne sera plus sollicité. Pour les médicaments de thérapie génique ou combinés de thérapie génique, le fabricant devra déposer une demande à part pour l'agrément des sites impliqués dans l'essai clinique et les mesures de confinement devant être mises en place pour le patient auquel sera administré le MTI ou le MTI-PP.

Au total, une décision unique sera notifiée sur le portail européen. Le délai d'évaluation se situe entre 110 jours (aucune information complémentaire demandée) et 141 jours.

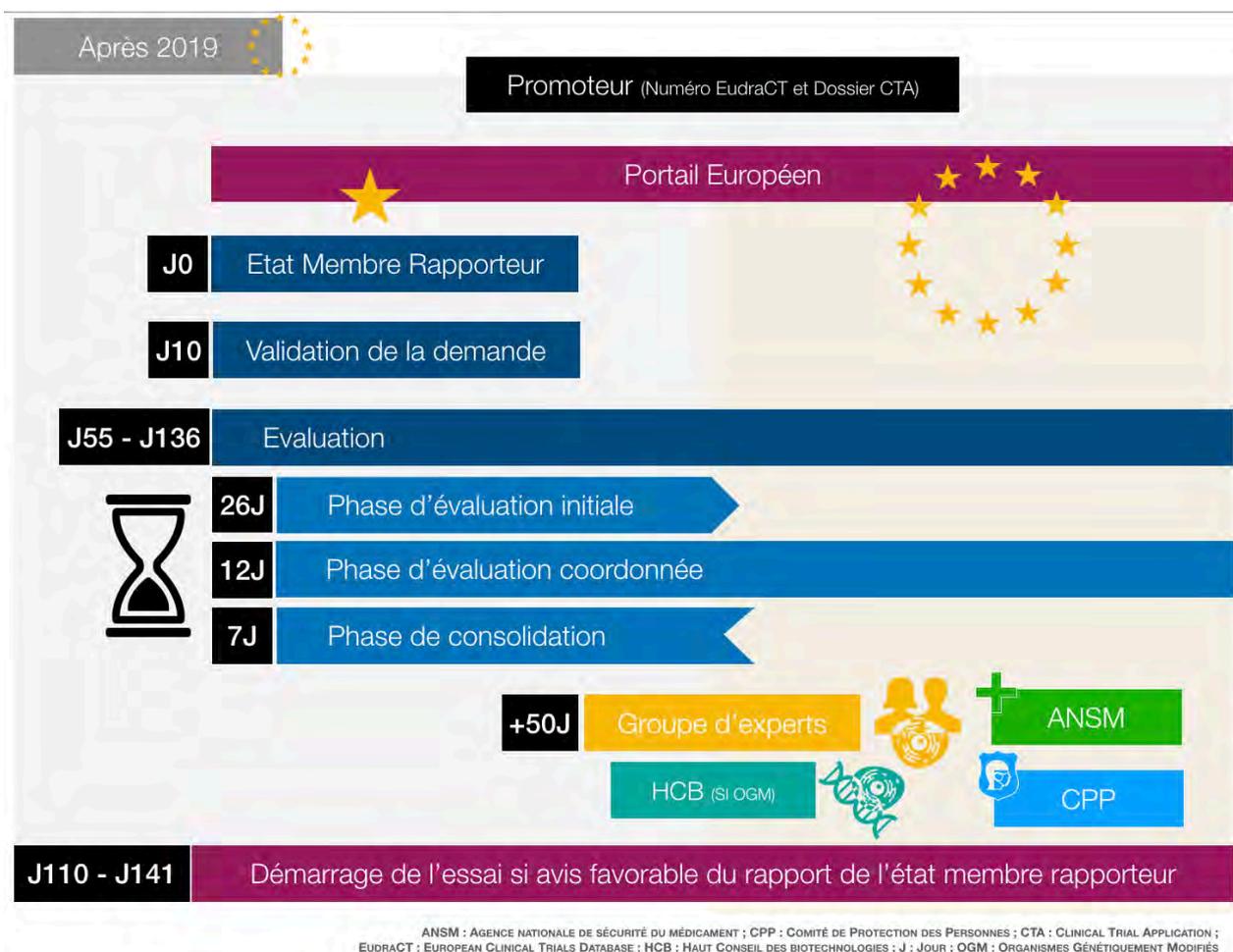


Figure 7 : Démarche centralisée de demande d'autorisation des essais cliniques MTI en Europe après 2019.

2.4.2. Essais cliniques des MTI

Les petites molécules et les agents thérapeutiques similaires adhèrent généralement au processus de test clinique en trois phases traditionnelles. Cela commence par des essais à petite échelle testant une gamme de doses chez des volontaires sains pour établir la dose la plus élevée tolérée (phase I), avant de passer aux études précoces d'efficacité pour le test dose-réponse et l'optimisation (phase II) et finalement de passer sur des essais conçus pour confirmer et caractériser pleinement l'efficacité du produit (phase III). Les essais de phase III constituent la base de l'analyse coût-efficacité et de l'autorisation de mise sur le marché ultérieure, mais les données de phase II et I peuvent être incluses.

Les thérapies cellulaires et géniques ne s'inscrivent pas précisément dans ce cadre, et de nouveaux plans de développement clinique sont souvent nécessaires. En raison de la possibilité d'une persistance à long terme des thérapies cellulaires et géniques et des toxicités liées, leur profil de risque en phase I rend le test sur des volontaires sains injustifiable. Les essais cliniques précoces font donc généralement partie d'une population de patients malades similaires à celle du marché ciblé, et les essais intègrent

souvent l'efficacité dans les critères d'évaluation secondaires, aboutissant à une classification de phase I / II (Figure 8).

La diversité des thérapies innovantes signifie qu'il n'y a pas d'approche unique pour tous. Cette confusion des phases d'essai traditionnelles complique le processus de développement clinique et exige que les développeurs des MTI collaborent avec les organismes de réglementation pour ratifier leur logique de développement clinique et concevoir des essais cliniques pertinents et validés.

La rareté de la maladie, le degré de bénéfice attendu et le profil d'innocuité prévu affecteront le nombre de participants et d'autres aspects de la conception de chaque essai. Alors que les médicaments à petites molécules recrutent régulièrement des centaines de patients dans plusieurs essais de toutes les phases avant la soumission de l'AMM, les MTI sont des thérapies à plus petits marchés. Glybera® (une thérapie génique de statut orphelin) a été approuvé après deux essais cliniques totalisant seulement 19 sujets (plus un essai rétrospectif sur 17 des sujets précédents).



Figure 8 : Comparaison des phases cliniques de développement d'un médicament classique (A) par rapport aux MTI (B).

Au premier trimestre 2018, on note ainsi la présence de près de mille essais cliniques en cours de thérapie cellulaire et génique à travers le monde. Ils sont majoritairement constitués d'essais en phases I/II (> 90%). De manière intéressante, le cumul du nombre d'essais cliniques de thérapie génique (*in vivo et ex vivo*) est 2 fois supérieur à celui des thérapies cellulaires somatiques, étant le reflet du développement clinique récent des nouvelles techniques d'édition du génome (Figure 9). Ces chiffres sont néanmoins à prendre avec précaution puisque la dénomination légale des sous-types de MTI n'est pas identique dans le monde. Selon l'EMA, une partie de la thérapie génique *ex vivo* peut être définie comme de la thérapie cellulaire somatique si le gène transféré n'est pas directement lié à l'effet. De plus, on observe

des chiffres très bas en termes d'essais cliniques d'ingénierie tissulaire (24 essais cliniques), ce qui est là encore à corréliser avec le fait que certaines thérapies cellulaires somatiques à visée régénérative sont considérées par l'EMA comme des médicaments issus de l'ingénierie tissulaire et cellulaire. Une étude rétrospective de 1999 à 2015 (Figure 10) démontre la présence de 53,6% de sCTMP, 22,4% de GTMP, 22,8% de TEP et 1,2% de médicaments combinés ce qui semble plus près de la réalité ¹².

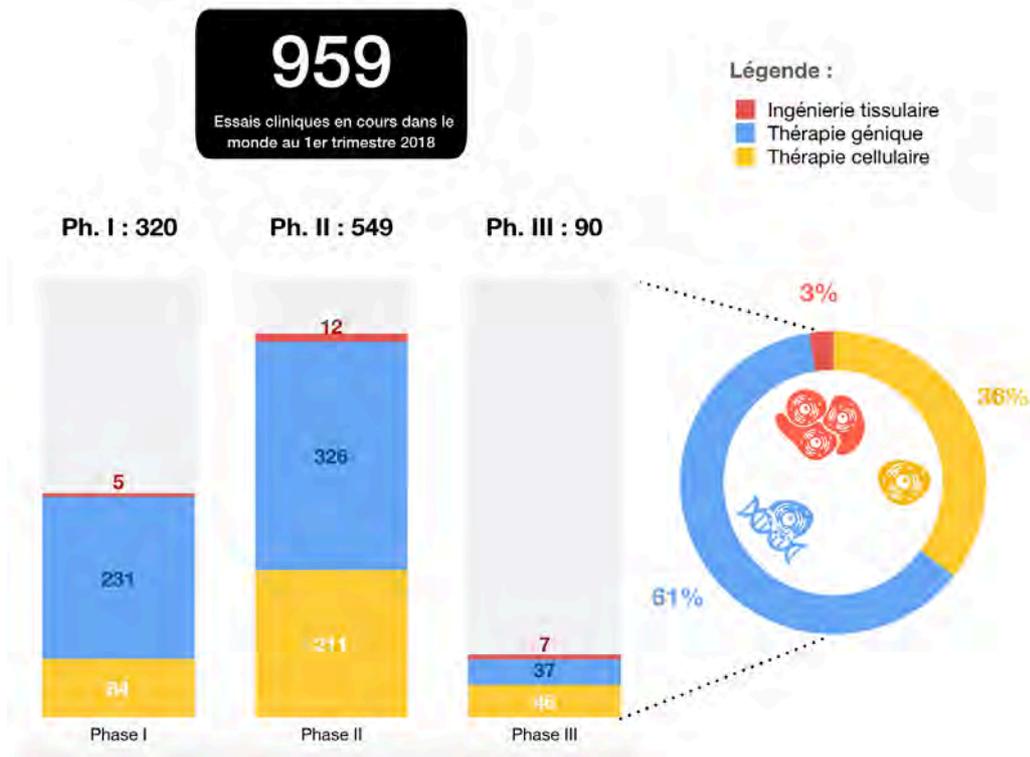


Figure 9 : Essais cliniques en cours au premier trimestre 2018 selon la classification américaine. 2.

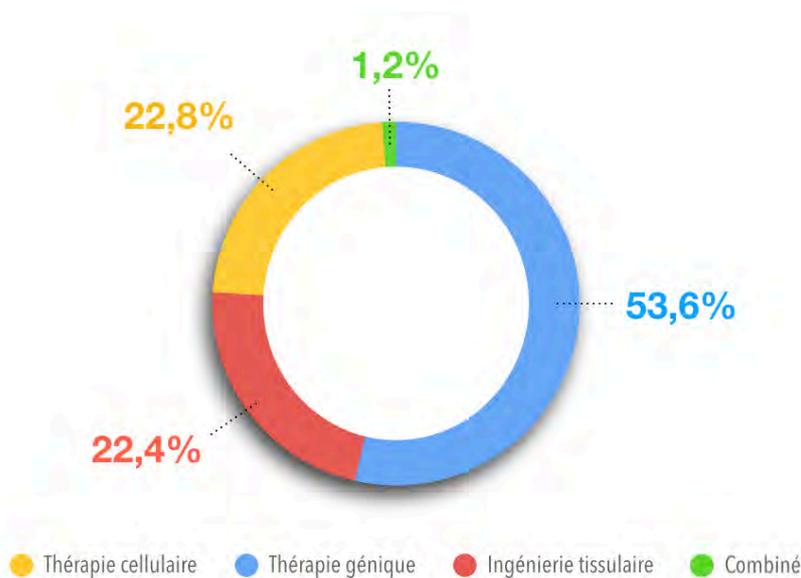


Figure 10 : Classification des essais cliniques de MTI entre 1999 et 2015 ¹².

La principale indication de ces MTI en essai clinique est l'**oncologie** qui explose en 2018 (à plus de 50%) par rapport aux décennies précédentes (environ 25%). L'avènement des lymphocytes T modifiés génétiquement pour lutter contre des hémopathies malignes en est l'exemple type. Viennent ensuite les pathologies cardio-vasculaires à près de 10% (insuffisance cardiaque congestive, infarctus du myocarde, ischémie critique des membres, etc.) et neurologiques à environ 6% (sclérose en plaque, Alzheimer, Parkinson, etc.) qui sont les grands défis de notre siècle liés au vieillissement des populations (Figure 11). Les demandes de classification au CAT de l'EMA reflètent les tendances des futurs MTI en cours de développement. Ce que l'on peut extraire de ces données, c'est la prépondérance des demandes en chirurgie esthétique / dermatologie pour la cicatrisation d'une plaie ainsi que les pathologies musculo-squelettiques soulignant les besoins de la communauté médicale.

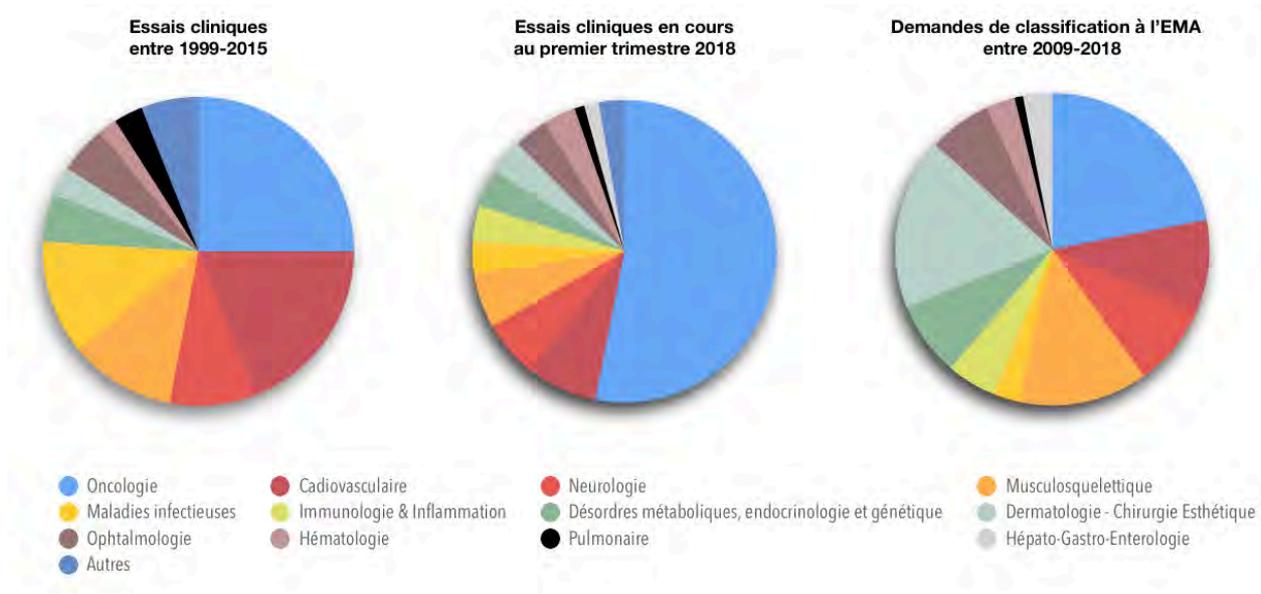


Figure 11 : Indications des MTI dans les essais cliniques en 2015 ¹² en 2018 ² et des demandes de classification au CAT de l'EMA entre 2009-2018.

Source : EMA

2.5.L'autorisation de mise sur le marché des MTI

L'autorisation de mise sur le marché des MTI est différente d'un pays à l'autre du globe. La Corée du Sud a été le premier pays à proposer des approbations conditionnelles en 2001, mais pas spécifiquement pour les thérapies innovantes. La Food and Drug Administration de Corée (KFDA) a autorisé 18 produits cellulaires depuis 2001 et la plupart d'entre eux conditionnellement. Le Japon a été le deuxième pays à adopter une législation d'approbation conditionnelle avec la loi de 2013 sur les produits pharmaceutiques, médicaux et autres produits thérapeutiques (PMDA). Grâce au système japonais, des médicaments dont l'innocuité et l'efficacité potentielles ont été prouvées pourraient être autorisés à la suite de données d'efficacité de phase II, évitant ainsi les études de confirmation d'efficacité de phase III à grande échelle ¹³. Les promoteurs ont alors le devoir de recueillir les données sur l'efficacité des patients en post-commercialisation pour satisfaire les conditions d'approbation, dont les détails exacts et les exi-

gences varient au cas par cas. Bien que ce ne soit pas la première loi d'approbation conditionnelle en place, cette décision a suscité beaucoup d'attention et de conflits, certains commentateurs ayant critiqué le Japon pour avoir «abaissé la barre» d'approbation du marché et compromis ainsi la sécurité des patients. Cette initiative pionnière et courageuse a toutefois permis une plus grande accessibilité des MTI dans le monde notamment en Europe et aux États-Unis et l'élaboration de plusieurs programmes d'accélération de leur commercialisation.

2.5.1. Sur le marché européen

Dans la directive européenne 2001/83/CE¹, telle que mise en œuvre au niveau national, les MTI doivent être autorisés par l'EMA avant d'être commercialisés. La procédure d'autorisation centralisée est le mécanisme obligatoire pour les médicaments à usage humain y compris les MTI, à la suite de laquelle les produits sont autorisés à la vente dans tous les États membres de l'UE simultanément. La demande est évaluée par le dépôt du dossier d'AMM, un document important soumis par le développeur de la technologie, qui fournit des preuves des caractéristiques du produit, de l'utilisation prévue et du profil d'innocuité et d'efficacité démontré par un essai clinique (Figure 12). Sur présentation à l'EMA, le **comité des médicaments à usage humain** (CHMP) évalue le document par l'intermédiaire de ses groupes de travail concernés, en réalisant une analyse des risques et avantages des données présentées pour émettre un «avis scientifique». La décision du CHMP peut être positive, négative, conditionnellement positive avec obligations, ou positive dans des circonstances exceptionnelles¹⁴. L'avis scientifique du CHMP est transmis à la Commission européenne (CE), qui dispose alors de 67 jours pour examiner l'avis et délivrer une autorisation ou le rejet en conséquence. Dans le cas d'un refus d'autorisation de mise sur le marché, le retour d'information est généralement fourni au demandeur, après quoi il peut modifier et soumettre à nouveau son dossier d'AMM. Les autorisations de l'EMA prennent généralement plus de temps que la FDA en raison de la période d'arrêt au 120^{ème} jour du processus de révision, ce qui permet au demandeur de préparer des réponses aux questions soulevées par l'EMA. L'ensemble du processus d'approbation peut prendre jusqu'à 277 jours. Les AMM accordées sont valables pour 5 ans lorsqu'elles sont inconditionnelles et 1 an lorsqu'elles sont conditionnelles, après quoi elles doivent être renouvelées. L'EMA fournit des conseils détaillés sur la procédure d'AMM spécifiques aux MTI, disponibles sur son site Web (<http://www.ema.europa.eu>).

En cas d'évaluation positive, le médicament est approuvé et reçoit son « autorisation de mise sur le marché » européen. Mais cela ne veut pas encore dire que les patients ont accès à ce nouveau médicament. L'accessibilité des MTI est pourtant un enjeu majeur de commercialisation de ces thérapies innovantes. Parce que les MTI concernent souvent le traitement de maladies rares ayant un intérêt majeur et de dernier recours, l'Union Européenne a mis en place différentes voies pour faciliter un accès rapide de ces MTI aux patients malades (Figure 13).

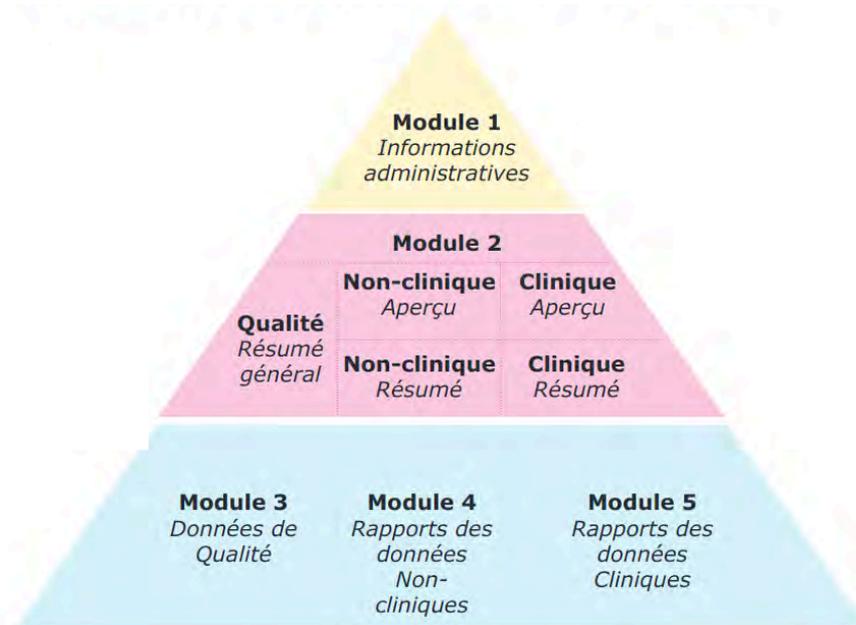


Figure 12 : Les différents modules composant le dossier d'AMM.

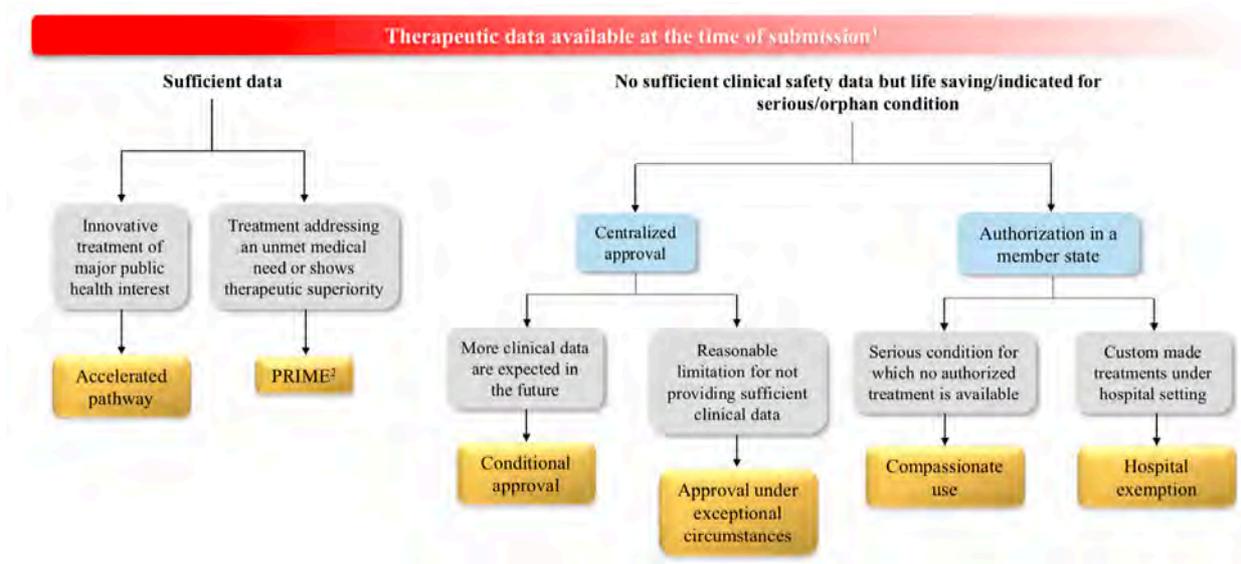


Figure 13: Schéma des différents programmes et dénominations pour la commercialisation de MTI en Europe selon le degré de données cliniques disponibles ¹⁵.

Dans le cas de données cliniques suffisantes, il est généralement octroyé une légère **réduction du temps d'évaluation par l'EMA** de 210 jours à 150 jours pour l'obtention de l'AMM si le MTI présente un intérêt majeur en terme de santé publique. Récemment le CHMP en concordance avec l'EMA a développé un outil d'évaluation autonome appelé **PRIME** pour « PRIORITY MEDICINE » (ou médicament prioritaire) pour les MTI montrant une supériorité thérapeutique ou répondant à un besoin médical fort. Le schéma des PRIME favorise par exemple un dialogue précoce, une coordination, et des conseils des

autorités de réglementation sur le programme de développement et peut initier la procédure d'évaluation accélérée au moment de l'AMM ¹⁶. Il existe actuellement en Europe 12 MTI ayant suivi ce schéma de développement (Tableau 4).

Tableau 4 : Liste des médicaments développés à l'aide du schéma PRIME en mai 2018 ¹⁵.

Nom	Description	Aire thérapeutique	Indication	Compagnie
SPK-9001	Vecteur viral adéno-associé contenant un variant du gène du facteur IX	Hématologie	Hémophilie B	Spark Therapeutics
AMT-060	Vecteur viral adéno-associé sérotype 5 contenant le gène du facteur IX humain	Hématologie	Hémophilie B	uniQure
BMN 270	Vecteur viral adéno-associé sérotype 5 contenant un variant supprimé du domaine B du gène du facteur VIII de la coagulation humaine	Hématologie	Hémophilie A	BioMarin
ATA129	Lymphocytes T allogéniques cytotoxiques spécifiques du virus d'Epstein-Barr	Hématologie	Infection par le virus d'Epstein-Barr en post-transplantation réfractaire au rituximab	Atara Biotherapeutics
Lentiglobin	Cellules souches hématopoïétiques CD34+ autologues transduites avec un vecteur lentiviral codant pour le gène humain de la globine β A-T87Q	Hématologie	Béta-thalassémie majeure	Bluebird Bio
AVXS-101	Vecteur viral adéno-associé sérotype 9 contenant le gène SMN humain	Neurologie	Atrophie musculaire spinale de type 1 (Pédiatrie)	AveXis
DNX-2401	Adénovirus de sérotype 5 contenant une délétion partielle du E1A et un domaine de liaison à l'intégrine	Oncologie	Glioblastome récurrent	DNatrix Therapeutics
NY-ESO-1c259T	Cellules T (CD4+/CD8+) autologues transduites avec un vecteur lentiviral codant pour un récepteur antigénique chimérique dirigé contre l'antigène tumoral NY-ESO-1	Oncologie	Sarcome synovial inopérable ou métastatique exprimant l'antigène tumoral NY-ESO-1	Adaptimmune
JCAR017	Cellules T (CD4+/CD8+) autologues transduites avec un vecteur gammarétroviral codant pour un récepteur antigénique chimérique anti-CD19	Oncologie	Lymphome diffus à grandes cellules B réfractaire	Juno Therapeutics
CTL019	Cellules T autologues transduites avec un vecteur lentiviral codant pour un récepteur antigénique chimérique anti-CD19	Oncologie	Leucémie lymphoblastique aiguë à cellules B rechute/réfractaire (Pédiatrie)	Novartis
KTE-C19	Cellules T autologues transduites avec un vecteur rétroviral codant pour un récepteur antigénique chimérique anti-CD19 CD28 / CD3-zéta.	Oncologie	Lymphome diffus à grandes cellules B rechute/réfractaire	Kite Pharma
A002	Vecteur viral associé à un adénovirus de sérotype 8 contenant le gène humain CNGB3	Ophthalmologie	Achromatopsie associée à des anomalies du CNGB3	MeiraGTx
Date de la recherche : 21 mai 2018	Source : http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000660.jsp			

Dans le cas de données cliniques insuffisantes, les MTI peuvent tout de même être accessibles pour des patients dans des cas de pathologies particulièrement graves, et/ou de maladies orphelines. Pour répondre à ces besoins, l'autorisation peut premièrement être donnée par un état membre, c'est le cas des **utilisations compassionnelles** si aucun autre traitement n'est disponible, et des **exemptions hospitalières** (MTI-PP) dans un hôpital donné pour un patient donné. Deuxièmement, il existe des autorisations centralisées (européennes) pour une **approbation conditionnelle** valable 1 an et renouvelable selon de nouvelles données cliniques fournies (cas de Zalmoxis® et Holoclar®), ou dans des **circonstances exceptionnelles** si la situation est impossible à gérer (ex. rareté des patients) selon une balance bénéfice / risque.

Mis à part ces autorisations, celle qui est la plus intéressante pour un fabricant de MTI est la **désignation orpheline**. Un produit orphelin bénéficie de plusieurs avantages notamment financiers pour la commercialisation (ex. réduction de frais administratifs), d'une assistance procédurale, de conseils scientifiques et d'une exclusivité commerciale de 10 ans pour chaque indication. Quatre des six MTI du marché sur le marché Européen répondent actuellement à cette désignation orpheline : Alofisel®, Holoclar®, Strimvelis®, et Zalmoxis® (Tableau 5).

Tableau 5 : Désignation des MTI commercialisés sur le marché Européen

Source : EMA

Nom	Suivi additionnel	Désignation orpheline	Approbation conditionnelle	Circonstances exceptionnelles
Alofisel®	Oui	Oui	Non	Non
Holoclar®	Oui	Oui	Oui	Non
Strimvelis®	Oui	Oui	Non	Non
Zalmoxis®	Oui	Oui	Oui	Non
Imlygic®	Oui	Non	Non	Non
Spherox®	Non	Non	Non	Non

En France, il existe également l'Autorisation Temporaire d'Utilisation (ATU) qui permet d'utiliser un médicament qui ne dispose pas d'une AMM française ou européenne, afin de traiter des maladies graves ou rares qui ne disposent pas de traitement adéquat (Tableau 6). Cette désignation n'est pas très utilisée pour les MTI mais dans le cas de MTI expérimentaux français pourrait être pertinente avant le dépôt d'AMM européenne.

Tableau 6 : Accès rapides au marché Européen ¹⁵

Options d'accès rapide	Description / Critère d'Eligibilité
Evaluation accélérée	Offre un temps d'évaluation réduit par le CHMP / CAT pour les médicaments innovants susceptibles d'avoir un intérêt majeur pour la santé publique. Le temps d'évaluation est réduit de 210 jours à 150 jours.
PRIME	Les médicaments permettant de traiter des affections dépourvues d'options thérapeutiques disponibles ou de médicaments présentant une supériorité thérapeutique sur les traitements actuels pour une indication spécifique sont désignés Médicaments Prioritaires (PRIME). Ces PRIME bénéficient des premiers avis scientifiques et d'une évaluation accélérée, visant à traiter les patients au plus tôt.
Utilisation compassionnelle	Les États membres peuvent autoriser l'utilisation de médicaments non autorisés pour traiter des patients présentant un pronostic vital grave, durable ou gravement handicapant de maladies pour lesquelles aucun médicament actuellement autorisé n'est disponible. Ce n'est pas une approbation centralisée, mais l'EMA peut fournir des recommandations aux autorités nationales concernant l'utilisation compassionnelle de certaines thérapies lorsqu'elles sont demandées.
Désignation orpheline	Une dénomination accordée aux médicaments destinés à être utilisés pour le traitement de maladies rares où la prévalence de l'UE n'est pas plus de 5 sur 10 000, ou lorsqu'il est peu probable que la commercialisation du produit génère des rendements suffisants pour justifier un investissement nécessaire à son développement. Un produit désigné orphelin bénéficie d'un conseil scientifique, d'une assistance procédurale, d'une réduction des frais administratifs et d'une exclusivité commerciale de 10 ans pour chaque indication, qui peut être prolongée de 2 années supplémentaires après l'obtention d'un plan d'investigation pédiatrique (PIP).
Exemption hospitalière	Une autorisation qui peut être accordée par les Etats membres de l'UE pour des MTI non autorisés à utiliser sur une base de patient nommé dans un hôpital l'établissement dans le même État membre seulement et sous la responsabilité exclusive du médecin traitant.
Approbation conditionnelle	Autorisation de mise sur le marché de médicaments répondant à des besoins médicaux non satisfaits sur la base de données de sécurité et d'efficacité moins complètes que normalement requis. L'autorisation est valable pour 1 an et peut être renouvelée sur la base des nouvelles données cliniques fournies.
Circonstances exceptionnelles	Autorisation de mise sur le marché du médicament en l'absence de données complètes sur l'innocuité et l'efficacité fondées sur des circonstances impossibles à gérer, par exemple, la rareté des patients. Cette autorisation est revue annuellement par un rapport bénéfice / risque.
ATU (France uniquement)	Autorisation temporaire d'utilisation d'un médicament qui ne dispose pas d'une AMM française ou européenne, afin de traiter des maladies graves ou rares qui ne disposent pas de traitement adéquat. L'ATU peut être accordée pour un patient particulier (AMM nominative), ou pour un groupe de patients (AMM de cohorte). La firme pharmaceutique doit justifier l'efficacité présumée du médicament dont l'évaluation est insuffisante, et s'engager à déposer une AMM dans un délai fixé.

2.5.2. Sur le marché américain

La FDA réglemente tous les tests, la fabrication et la commercialisation des MTI dénommés ATMP destinés à traiter les maladies humaines en vertu de la loi « Food and Drug Act » (FDCA). Les produits biologiques sont également régis par la loi sur les services de santé publique. En ce qui concerne les techniques de fabrication, l'application prévue et le mode d'action principal, les tissus humains et les produits cellulaires peuvent également correspondre à la définition d'un dispositif médical, d'un médicament ou d'un produit/dispositif biologique.

Les produits biologiques sont autorisés à la commercialisation sur la base de la présentation d'un « **Biologics License Application** » ou BLA, un dossier compilant toutes les données cliniques générées, similaire à l'AMM de l'EMA. La plupart des thérapies de pointe sont également classées comme médicaments, selon la définition du 21 U.S.C. § 321 (g) (1): « a) les articles destinés au diagnostic, à la guérison, à l'atténuation, au traitement ou à la prévention de la maladie et (b) les articles (autres que alimentaires) destinés à affecter la structure ou toute fonction du corps humain [...] ». Ces dernières nécessitent en amont le dépôt d'une demande de « **Investigational New Drug** » (IND) avant l'initiation de l'essai clinique et la fabrication subséquente du médicament conformément aux pratiques BPF (GMP pour « Good Manufacturing Practices »).

La désignation accélérée « **Fast-Track** » offre des réunions de soutien avec la FDA en préparation pour le dépôt d'IND. Ce chemin est conçu pour discuter de la conception d'essais cliniques de phase I et de phase II, des préoccupations dose-réponse, de l'utilisation de biomarqueurs, etc. Ce programme est conçu pour soutenir et accélérer le développement clinique pour des thérapies prometteuses. À ce jour, la majorité des thérapies innovantes utilisant la désignation « Fast Track » sont des thérapies géniques.

Depuis l'apparition des MTI dans la législation américaine, il existe une autre voie de commercialisation suivant le type de MTI (Tableau 7). En juillet 2012, la loi de la sécurité et de l'innovation de la FDA est signée et prévoit un chemin particulier pour les médicaments révolutionnaires dénommés « **Breakthrough therapies** » bénéficiant d'une accélération de l'évaluation du BLA par la FDA en 60 jours ou moins. Cette mise sur le marché est basée sur des preuves cliniques préliminaires d'innocuité et d'efficacité, avec un «examen continu» pour confirmer les données d'efficacité prévues. La FDA offre également un soutien dans la conception de tout essai clinique supplémentaire nécessaire. Il est à noter que la soumission d'une BLA est bien plus rapide que son alter-ego (AMM) en Europe. Le programme est largement utilisé par les développeurs de MTI, car il permet des ventes anticipées.

La procédure d'approbation accélérée « **Accelerated Approval** » est conçue spécifiquement pour répondre à des besoins non satisfaits graves ou potentiellement mortels et est comparable au mécanisme d'**approbation conditionnelle** de l'EMA. La voie d'approbation accélérée est utilisée principalement dans les milieux où l'évolution de la maladie est longue et où une longue période de temps serait nécessaire pour mesurer le bénéfice clinique attendu d'un médicament. Les thérapies dans le cadre de ce programme sont sujettes à des essais de confirmation post-autorisation pour vérifier et décrire plus en détail les avantages cliniques anticipés du médicament, tel que spécifié à l'article 506 (c) (2) (A) de la FDCA. Le programme est similaire à celui des « Breakthrough therapies », mais se réfère spécifiquement au statut légal de l'autorisation de mise sur le marché, et tient compte des données cliniques prédictives et substitutives.

Drug development in the fast lane: FDA approaches to expedited approval.

	Fast track	Accelerated approval	Priority review	Breakthrough therapy
Eligibility	A drug that treats a serious condition and for which nonclinical or clinical data demonstrate the potential to address an unmet medical need.	A drug that treats a serious condition, provides meaningful therapeutic benefit over available therapies and demonstrates an effect on a surrogate endpoint that is reasonably likely to predict clinical benefit.	A drug that offers major advances in treatment over existing therapies or provides a treatment where no adequate therapy exists.	A drug that treats a serious condition and for which preliminary clinical evidence indicates that the drug may demonstrate substantial improvement over available therapies.
Designation	Can be requested at any time; FDA has 60 days to respond.	No formal process.	Requested at time of new drug or biologic application submission; FDA has 45 days to respond.	Can be requested at any time after investigational new drug application; FDA has 60 days to respond.
Clinical development	Earlier and more frequent communication.	Conditional approval granted using surrogate endpoint(s) from phase 2 trials or interim phase 3 data; confirmatory trials with hard clinical endpoints required.	Standard.	Abbreviated or condensed development, with earlier and more frequent communication and delegation of senior reviewers and a cross-disciplinary review team.
Review process	Option for rolling data submission; standard review after last data submitted.	Data submitted in one package; standard ten-month review.	Data submitted in one package; review time shortened to six months.	Data submitted as they are accumulated; review time shortened.
Established	1988	1992	1992	2012

Tableau 7 : Résumé des programmes de développement des thérapies innovantes américaines

Source : FDA

Malgré le nombre important d'essais cliniques dans le monde, encore très peu de MTI arrivent jusqu'à la commercialisation. A l'heure actuelle, on dénombre en Europe seulement six MTI commercialisés en 2018. Néanmoins depuis 2009, au total dix MTI ont été approuvés par l'EMA ([Annexe](#)). Parmi les quatre MTI les plus commercialisés, deux ont été retirés : Provenge® en mai 2015 sur demande de l'exploitant, et Chondrocelect® en juillet 2016 pour des raisons commerciales. Maci® a été suspendu et enfin Gybera® a été arrêté en 2017 par manque de patients. Aux Etats-Unis, le nombre d'ATMP n'est pas beaucoup plus élevé mais la FDA a récemment approuvé plusieurs médicaments de thérapie génique prometteurs (Kymriah®, Yescarta®, Luxturna®).

CHAPITRE II : CONTRIBUTIONS TECHNOLOGIQUES À L'AVÈNEMENT DES MTI

Parmi les nombreuses technologies et typologies de cellules permettant de générer des MTI, il est important de considérer certaines d'entre elles qui ont marqué depuis un certain nombre d'années la recherche en médecine régénératrice et en cancérologie. Nous évoquons bien ici la thérapie cellulaire à base de cellules souches, l'ingénierie tissulaire, l'immunothérapie, ainsi que la thérapie génique et les nouvelles techniques prometteuses d'édition du génome.

1. Thérapie cellulaire

La thérapie cellulaire consiste à transfuser ou transplanter des cellules humaines afin de régénérer la fonction d'un organe ou de lutter contre une pathologie. Il existe deux types de thérapies cellulaires : **l'autologue et l'allogénique**. En thérapie autologue, le donneur est la même personne que le receveur contrairement à la thérapie allogénique, où le donneur est différent du receveur. Le risque principal des thérapies allogéniques est le rejet immunologique. Ceci s'explique par l'interaction des cellules du donneur avec les cellules du système immunitaire du receveur. En effet, les cellules immunitaires du receveur que sont les lymphocytes T (LT), les lymphocytes B (LB) et les cellules NK s'activent. La force de cette réponse immunitaire dépend du degré de différence entre les antigènes du donneur (« non-soi ») et du receveur (« soi »).

Les antigènes impliqués dans ces mécanismes appartiennent à une famille de protéines connue sous le nom de **complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)** ¹⁷.

- Les molécules du **CMH de classe I** se trouvent à la surface de presque toutes les cellules humaines (à l'exception des globules rouges). Elles présentent des peptides spécifiques à la cellule et sont reconnues par les récepteurs des lymphocytes T (TCR) exprimés sur les lymphocytes T cytotoxiques (CTL) CD8 +. La reconnaissance par le TCR des molécules du CMH de classe I sur une cellule entraîne la destruction de la cellule par les lymphocytes T CD8 + ou cellules NK. Ce mécanisme de défense est mis en place pour lutter contre des pathogènes infectieux.

- Les molécules de **CMH de classe II** sont exprimées uniquement par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA), telles que les cellules dendritiques, les macrophages et les cellules B. La présentation de l'antigène du « non-soi » sur les molécules du CMH de classe II conduit à l'activation des cellules auxiliaires T CD4 +.

Dans le cas d'une greffe d'organe solide, les cellules du receveur peuvent attaquer les cellules du donneur si le receveur n'est pas compatible ou s'il n'est pas suffisamment immunodéprimé. Dans le

cas d'une greffe de moelle osseuse, le rejet immunologique des cellules peut entraîner la survenue de la **maladie du greffon contre l'hôte** (GvHD) si le receveur est immunodéprimé et que les cellules du donneur immunocompétentes s'attaquent à l'organisme du receveur (peau, foie, intestin).

Dans le cas des MTI, la probabilité de rencontrer ces barrières immunologiques dépend du type des cellules et des tissus utilisés en médecine régénérative (Figure 14). Les cellules allogéniques de tout type sont à plus haut risque de rejet et nécessitent d'induire une tolérance avant l'administration. La source du tissu est également importante, car il est plus facile d'induire la tolérance vis-à-vis de certains tissus allogéniques (par exemple, le foie) par rapport à d'autres (par exemple, la peau). De même, les cellules autologues peuvent être immunogènes si elles ont été génétiquement conçues pour exprimer une protéine exogène. Les cellules souches pluripotentes peuvent acquérir des caractéristiques immunogènes au cours d'une culture prolongée. Les allogreffes de tissu décellularisé utilisé comme matrice dans l'ingénierie tissulaire ne devraient pas rencontrer de barrières immunologiques substantielles, car l'immunogénicité des protéines de la matrice extra-cellulaire est généralement faible ¹⁸.

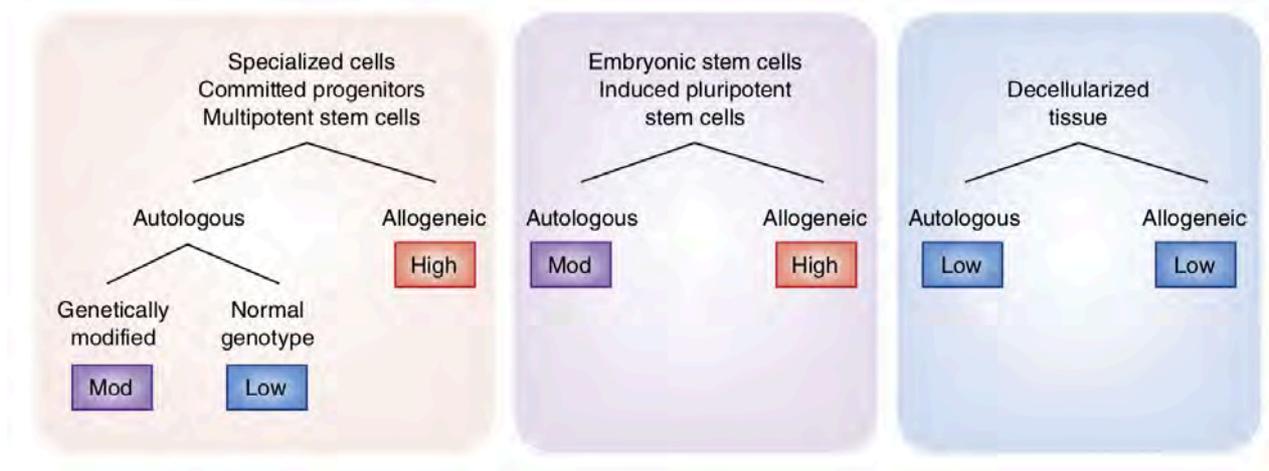


Figure 14 : Probabilité de rejet immunologique selon le type de cellule utilisée en thérapie cellulaire ¹⁸.

1.1. Utilisation de cellules souches

Les cellules souches (CS) sont des cellules immatures, douées d'auto-renouvellement et capables de générer un ou plusieurs types de cellules différenciées tout au long de la vie d'un individu. Le processus de différenciation des CS se fait par l'intermédiaire de progéniteurs déjà engagés mais qui possèdent encore une certaine capacité à proliférer. Selon un modèle hiérarchique, les capacités de prolifération et de différenciation diminuent au fur et à mesure que la cellule se différencie, mais elle acquiert alors les fonctions de l'organe en formation ou à régénérer (Figure 15).

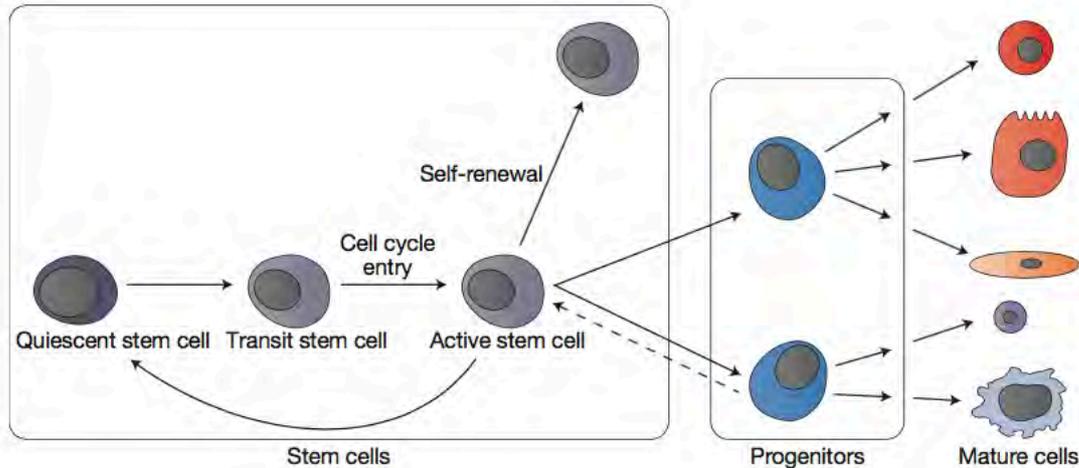


Figure 15 : Schéma cellules souches humaines ¹⁹.

L'auto-renouvellement des CS est la pierre angulaire du fonctionnement tissulaire afin de régénérer au plus vite le tissu et maintenir son homéostasie dans le temps. L'auto-renouvellement est défini par le fait qu'au moins une des cellules filles doit être identique à une CS mère après division. Si les 2 cellules filles sont identiques à la CS mère, il y a eu division symétrique. Par contre, s'il n'y a qu'une seule cellule fille qui se différencie, il y a eu division asymétrique (Figure 16).

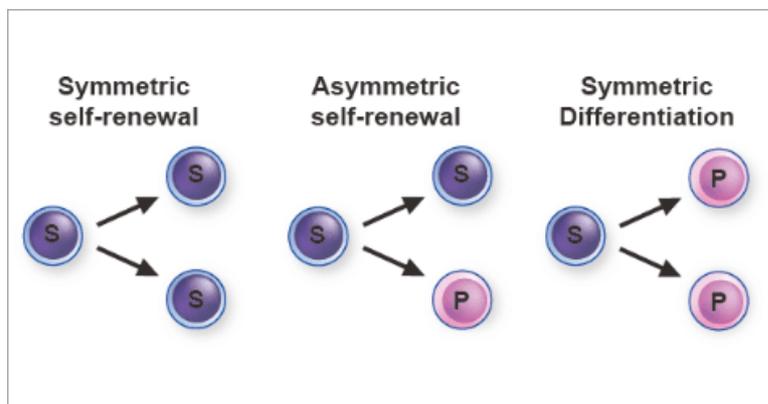


Figure 16 : Schéma de la division cellulaire.

Source : Laboratory of Developmental Stem Cell Biology

L'auto-renouvellement des CS est dépendant du type de CS et donc du tissu dans lequel elles résident. En effet, une CS hématopoïétique (CSH) n'a pas la même fréquence d'auto-renouvellement qu'une CS de villosité intestinale (ex. cellules LG5R+). Cette capacité à s'auto-renouveler n'est pas forcément constante dans le temps, on l'observe principalement lors de perturbations du tissu comme par exemple la dégénérescence tissulaire suite à une lésion, le vieillissement ou encore des phénomènes de mutation maligne (tumeurs).

Il existe plusieurs types de CS : totipotente, pluripotente, multipotente, unipotente. Parmi les familles de CS, la communauté scientifique s'est particulièrement intéressée aux cellules souches de type embryonnaire et aux cellules souches adultes ²⁰ que nous détaillerons.

1.1.1. La cellule souche totipotente

Si l'on récapitule le développement physiologique d'un individu (Figure 17), nous provenons tous d'une CS totipotente appelé zygote (oeuf), stade initial de l'embryon, résultant de la fusion de deux gamètes haploïdes (ex. ovocyte et spermatozoïde). Cette cellule est donc capable de donner tous les tissus constituant un individu ainsi que les tissus annexes (ex. placenta, membrane amniotique).

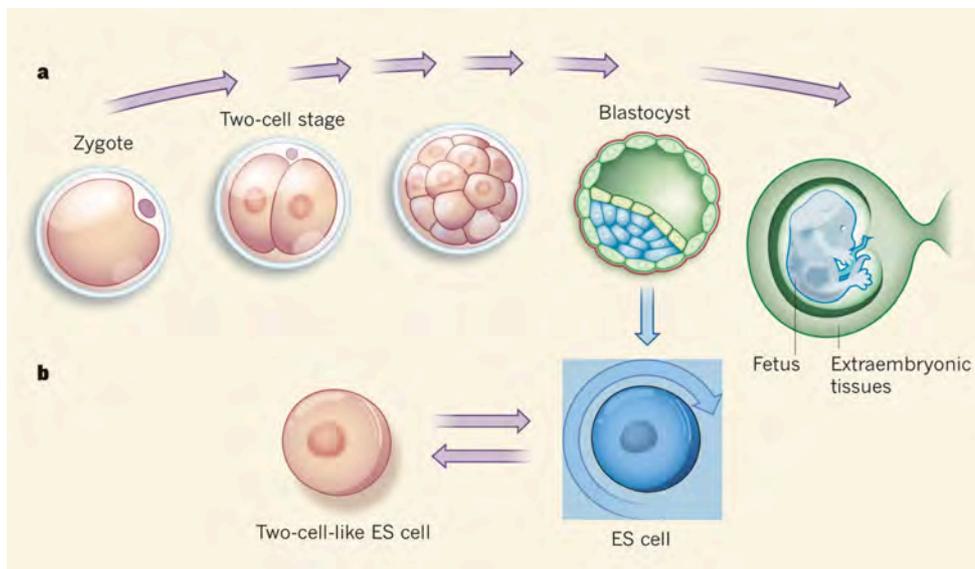


Figure 17 : Les étapes de l'embryogenèse ²¹.

En France, l'utilisation en recherche ou en clinique de ces cellules très protégées est régie par la loi de la bioéthique de 1994 (révisée en 2004, 2011, 2013 et 2018).

1.1.2. Les cellules souches pluripotentes

- **Les cellules souches embryonnaires**

Pendant le développement embryonnaire, les cellules vont conserver leur aptitude à se différencier en de multiples types cellulaires. Ainsi, les cellules souches embryonnaires (CSE) isolées de la masse cellulaire interne du blastocyste au stade 16-40 cellules font également partie des rares cellules pluripotentes. Ces cellules ont pour avantage d'être utilisables en grand nombre pour la recherche puisqu'il est possible de les amplifier *in vitro* par clonage sur une couche de cellules stromales dans des conditions de culture appropriées ^{22, 23}. Ces conditions garantissent la conservation de tout leur potentiel souche. Dès lors, les scientifiques ont pu engager ces CSE dans différentes voies de différenciation, par l'intermédiaire d'inducteurs spécifiques tels que le Fibroblast Growth Factor (FGF), le Neural Growth Factor (NGF) ou encore l'Hepatocyte Growth Factor (HGF).

L'application clinique étant alors évidente en termes de médecine régénérative et de compréhension physiologique du développement et comportement tissulaires. Ce sont étymologiquement de vraies CS puisque leur caractère souche a été vérifié *in vivo* au niveau clonal par des expériences chez le mammifère de reconstitution d'un être entier à partir d'une seule cellule. Cependant les CSE humaines n'ont pu être testées dans ces conditions pour des raisons éthiques évidentes ²⁴. Les CSE sont caractérisées par de hauts niveaux d'expression de certains facteurs de pluripotence tel que OCT-4, SOX-2 et NANOG ²⁵ ²⁶.

Depuis le 6 août 2013, la loi n°2013-715 a modifié la loi n°2011-814 du 7 juillet 2011 relative à la bioéthique en autorisant sous certaines conditions la recherche sur l'embryon et les CSE après consentement écrit libre et éclairé des deux parents. En effet, l'autorisation délivrée par l'Agence de la BioMédecine (ABM) et l'autorisation ministérielle nominative sont octroyées sous réserve de différents critères énoncés dans l'article suivant :

« Art. L. 2151-5.-I. – Aucune recherche sur l'embryon humain ni sur les cellules souches embryonnaires ne peut être entreprise sans autorisation. Un protocole de recherche conduit sur un embryon humain ou sur des cellules souches embryonnaires issues d'un embryon humain ne peut être autorisé que si :

« 1° La pertinence scientifique de la recherche est établie ;

« 2° La recherche, fondamentale ou appliquée, s'inscrit dans une finalité médicale ;

« 3° En l'état des connaissances scientifiques, cette recherche ne peut être menée sans recourir à ces embryons ou ces cellules souches embryonnaires ;

« 4° Le projet et les conditions de mise en œuvre du protocole respectent les principes éthiques relatifs à la recherche sur l'embryon et les cellules souches embryonnaires.

Les contraintes imposées par ce type de thérapies ont conduit à un faible nombre d'essais cliniques. On peut citer cependant le 1^{er} essai à base de CSE humaines en 2009 élaboré par Geron Corporation (Etats-Unis), afin de gérer des oligodendrocytes à ré-injecter dans le cas de traumatismes de la moelle épinière ²⁷. Cet essai fut arrêté en 2011 à la suite de la phase I ayant inclus 10 personnes à cause du manque d'efficacité clinique observée, malgré l'absence d'effets indésirables graves ²⁸.

En 2010, Advanced Cell Technology lance un essai clinique sur l'injection intra-oculaire de cellules épithéliales pigmentées rétiniennes (RPE) dérivées de CSE. Au cours de l'essai de phase I, la vision des patients n'a pas empiré et aucun effet secondaire négatif n'a été signalé. D'après les communiqués, la correction de l'acuité visuelle dans la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et la maladie de Stargardt semble prometteuse ²⁹.

En résumé, les CSE sont capable de s'auto-renouveler indéfiniment et de se différencier dans tous les types de cellules du corps humain. Elles présentent donc un grand potentiel pour la thérapie cellulaire des maladies incurables telles que les maladies dégénératives neuronales, l'insuffisance cardiaque et la dégénérescence maculaire. Ce potentiel est encore renforcé par les données prometteuses sur l'innocuité et l'efficacité des essais cliniques en cours sur le traitement de la dégénérescence maculaire à base de CSE ³⁰. Cependant, un des principaux défis pour l'application clinique de la thérapie à base de CSE est le rejet immunitaire allogénique par le receveur des cellules dérivées du CSE du donneur. La génération récente de **cellules souches pluripotentes induites** (iPSC) autologues par reprogrammation nucléaire des cellules somatiques du patient peut permettre que des cellules autologues dérivées d'iPSC puissent être transplantées chez les patients sans le risque de rejet immunitaire ³¹.

• **Les cellules pluripotentes induites**

Prix Nobel de médecine en 2012, Shinya Yamanaka découvre que l'expression forcée de seulement 4 facteurs de transcription (OCT-4, SOX-2, C-MYC et KLF4) est capable de reprogrammer des cellules murines somatiques en cellules pluripotentes ³² (Figure 18).

- Octamer-binding transcription factor 4 (OCT-4), intervient lors du passage de la morula au blastocyste ³³.
- SRY-box 2 (SOX-2) joue un rôle important dans la pluripotence et la capacité d'auto-renouvellement des cellules embryonnaires ³⁴.
- Krüppel-like factor 4 (KLF4) peut activer ou réprimer la transcription.
- C-MYC est un oncogène exprimé dans les cellules à forte activité proliférative.

Ces cellules génétiquement modifiées sont alors appelées cellules souches pluripotentes induites (iPSC).

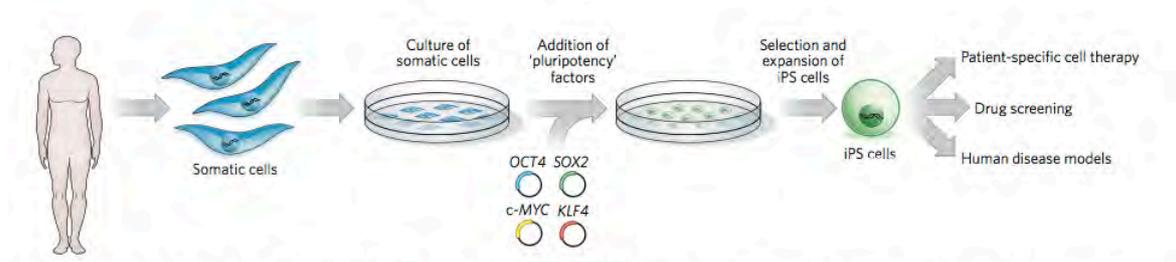


Figure 18 : Génération d'iPSC ³⁵.

Un an seulement après ce succès, cette même équipe réalise une reprogrammation de fibroblastes humains adultes à l'aide des mêmes facteurs ³⁶. En 2007, l'équipe américaine de Thomson J.A. ³⁷, travaillant également sur des fibroblastes humains choisit d'autres facteurs pour réaliser la reprogrammation, OCT-4, SOX-2 et deux autres que sont :

- NANOG, intervient également dans le maintien des propriétés d'auto-renouvellement et de pluripotence des cellules embryonnaires ³⁸.

- LIN 28, exprimé au début de l'embryogenèse et fonctionnant comme stimulant de la différenciation cellulaire ³⁹.

D'autres gènes ont également été utilisés par d'autres équipes pour réaliser des cellules pluri-potentes induites (Klf5, Klf2, n-Myc, Esrrb...). Plusieurs combinaisons de ces gènes ont été étudiées afin d'évaluer l'efficacité de reprogrammation des cellules adultes ⁴⁰.

Tout comme les CSE, les iPSC ont un fort intérêt en médecine régénérative mais une complexité de mise en place plus importante. De telles lignées cellulaires peuvent proliférer indéfiniment en culture, et en mimant la physiologie du développement, les iPSC peuvent théoriquement se différencier en tous les types cellulaires (érythrocytes, plaquettes, etc.) ⁴¹.

Un essai clinique est actuellement en cours au Japon (Riken Center for Developmental Biology) utilisant un épithélium pigmentaire rétinien (RPE) dérivé d'iPSC autologues où un patient a été traité en 2015 **{Mandai:2017b}**. Cet essai fut suspendu après que des mutations dans les lignées d'iPSC utilisées soient identifiées. Un an après l'arrêt de cet essai, l'étude a redémarré sous une nouvelle forme en partenariat avec l'université d'Osaka et l'hôpital de Kobe en utilisant cette fois-ci des iPSC d'une banque en parallèle de celles du patient (afin d'augmenter les contrôles qualité en amont et de diminuer le coût de production).

La 2^{ème} application clinique des iPSC vient d'être autorisée au Japon (16 mai 2018) et il s'agit de différencier les iPSC en cellules cardiaques afin de créer un patch (de 100 millions de cellules) que les chirurgiens vont greffer sur la zone lésée du cœur. Ce patch permettrait de libérer les facteurs de croissance adéquats pour la régénération en cas de maladie cardiaque (médicament d'ingénierie tissulaire). Cette étude serait "Une manière très élégante et intelligente de délivrer des cellules" selon Philippe Menasché, chirurgien cardiaque et spécialiste français à l'Hôpital Georges Pompidou de Paris. Cependant l'instabilité génétique des iPSC ainsi que les limites dues à leur délai d'obtention (environ 7 mois pour obtenir un clone) en font des thérapies assez compliquées à entreprendre en 2018.

1.1.3. Les cellules souches adultes multipotentes

Les cellules souches adultes (CSA) sont des cellules rares présentes chez l'adulte dans de nombreux tissus, au sein d'un microenvironnement particulier ou niche ⁴². Elles constituent de ce fait un réservoir de cellules régénératives nécessaires au renouvellement physiologique des cellules matures ou après lésion pathologique ([Figure 19](#)). Au niveau expérimental, la preuve formelle du caractère souche des CSA est la capacité en post-lésion à régénérer structurellement et fonctionnellement à long terme l'organe dont elles dérivent.

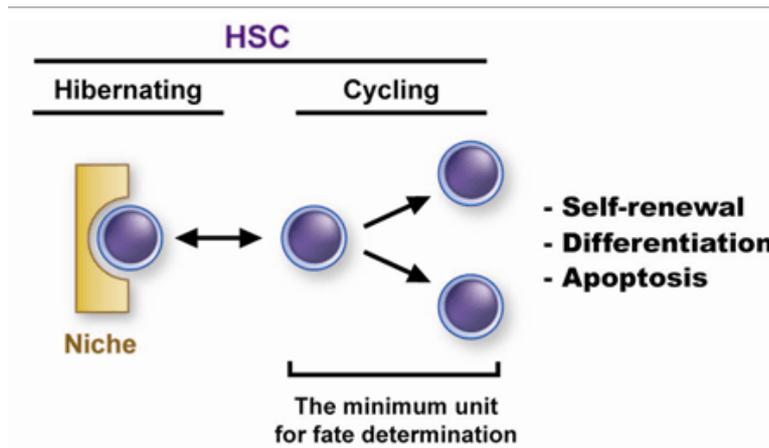


Figure 19 : Le microenvironnement (niche) détermine le devenir des CSH.

Source : © Laboratory of Developmental Stem Cell Biology

Ces CSA sont particulièrement présentes dans la moelle osseuse, le foie, les muscles squelettiques, le coeur, les glandes mammaires, la peau, l'intestin et le système nerveux central. Contrairement aux CSE et iPSC, les CSA sont moins immatures. Elles ne génèrent que les tissus dont elles sont originaires et peuvent posséder des caractéristiques qui leur sont propres ; ceci explique au niveau fondamental les lacunes actuelles en termes d'identification précise de ces CSA. En effet, il faut trouver des marqueurs cellulaires spécifiques permettant de les localiser *in situ*, de les suivre au cours du développement ou après une lésion, et ainsi de pouvoir tracer leur descendance dans le temps. Des modèles animaux génétiquement modifiés tels le zebrafish, l'embryon de poulet ou la souris sont très utilisés pour découvrir de nouveaux bio-marqueurs.

Nous détaillerons spécifiquement deux CSA différentes au sein de la moelle osseuse parmi les plus utilisées en thérapie cellulaire ; ainsi nous évoquerons la cellule souche hématopoïétique (CSH) et la cellule souche mésenchymateuse (CSM) dont les perspectives et les attentes en médecine régénérative sont immenses.

- **Les cellules souches hématopoïétiques**

Historiquement, les CSH de la moelle osseuse sont les CSA les plus étudiées et décrites dans de nombreux modèles. Les CSH sont multipotentes, à l'origine de toutes les cellules constituant le système sanguin (Figure 20) : érythrocytes, lymphocytes T/B, macrophages, etc. D'une manière générale, l'hématopoïèse est un processus hiérarchique avec pour origine la CSH qui se différenciera en progéniteurs myéloïdes ou lymphoïdes qui eux-mêmes se différencieront en cellules sanguines spécialisées ⁴³.

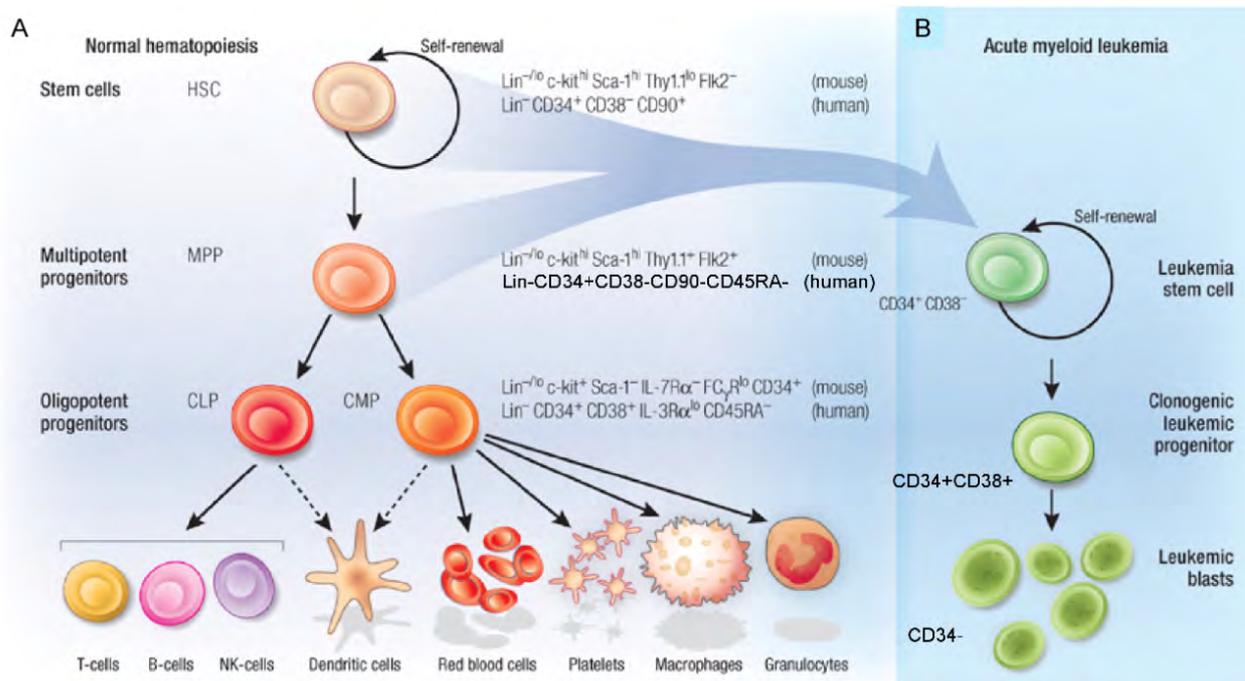


Figure 20 : L'hématopoïèse - Hiérarchie des cellules sanguines normale et pathologique (leucémie myéloïde chronique)

Source : © Stanford Medicine Majeti Lab

Au niveau clinique la CSH (greffe) n'est pas considérée comme un MTI mais comme un produit de thérapie cellulaire puisque ces cellules ne subissent pas de modifications substantielles et sont utilisées pour la même fonction essentielle entre donneur et receveur, à savoir la reconstitution hématopoïétique. La greffe allogénique (ou allogreffe) de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est une thérapeutique validée, qui permet chaque année à un nombre croissant de patients souffrant de maladies graves du sang, de bénéficier d'un greffon de CSH issu d'un don. Le donneur est soit membre de la famille (donneur apparenté), soit non apparenté si le patient n'a pas de donneur HLA (CMH chez l'Homme) compatible dans sa famille. Les sources des greffons sont triples. Les CSH sont prélevées :

- directement en intra-osseux dans la moelle osseuse en vue d'une greffe ;
- dans le sang périphérique en vue d'une greffe, après mobilisation des CSH de la moelle osseuse par des facteurs de croissance (G-CSF ou Plerixafor®) ;
- dans le sang placentaire du cordon ombilical après un accouchement.

En termes d'indications en 2016, la greffe de CSH traite majoritairement des hémopathies essentiellement malignes (>92%), une tumeur solide (<8%) et une maladie auto-immune (<0.3%)⁴⁴.

En dehors de la reconstitution hématopoïétique, les CSH ont été montrées comme possédant un intérêt dans le traitement de l'angor, et l'ischémie cardiaque dans des modèles murins. Immédiatement, cette observation a déclenché le lancement non seulement d'études pré-cliniques, mais étonnamment,

aussi de nombreuses études cliniques ^{45, 46}. Un débat général a alors émergé sur les cellules souches somatiques, dont les CSH, qui pourraient avoir une différenciation plus large, voire un potentiel illimité similaire aux cellules souches embryonnaires pluripotentes ⁴⁷.

L'hypothèse selon laquelle les CSA peuvent se «transdifférencier» est basé sur le concept que l'engagement des différentes lignées de cellules peut ne pas être aussi déterministe qu'on le pensait auparavant, et que certains facteurs peuvent modifier le devenir de lignées cellulaires ^{48, 49}. Cependant, l'utilisation de technologies de suivi cellulaire et moléculaire de pointe n'a pas réussi à démontrer la reproductibilité de ces observations et a sérieusement remis en question la notion de plasticité des CSA.

Contrairement à la «transdifférenciation» hypothétique, d'autres études ont révélé que la majorité des CSH transplantées étaient mortes ou déjà différenciées en cellules hématopoïétiques, dont certaines (cellules myéloïdes) pouvaient fusionner avec des cellules de type cardiomyocytes ou hépatocytes ^{50, 51}. De plus, une évaluation critique des essais cliniques chez des patients atteints de cardiopathies aiguë ou chronique a révélé que les cellules de la moelle osseuse ne greffaient pas de manière significative et ne se différenciaient pas en cardiomyocytes, engendrant un bénéfice à court terme ⁵². En prenant du recul, cet épisode appelle à une grande prudence avant de pousser les résultats de laboratoire en clinique et les décalages entre les paradigmes publiés et la réalité clinique.

Ces CSH peuvent également être génétiquement modifiées pour corriger certaines mutations comme par exemple celles retrouvées dans le déficit immunitaire combiné sévère en adénosine désaminase (SCID-ADA). Dans les années 1990, les équipes de Blaese et Fischer ont été les premières à traiter les patients atteints de SCID-ADA à l'aide d'une thérapie génique sur les cellules CD34+ ^{53, 54}. Actuellement, un MTI de thérapie génique *ex vivo* modifiant les CSH a été approuvé par l'EMA en 2016, il s'agit de Strimvelis® de GlaxoSmithKline. D'autres thérapies géniques à base de CSH sont en développement en Europe afin de lutter contre l'adrénoleucodystrophie liée au chromosome X (X-ALD) ou la bêta-thalassémie par exemple.

- **Les cellules souches mésenchymateuses**

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) également appelées cellules stromales mésenchymateuses ([Figure 21](#)), sont des cellules multipotentes résidentes dans les tissus et donnant naissance aux cellules de l'os, du cartilage, aux cellules adipocytaires, musculaires lisses ou encore à des cellules stromales supportant l'hématopoïèse ^{55 56 57}. C'est dans les années 1960-1970, qu'Alexander Friedenstein, mettant en culture de la moelle osseuse murine, décrit des cellules mésodermiques non hématopoïétiques, adhérentes au plastique et capables de développer des colonies d'aspect fibroblastique CFU-F (Colony Forming Unit Fibroblasts). Ces CSM encore appelées cellules souches du tissu squelettique ⁵⁸, possèdent un grand potentiel de prolifération qui en font des cellules relativement faciles à amplifier *ex vivo*.

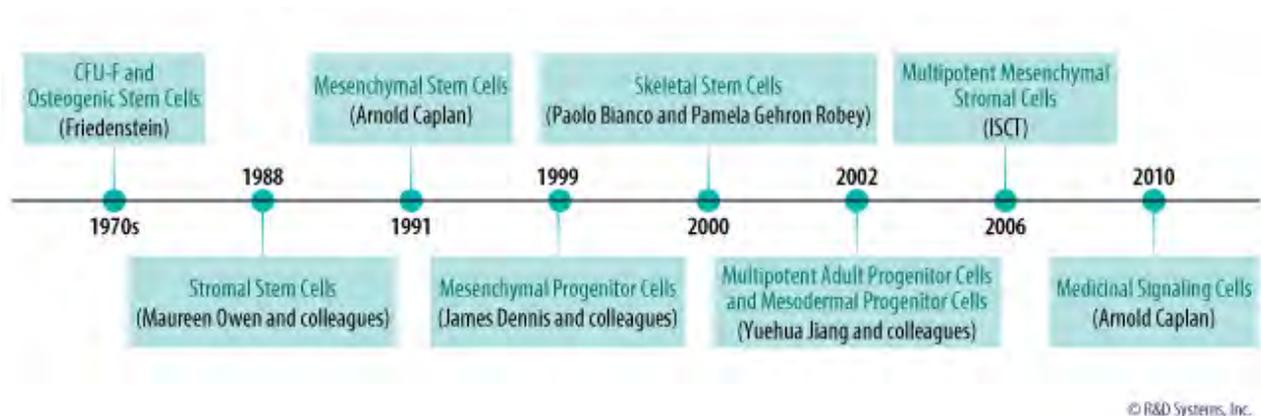


Figure 21 : Historique de dénomination des CSM.

Source : R&D systems

La première utilisation clinique de ces cellules a été de les combiner avec des biomatériaux pour réparer les fractures des os long ⁵⁹. Depuis, ces cellules ont été identifiées dans différents tissus, non seulement dans la moelle osseuse (CSM-MO), mais aussi dans la pulpe dentaire ⁶⁰, le tissu adipeux (ADSC), le cordon ombilical ⁶¹, le placenta ⁶² pour des indications thérapeutiques plus variées. L'accessibilité peu invasive du tissu adipeux comparée à celle de la moelle osseuse conduit à une utilisation clinique plus importante des ADSC ces dernières années ⁶³. Les CSM-MO restent toutefois les plus utilisées encore aujourd'hui.

Un panel d'experts internationaux ^{64,65} a voulu établir des critères de caractérisation des CSM via une liste de marqueurs membranaires, à savoir positives pour le CD90, CD73, CD105 et négatives pour les molécules hématopoïétiques à savoir le CD45, CD34, et le CMH de classe II ; et d'autre part, une capacité à se différencier *in vitro* vers les voies ostéoblastique, chondrocytaire et adipocytaire (Figure 22). Des données controversées suggèrent que les CSM pourraient également se différencier en d'autres types cellulaires. Il est important de noter que la capacité des CSM à se différencier dans ces voies n'est pas identiques selon leur origine tissulaire ⁶⁶.

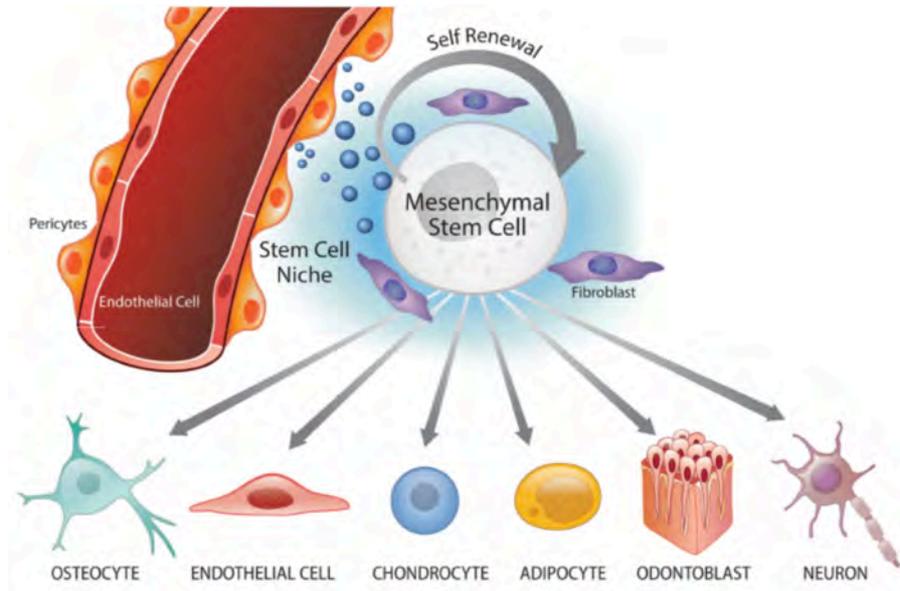


Figure 22 : Schéma des voies de différenciations des cellules stromales/souches mésenchymateuses ⁶⁷.

La capacité des CSM à se différencier *in vitro* et à favoriser la génération de tissus *in vivo* trouve de nombreuses applications cliniques en ingénierie tissulaire notamment en orthopédie ⁶⁸. En effet, le système de culture 3D peut augmenter les potentiels d'interactions cellule à cellule, tout en favorisant la formation de tissus structurés, ceux-ci étant entièrement compatibles pour la transplantation. Habituellement, les matériaux poreux bio-mimétiques ressemblant à la composition des os trabéculaires, comme l'hydroxyapatite, le phosphate β -tricalcique, ou les polymères biodégradables (acide polylactique), sont largement utilisés pour l'ingénierie des tissus squelettiques. En outre, ces matériaux facilitent l'émergence de technologies avancées de bio-impression employant des CSM. Plusieurs de ces thérapies cellulaires ont déjà été approuvées par la FDA en tant que substitut osseux (Oteocel Plus® , Trinity Evolution® , Cellentra VCBM® , Ovation®) ⁶⁹ mais encore aucune en Europe en dehors d'essais cliniques (par exemple, REBORNE, ORTHOUNION, et MAXIBONE) démontrant certains bénéfices dans la cicatrisation des fractures osseuses, l'ostéonécrose fémorale, ainsi que dans la reconstruction mandibulaire des défauts squelettiques craniofaciaux ⁷⁰.

In vivo, les CSM sont des cellules périvasculaires, de type péricytes ou adventicielles, et comme toute cellule stromale construisent le microenvironnement. C'est pourquoi elles ne répondent pas de la même manière en fonction des différents tissus et du contexte ; notamment lors d'un besoin de réparation, qui consiste à réguler le dépôt de la matrice extracellulaire, la synthèse du collagène, la prolifération des fibroblastes, l'activation des plaquettes, la fibrinolyse et l'angiogenèse, et/ou en agissant sur le processus immunitaire impliquant souvent la suppression des lymphocytes T, l'activation des macrophages et le recrutement potentiel de neutrophiles.

Le champ des CSM a rapidement évolué depuis la démonstration que les CSM amplifiées *ex vivo* montraient des propriétés immunomodulatrices. En effet, les CSM répondent activement au stress ou aux blessures, d'une manière très similaire à la façon dont les cellules du système immunitaire adaptatif et inné réagissent à l'exposition aux pathogènes ou à l'apoptose. Les CSM adaptées à la culture sécrètent des facteurs paracrines qui modulent l'inflammation (TNF α , NO etc.), stimulent la fonction des cellules T régulatrices (Treg) et la polarisation des macrophages M2 ⁷¹, tout en diminuant la fonction des cellules lymphoïdes effectrices (TGF β , IDO, PGE2 etc.).

L'effet immunosuppresseur a conduit à l'utilisation des CSM dans de nombreux essais cliniques pour le traitement de la GvHD résistante aux immunosuppresseurs, maladie qui peut apparaître après greffe de CSH allogénique, ^{72 73 74} jusqu'à la transplantation d'organes ⁷⁵ où le système immunitaire des patients doit être régulé et revenir à la normale. Plusieurs de ces thérapies ont vu le jour en clinique via l'industrie Osiris Therapeutics sous le nom de Prochymal® (Remestemcel-L) à base de CSM allogéniques contre la GvHD approuvées au Canada en 2008, puis par la FDA en 2012. JCR Pharmaceuticals Co. Ltdd, exploitant la même licence que Prochymal (Mesoblast) au Japon, lance leur première thérapie allogénique sous le nom de Temcell® HS Inj. en 2015 ⁷⁶. Les propriétés immunomodulatrices des CSM sont également utilisées dans des essais cliniques de maladies inflammatoires (ex.choc septique) ⁷⁷ et auto-immunes (ex. lupus, malade de Crohn, sclérose en plaque, sclérodermie) ⁷⁸. Actuellement, Alofisel® (darvadstrocel) utilise l'immunomodulation des ADSC pour traiter les fistules anales des à la maladie de Crohn. Alofisel®, produit par TiGenix (Belgique), est approuvé par l'EMA depuis décembre 2017, alors que ce même type de thérapie utilisant des CSM-MO en Corée du Sud a été approuvée en 2012 sous le nom de Cupistem® développée par Anterogen.

Les CSM sont également capables de produire des morphogènes et des exosomes qui favorisent l'angiogenèse (VEGF, IL-8 etc.), le remodelage (EGF, FGF2 etc.) et le recrutement cellulaire (CXCL12, SCF, IL1RA etc.). L'ensemble de ces mécanismes conduit au fort potentiel régénératif des CSM ⁷⁹. De même, les CSM peuvent également participer activement à l'activité bactéricide (IL-37). En 2011, la Corée du Sud lance la première thérapie à base de cellules souches somatiques au monde via Hearticell-gram® (FCB Pharmicell, Corée du Sud) consistant en l'injection de CSM autologues dans le myocarde directement pour traiter l'infarctus aigu du myocarde. Le but étant par des effets paracrines des CSM de moduler la réponse inflammatoire et stimuler la vascularisation et la régénération cardiaque ⁸⁰.

De nombreuses études explorent l'effet thérapeutique des CSM dans le traitement de maladies neurodégénératives, dont la sclérose latérale amyotrophique (ALS), la maladie de Huntington, la sclérose en plaques, la maladie de Parkinson et la lésion de la moelle épinière. De tels bénéfices sont supposés résulter de la production de facteurs neurotrophiques (NGF, NT-3, BDNF, CNTF, GDNF etc.). Actuellement, un essai clinique en phase 1-2 évalue la valeur thérapeutique des CSM génétiquement modifiées pour surexprimer NT-3, chez des patients atteints de ALS, et les données primaires ont révélé leur innocuité,

avec des données encourageantes concernant l'amélioration des symptômes des patients ⁸¹. De même, le transfert adoptif de CSM chez des patients atteints de sclérose en plaques (SEP) avancée est venu confirmer, stabiliser et améliorer la maladie, avec dans certains cas une récupération visuelle, attribuée à la fonction trophique des CSM ⁸². Même si d'autres utilisations thérapeutiques en médecine régénérative sont envisageables, seul le stade pré-clinique est atteint ⁸³.

Les CSM qui progressent vers l'apoptose expriment des signaux «eat-me» (de mort cellulaire programmée) tels que la phosphatidylsérine (PtS), et sont sensibles à l'efferocytose, où leur phagocytose par les macrophages conduit à l'expression de facteurs de tolérance immunitaire (Figure 23). HLA-G semble également participer à cette tolérance. Ces particularités permettent d'éviter un rejet rapide et une sensibilisation immunitaire qui en font une technologie de choix en tant que thérapie allogénique. Les CSM auraient même la capacité de réguler la mort cellulaire *in situ* via le transfert de matériel tel que les mitochondries et autres vésicules favorisant la régénération ^{84,85}. La balance entre leur viabilité et leur apoptose serait donc responsable de leurs effets biologiques *in vivo* ⁸⁶.

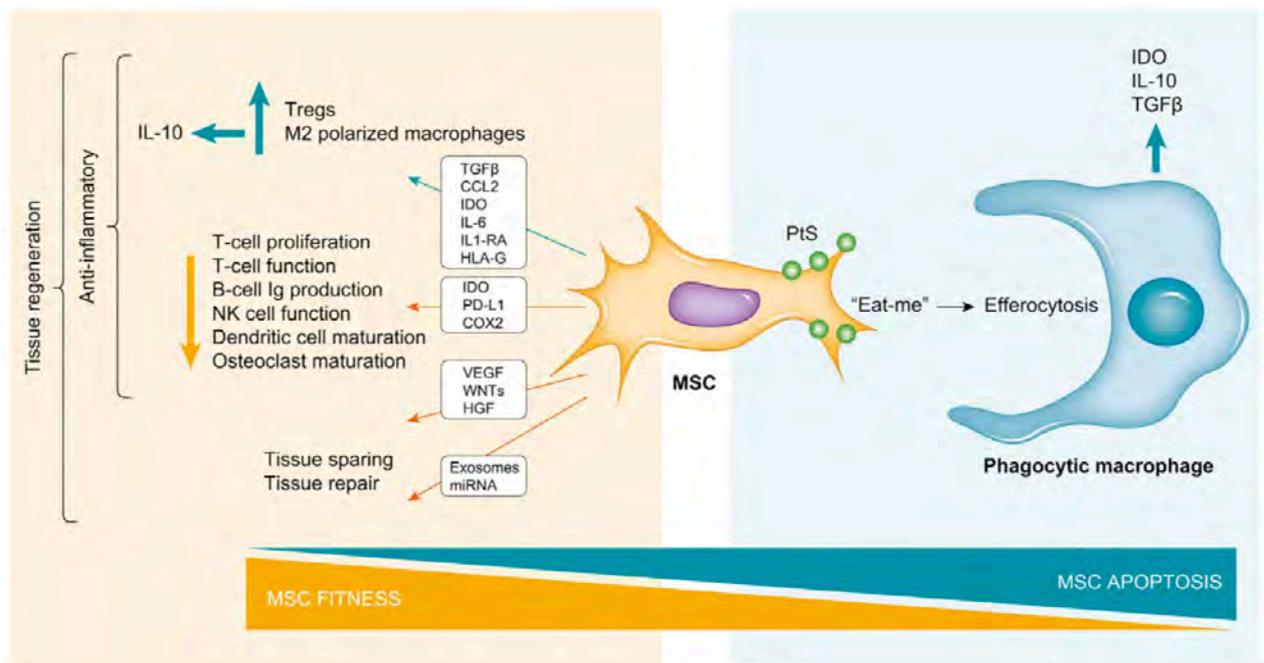


Figure 23 : Fonctions anti-inflammatoires et pro-régénératives des CSM selon leur viabilité ⁸⁶.

Ces programmes de recherche clinique peuvent être autologues, mais sont de plus en plus allogéniques ⁸⁷. Les brevets détenus par l'entreprise Mesoblast (Australie) peuvent freiner le développement des thérapies allogéniques à base de CSM au vu de l'accord récent réalisé entre Tigenix et Mesoblast (versement de 24 millions \$US) pouvant faire jurisprudence si d'autres industriels souhaitent commercialiser ce type de thérapie.

1.1.4. Les cellules souches adultes unipotentes

Les cellules souches adultes unipotentes appelées aussi cellules adultes progénitrices, possèdent une capacité d'auto-renouvellement semblable aux autres cellules souches, mais leur particularité est qu'elles se différencient vers un seul type de cellules spécialisées. Ce sont des cellules souches qui permettent le renouvellement permanent du tissu dans lequel elles se situent. On peut alors citer plusieurs exemples tels que l'épiderme, dans lequel les cellules basales génèrent seulement des kératinocytes ; le muscle, où la fonction des cellules satellites est unipotente.

La connaissance de ces cellules souches unipotentes est moins fournie que celles décrites auparavant, ainsi de par leur potentiel de différenciation limité et leur difficulté d'identification et d'isolement à partir des tissus, l'utilisation en clinique des autres types de cellules souches est privilégiée.

Cependant on retrouve en clinique ces CSA unipotentes dans différentes utilisations notamment en **ingénierie tissulaire du coeur** en utilisant des myoblastes (Heartsheet®), des **articulations** à base de chondroblaste (ChondroCelect®, Maci®, Spherox®, JACC®, Carticel®...), ou la régénération d'un **épiderme ex vivo** à base de kératinocytes et de fibroblastes (Epicel®, Apligraf®, Ginuit®, Laviv®, Dermagraft®, OrCel®, Permaderm®, Cryoskin®, Myski®, Cell spray®, Bioseed-S®, Laserskin®....).

1.1.5. Résumé sur l'utilisation des cellules souches

Les cellules souches offrent donc un panel thérapeutique très vaste. L'utilisation des cellules souches en clinique dépend donc de plusieurs critères qui sont à prendre en compte par les scientifiques lors des phases pré-cliniques :

- Leur facilité d'utilisation et de production

- Absence de problèmes d'ordre éthique : on privilégiera donc les cellules souches multipotentes ou unipotentes à celle des CSE.
- L'accessibilité à leur site de prélèvement : on privilégiera donc les CSM du tissu adipeux (ADSC), les iPS de la peau, ou encore les CSH mobilisées du sang périphérique.
- Leur facilité d'amplification *in vitro* : on privilégiera les cellules capables de s'amplifier rapidement, ce qui reste un problème majeur pour les CSH.
- Utilisation en allogénique largement envisageable pour les CSM.
- L'existence de lignée cellulaire : c'est-à-dire l'utilisation d'une population homogène de cellules stables après des mitoses successives, et ayant en théorie une capacité illimitée de division. Ce qui est le cas pour les CSM, les CSE et les iPSC.

- Leur intérêt thérapeutique

- La plasticité des cellules : c'est-à-dire la capacité à donner plusieurs types cellulaires différenciés qui est défini par leur potentiel souche.

- Leur faible risque d'effets indésirables

- Tumorigénicité : leur capacité à engendrer un processus de cancérogenèse à la suite de leur prolifération non contrôlée à des stades différenciés ou non qui a été observé dans plusieurs cas d'injection de cellules souches pluripotentes (CSE / iPSC).
- Immunogénicité : leur capacité d'induction d'une réponse immunitaire chez le patient.

1.2.Immunothérapie cellulaire

Les traitements spécifiques à base immunologique même sont encore limités. Par analogie avec les stratégies immunologiques à but préventif, on distingue l'immunothérapie active, passive ou adoptive (ACT « Adoptive Cell Transfer »). L'immunothérapie active consiste à stimuler ou à moduler une réponse immunitaire spécifique chez un individu ayant déjà été en contact ou non avec l'antigène concerné (principe de la vaccination). L'immunothérapie passive, qui consiste à administrer une source d'anticorps spécifiques, est avant tout utilisée comme traitement substitutif en cas de déficits en immunoglobulines. Quant à l'immunothérapie adoptive, elle consiste à administrer une source de lymphocytes T spécifiques d'un antigène donné, le plus souvent après expansion de ces cellules *in vitro*.

1.2.1.Les lymphocytes T

Les LT sont des cellules responsables de la réponse immunitaire cellulaire spécifique, qui vise à détruire des cellules infectées par un pathogène ou des cellules cancéreuses. Ces cellules ont pour origine les CSH et leur maturation a lieu dans le « thymus » (d'où l'appellation de cellules T), elles expriment alors à leur surface un récepteur membranaire le TCR. Ces TCR procurent aux LT la propriété de reconnaître des fragments peptidiques antigéniques associés aux molécules du CMH et ceci de manière spécifique. Etant donné le rôle essentiel joué par les molécules du CMH (ou « HLA » chez l'Homme) dans la reconnaissance antigénique par les lymphocytes T, utiliser ce type de thérapie doit être autologue, c'est-à-dire la même personne est à la fois donneur et receveur d'une source de lymphocytes T spécifiques.

Font exception à cette règle les cas de receveurs de transplantations allogéniques de cellules souches hématopoïétiques (CSH), chez lesquels le transfert additionnel de LT dirigés contre des antigènes viraux peut les protéger contre les infections ou les lymphomes causés par ces virus dans un organisme immunodéprimé. Et plus récemment, l'utilisation de LT allogéniques anti-tumoraux génétiquement modifiés par génie génétique pour réprimer le TCR ⁸⁸.

D'après les dossiers déposés à l'EMA, nous pouvons identifier différentes applications de ces LT (en dehors de la thérapie génique) :

- **en oncologie** avec le cas des TIL pour « tumour-infiltrating lymphocytes ». L'idée de cette thérapie date des années 1980 avec le travail pionnier du Dr. Steven Rosenberg du National Institute of Health à Bethesda aux Etats-Unis. Le but était d'utiliser les lymphocytes présents dans la masse tumorale, de les amplifier *ex vivo* en présence de l'interleukine-2 (IL-2), puis de les réinjecter dans la masse tumo-

rale (Figure 24). Rosenberg et ses collaborateurs ont commencé à développer des TIL à partir de tumeurs murines et ont démontré une activité anti-tumorale *in vivo*^{89 90 91}. Actuellement de nombreux essais cliniques sont en cours notamment dans le traitement de cancer solide de type mélanome⁹².

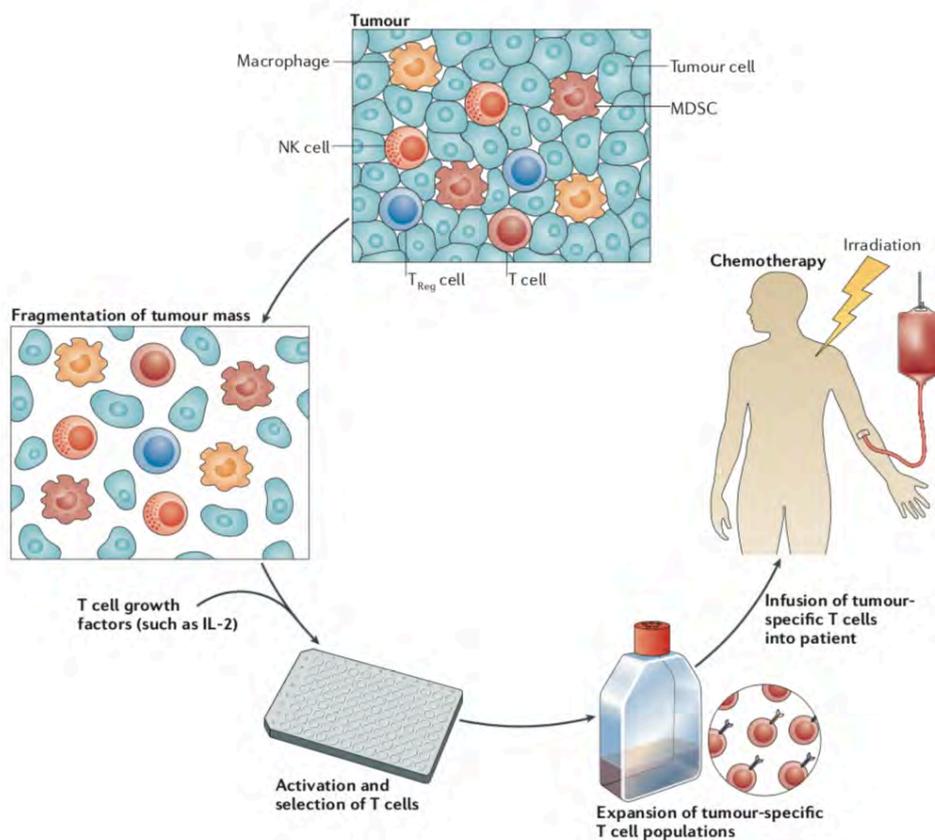


Figure 24 : Procédé de génération de TIL « tumour-infiltrating lymphocytes »⁹⁰.

- **en infectiologie** avec le cas des CTL pour (« cytotoxic T lymphocytes ») des lymphocytes T cytotoxiques anti-viraux chez l'immunodéprimé en post-greffe⁹³. Cet état d'immunosuppression profonde engendré par la greffe de CSH favorise les infections virales, et notamment par les adénovirus, ou les *Herpesviridae* que sont le cytomégalovirus ou encore le virus d'Epstein-Barr^{94 95}. Afin d'éradiquer ces infections résistantes aux traitements médicamenteux antiviraux, a été développé dans les années 1990 la première stratégie d'immunothérapie adoptive anti-infectieuse : la réinjection de lymphocytes du donneur (« donor lymphocyte infusion » ou DLI). Malgré quelques succès rapportés dans la littérature, cette technique est aujourd'hui abandonnée dans cette indication du fait du faible nombre de lymphocytes T spécifiques injectés et du risque associé de survenue d'une GvHD, mais reste d'actualité pour favoriser l'effet thérapeutique GvL de réaction du greffon contre la tumeur. Ces DLI sont considérées comme des PTC et non comme des MTI. Ces résultats ont mis en évidence l'importance d'évoluer vers une plus grande spécificité des LT injectés⁹⁶.

Deux options différentes ont été explorées (Figure 25):

D'une part, l'**élimination des lymphocytes T alloreactifs** des cellules du donneur à réinjecter afin de conserver intacts les lymphocytes T garants de l'activité anti-infectieuse tout en limitant le risque de survenue d'une GvH. On peut citer les essais pionniers de l'EFS de Besançon utilisant des LT du donneur génétiquement modifiés avec un gène suicide : la Thymidine kinase inducible par le Ganciclovir ⁹⁷. Plus récemment, Bellicum Pharmaceuticals développe le BPX-501, des LT du donneur génétiquement modifiés avec comme gène suicide : la caspase 9 inducible par un agent chimique (AP1903). En cas de survenue d'une GvH, ces LT peuvent donc être détruits par l'administration de ces agents chimiques. Les premiers essais cliniques du BPX-501 avaient montré des résultats satisfaisants contre l'infection au cytomégalovirus (CMV), mais la FDA a suspendu son utilisation en janvier 2018, du fait de l'apparition de 3 cas d'encéphalopathies ⁹⁸.

D'autre part, **la sélection des CTL antiviraux**. La première option a donné des résultats très prometteurs dans les déficits immunitaires en utilisant une immunotoxine pour éliminer les lymphocytes T alloreactifs ⁹⁹. Mais la perte de l'alloreactivité était couplée à la perte de l'effet GvL anti-tumorale. La seconde option consiste à transférer une immunité spécifique issue du donneur en administrant des CTL dirigés contre un ou plusieurs virus, isolés au préalable *in vitro* par des techniques immunomagnétiques et éventuellement amplifiés ¹⁰⁰.

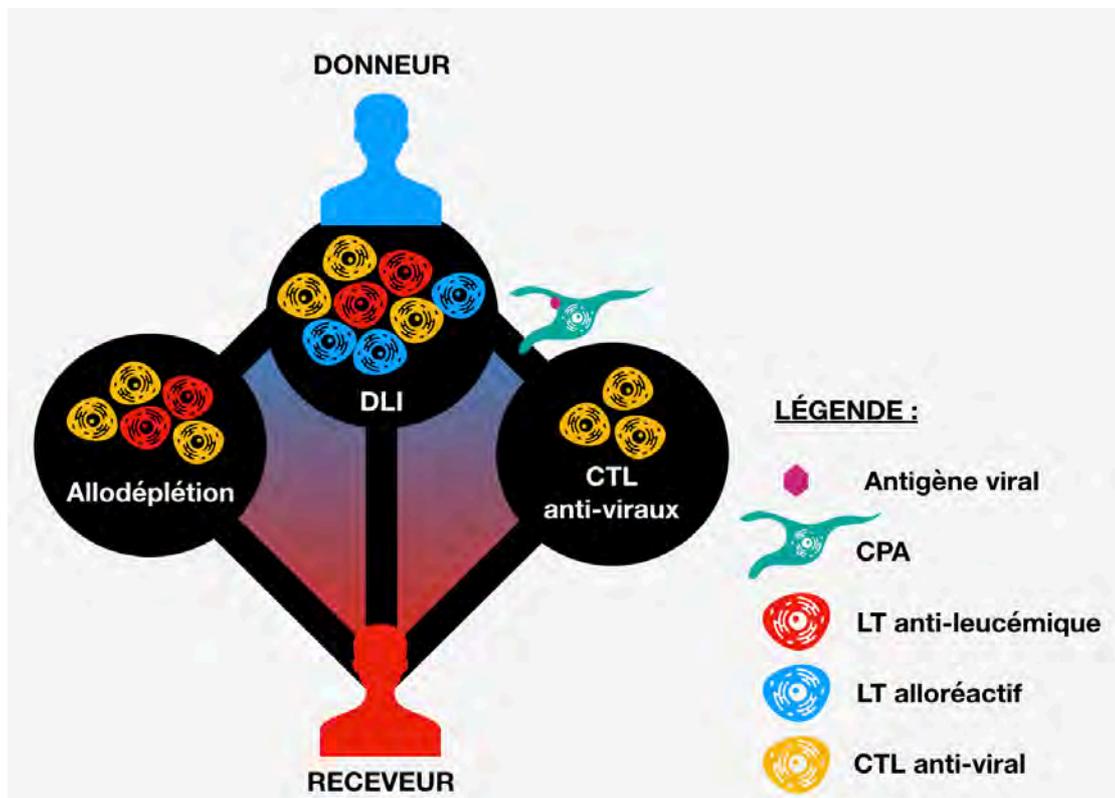


Figure 25 : Les stratégies d'immunothérapies adoptives antivirales à base de lymphocytes T ¹⁰¹.

- **pour moduler l'inflammation et l'immunité** avec le cas des lymphocytes T régulateurs (Treg). Les Treg ont un rôle fondamental dans le maintien de la tolérance immunitaire. Il a été mis en évidence dans certaines maladies auto-immunes des déficits qualitatifs ou quantitatifs de ces cellules T. C'est le cas par exemple du syndrome d'immunodérégulation, polyendocrinopathie, entéropathie auto-immune lié au chromosome X appelé syndrome IPEX (affection récessive liée à une mutation du gène *FOXP3*). La thérapie cellulaire par administration de Treg pourrait avoir un effet à long terme. Elle semble donc être une approche séduisante et innovante, d'autant plus que les traitements usuels des maladies auto-immunes sont souvent non curatifs, et doivent être administrés de façon répétée. Des résultats encourageants ont montré que le transfert de Treg naturels CD4+CD25+Foxp3+ ou de certains Treg induits *in vitro* permettait de ralentir l'évolution de ces pathologies auto-immunes dans des modèles murins ¹⁰². Les capacités immunosuppressives des Treg dépendent de leur activation *via* le TCR, suggérant que les Treg spécifiques de l'antigène sont plus efficaces que des Treg polyclonaux ¹⁰³. Plusieurs essais cliniques de phase I et II ont été entrepris afin de guérir la GvHD aiguë ¹⁰⁴, ou le diabète de type I ¹⁰⁵. Il est à noter que d'autres essais ont été entrepris notamment pour contrecarrer la survenue d'une GvHD post-transplantation rénale ou hépatique (NCT02711826, NCT02188719).

1.2.2. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (DC) ont été découvertes en 1973 par Ralph Steinman et Zanvil Cohn alors que ces derniers cherchaient à comprendre comment une réponse immunitaire était induite dans les rates de souris ¹⁰⁶. Ce sont des cellules immunitaires présentatrices d'antigène (CPA) permettant la reconnaissance d'un antigène (Ag) spécifique et l'activation de la réponse immunitaire adaptative. Les macrophages et les lymphocytes B sont aussi des CPA mais les DC sont les seules capables de stimuler des LT naïfs. Ces DC forment un réseau hétérogène de cellules sentinelles dans les tissus comprenant des cellules dendritiques myéloïdes et des cellules dendritiques plasmacytoïdes qui dérivent d'un progéniteur hématopoïétique. Les DC ayant capté des antigènes exogènes sont capables de migrer dans les ganglions pour achever leur maturation. L'Ag capturé est alors fragmenté en peptides qui sont apprêtés dans les molécules du CMH de classes I et II, puis exportés à la surface des cellules dendritiques pour être présentés aux LT ganglionnaires. Les peptides exogènes sont présentés sur le CMH de classe I des LT CD8+ engendrant l'activation de ces CD8+, « tueurs » spécifiques des cellules exprimant l'Ag exogène.

En clinique, la propriété de présentation de l'Ag des DC est utilisée pour provoquer une vaccination thérapeutique. L'oncologie est donc une de leur indication phare. Les cellules dendritiques sont extraites du sang périphérique après mobilisation, puis cultivées en présence d'antigènes tumoraux *ex vivo* (Figure 26). Ces dernières chargées d'Ag tumoraux sont réinjectées et pourraient engendrer une réponse immunitaire spécifique anti-tumorale via les LT CD8+.

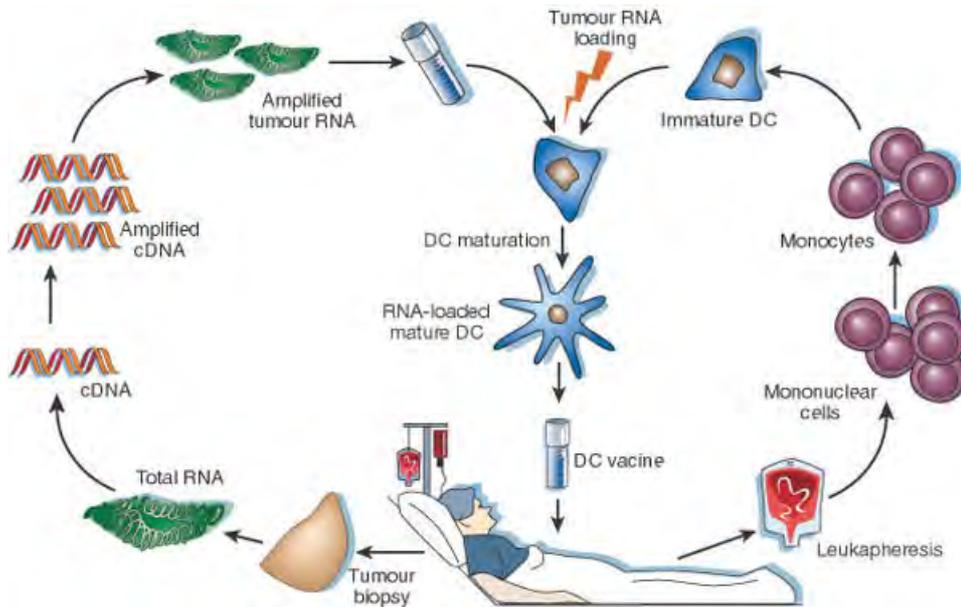


Figure 26 : Traitement des patients atteints de cancer avec des cellules dendritiques activées par l'ARN tumoral ¹⁰⁷.

La majorité des études de thérapie cellulaire comprenant des cellules dendritiques sont principalement en essais cliniques précoces (Phases I/II) et quelques-uns en phase III dans le cancer bronchique, prostatique ou encore rénal. Même si l'utilisation de DC s'impose en tant que stratégie d'avenir pour l'immunothérapie du cancer, aucun MTI à base de cellules dendritiques n'a été commercialisé en Europe ou aux Etats-Unis, du fait de l'essor récent des cellules CAR-T (détaillées dans le chapitre II.3.5) ¹⁰⁸. On peut noter que la Corée du Sud en avance sur la thérapie cellulaire commercialise depuis mai 2007 Creavax-RCC (Ceragene®), des DC autologues contre le carcinome métastatique rénal.

D'autres indications de ces DC sont possibles, comme la GvHD en utilisant des DC plasmacytoïdes ¹⁰⁹. Plus récemment, une équipe japonaise a découvert en 2017 que des DC régulateurs générés à partir d'iPS pouvaient lutter contre le rejet de greffe allogénique de coeur en stimulant la migration de Treg et diminuant l'effet pro-inflammatoire des CTL ¹¹⁰.

2. Ingénierie cellulaire et tissulaire

Les produits issus de l'ingénierie tissulaire (TEP) sont des médicaments innovants et complexes destinés à régénérer, réparer ou remplacer une partie ou la totalité du tissu humain selon le règlement 2007/1394. En plus des caractéristiques du produit, des facteurs non liés au produit peuvent être impliqués (par exemple procédures chirurgicales), zone / volume de tissu manquant, compatibilité des biomatériaux (appliqués en parallèle avec les cellules et tissus) qui peuvent influencer le résultat final.

Ces TEP peuvent donc comprendre :

- une origine humaine, animale ou les deux
- des cellules ou tissus viables ou non viables
- des substances supplémentaires (biomolécules, biomatériaux...)

On peut distinguer deux formes d'ingénierie qui sont intrinsèquement liées et permettent le développement de la médecine régénérative correspondant à l'ingénierie cellulaire telles que l'utilisation des cellules souches en 2D (ex. CSM) en vue de régénérer un tissu *in situ* et l'ingénierie tissulaire au sens propre du terme en 3D permettant de générer artificiellement des tissus *ex vivo*.

2.1. Ingénierie cellulaire

Un produit qui répond à la fois à la définition de « produit issu de l'ingénierie tissulaire » et à celle de « médicament de thérapie cellulaire somatique » est un produit issu de l'ingénierie tissulaire (TEP). C'est pourquoi, l'injection de cellules en 2D pour régénérer est définie comme un TEP. L'ensemble des cellules souches embryonnaires et adultes visant à régénérer un tissu lésé ou défectueux répond alors à cette définition. Nous avons détaillé précédemment les technologies cellulaires (cf. [Chapitre II.1.1. Utilisation de cellules souches](#)), ainsi que des exemples de TEP.

Nous nous focaliserons sur l'ingénierie tissulaire au sens 3D du terme ainsi que l'utilisation de biomatériaux pouvant entrer dans la définition des médicaments combinés de thérapie innovante si celui-ci comporte un dispositif médical associé aux cellules ou aux tissus.

2.2. Ingénierie tissulaire et médicaments combinés

2.2.1. Cultures 2D versus 3D

La culture de cellules humaines a commencé il y a plus de 65 ans avec les cellules d'Henrietta Lacks (HeLa) cultivées en 2D sur des supports en plastique, après de nombreux échecs au XIX^{ème} siècle ¹¹¹. Dans de telles cultures, les cellules adhèrent à un plastique ou un verre artificiel, et sont en contact avec des cellules seulement à leur périphérie. Parce qu'il n'existe pas de gradient d'oxygène, de nutriments ou d'épuration des déchets, cet environnement uniforme n'est pas physiologique. Les cellules ne sont pas autorisées à s'empiler les unes sur les autres, mais forcées à prendre la morphologie d'une monocouche, ce qui n'est pas naturel pour beaucoup de types cellulaires. Ce modèle de culture de cellules est toutefois utile pour étudier des événements cellulaires et moléculaires importants dans la décision du sort de la lignée, la différenciation et le maintien des cellules humaines.

Une des stratégies alors développée est l'établissement de co-cultures augmentant les contacts et communications inter-cellulaires, mais leur capacité à former une structure multidimensionnelle est toujours inhibée par la surface plane des supports 2D. Les tissus et organes humains sont, quant à eux, des structures en 3D qui s'auto-organisent et cette organogenèse aux mécanismes encore incompris est une composante manquante dans des cultures 2D conventionnelles (Figure 27) ; en effet, ces approches ne peuvent donc récapituler entièrement le développement et les fonctions d'un tissu *in vivo* (Tableau 8). Pour aller plus loin et se rapprocher de la physiologie humaine, les biologistes ont donc essayé de faire croître des cellules dans un microenvironnement en 3D ¹¹².

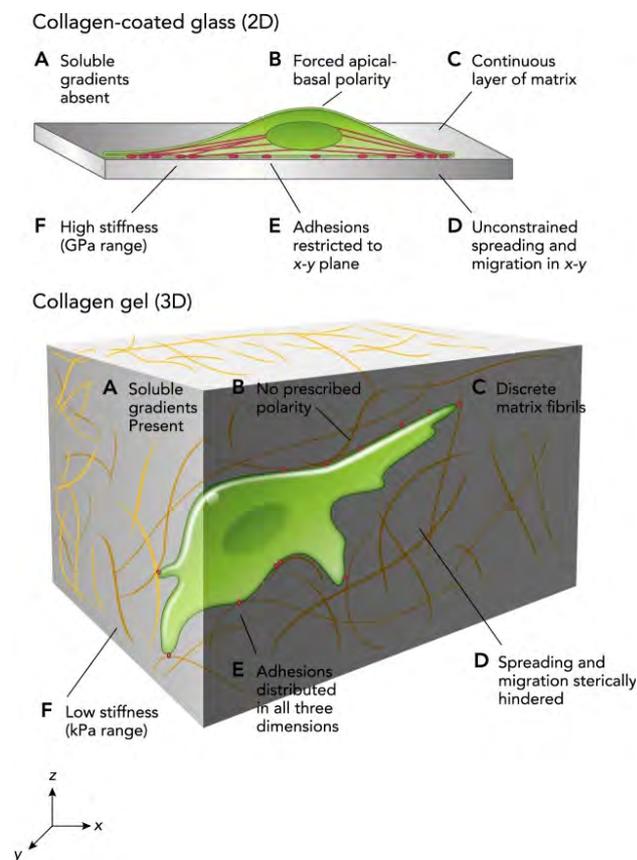


Figure 27 : Propriétés cellulaires des cellules cultivées en 2D en comparaison à l'inclusion dans un gel en 3D ¹¹².

Le premier essai fut réalisé en cancérologie, utilisant une matrice (de l'agar) pour générer des colonies qui engendraient principalement une prolifération chaotique avec un piètre ancrage des cellules et une faible différenciation ¹¹³. Depuis cette première tentative, beaucoup d'efforts ont été faits pour optimiser la culture en 3D de cellules humaines aux diverses indications et ces méthodes ont depuis quelques décennies rapidement gagné en popularité ¹¹⁴.

Tableau 8 : Différences clés entre les systèmes de culture 2D versus 3D ¹¹⁵.

Caractéristiques cellulaires	2D	3D
Morphologie	Cellules plates et étirées en forme de monocouche	Forme naturelle , avec plus de contacts cellules - cellules.
Prolifération	Prolifèrent souvent à un rythme plus rapide que <i>in vivo</i>	Peuvent proliférer à un rythme plus rapide / plus lent par rapport aux cellules cultivées en 2D et en fonction du type de cellules et / ou du type de système de modèle 3D
Exposition au milieu/ médicaments	Les cellules en monocouche sont également exposées aux nutriments / facteurs de croissance / médicaments qui sont distribués dans le milieu de croissance	Les nutriments et les facteurs de croissance ou les médicaments peuvent ne pas pénétrer complètement la structure, formant un gradient .
Stade du cycle cellulaire	Plus de cellules sont susceptibles d'être au même stade du cycle cellulaire en raison de leur exposition semblable.	Contiennent des cellules à des stades variés : en prolifération, quiescentes, hypoxiques et nécrotiques.
Expression génique / protéique	Présentent souvent des niveaux différents d'expression des gènes et des protéines par rapport aux modèles <i>in vivo</i>	Les cellules présentent souvent des profils d'expression des gènes / protéines similaires à leurs origines tissulaires <i>in vivo</i>
Sensibilité aux médicaments	Les cellules sont plus sensibles au traitement et les médicaments semblent être très efficaces.	Les cellules sont souvent plus résistantes au traitement par rapport à celles cultivées en 2D, étant souvent de meilleurs prédicteurs de la réponse aux médicaments <i>in vivo</i> .

Ces différentes techniques de cultures en 3D ont abouti à des découvertes majeures et à de nouveaux courants de pensée. Une première étape importante a eu lieu dans les années 1980 avec le travail pionnier de l'équipe de Mina Bissell qui a mis en évidence l'importance du microenvironnement 3D matriciel dans le devenir des cellules ¹¹⁶. La seconde étape a été achevée avec l'expertise des spécialistes des cellules souches voulant faire croître *in vitro* des structures 3D ressemblant à des organes nommés organoïdes ¹¹⁷.

2.2.2.Méthodes de culture 3D

Le choix de la technique de culture 3D dépend de différents paramètres mais principalement du type cellulaire que l'on cultive (cellules primaires, lignées cellulaires, tissu d'origine). On peut distinguer plusieurs méthodes de culture de cellules en 3D que l'on peut classer avec ou sans biomatériaux.

- **Méthodes avec biomatériaux :**

En effet, dans les méthodes de cultures 3D avec biomatériaux, les cellules poussent en présence d'un support. Selon l'application, nous pouvons distinguer 2 types majeurs de supports :

- Les supports « mous » à base d'hydrogel

Par définition, les hydrogels sont des réseaux de polymères gonflés avec de l'eau. Les cellules peuvent être incorporées dans ces hydrogels ou simplement enrobées à la surface. Selon la nature du polymère, les hydrogels peuvent être classés dans différentes catégories (hydrogels à base de protéines MEC, hydrogels naturels et hydrogels synthétiques) avec des propriétés distinctes. Souvent utilisés pour cultiver en 3D les tissus mous, épithéliaux ou certaines tumeurs solides ¹¹⁸.

Les MTI d'ingénierie tissulaire à base d'hydrogel sont multiples (Epicel®, Apligraf®, Ginit®, Laviv®, Dermagraft®, OrCel®, Permaderm®...) ([Annexe 2](#)). On les retrouve principalement dans les substituts épidermiques sous forme de gel de collagène principalement (humain ou porcin) supportant la culture de fibroblastes et kératinocytes ou de cellules souches ¹¹⁹.

Deux MTI ont été commercialisés en Europe avec ces biomatériaux mous : Maci® et Holoclar®.

- **Maci®** est un MTI d'ingénierie tissulaire combiné contenant des chondrocytes autologues pour les anomalies de cartilage, en particulier au niveau du genou. Cette approche, développée depuis 15 ou 20 ans, consiste à réaliser une biopsie sous arthroscopie, à mettre les chondrocytes en culture plane pendant 3 ou 4 semaines, puis dans une matrice 3D. Cette matrice est ensuite réimplantée sur la partie lésée du cartilage à l'aide de colle biologique. Il s'agit d'une matrice de collagène purifiée de porc sans cellules associées. Cette matrice est la plus étudiée et les autres matrices existantes n'ont pas été approuvées. L'implantation s'effectue par une chirurgie ouverte. L'implant est fixé par de la colle de fibrine, sur toute la surface du défaut. L'indication retenue est la réparation de défaut au niveau du cartilage du genou (grade III ou IV) sur une surface de 3 à 20 cm² chez les patients adultes. Cette procédure a été étudiée dans un essai pivot regroupant 144 patients ¹²⁰. A la 104^{ème} semaine, elle s'est avérée supérieure à une technique de micro-fracture par arthroscopie, avec une amélioration fonctionnelle du genou de 63/72 vs. 49/72 patients .

- **Holoclar®** est un MTI d'ingénierie tissulaire à base de cellules cornéales épithéliales autologues incluant 3,5% de cellules souches limbiques cultivées sur un support circulaire transparent de fibrine (2,2 cm de diamètre). Ce produit est indiqué dans le traitement des lésions de la cornée associées à une déficience en cellules souches limbiques suite à des brûlures oculaires. L'amplification des cellules est réalisée à partir d'une biopsie de 1 à 2 mm² de limbe non endommagé réalisé chez le patient qui recevra le feuillet cellulaire. L'objectif thérapeutique visé avec Holoclar® est le remplacement de l'épithélium cornéen et des cellules souches limbiques perdues chez les patients dont le limbe a été détruit par une brûlure oculaire physique ou chimique. Au cours du processus de réparation de la cornée, les cellules souches implantées sont destinées d'une part à se multiplier, se différencier et migrer

pour régénérer l'épithélium de la cornée, et d'autre part à maintenir un réservoir de cellules souches pouvant régénérer de manière continue l'épithélium de la cornée.

- Les supports « durs » à base de polymères (fibres, éponges)

Dans ce cas, les cellules sont cultivées en présence de fibres ou de structures type éponge : les cellules récupèrent une forme plus physiologique, car elles ne sont pas plaquées sur une surface plane. Les matériaux utilisés pour ces supports peuvent être du polystyrène (adapté pour les études d'imagerie en raison de sa transparence), mais aussi des outils biodégradables comme la polycaprolactone. Ces méthodes sont très courantes dans la régénération de tissus durs tel que le tissu osseux ⁶⁸. Il est intéressant de citer les matrices décellularisées de plus en plus utilisées ⁽¹²¹⁾.

Choisir un biomatériau n'est pas chose aisée et les scientifiques doivent jongler entre la pertinence biologique et l'adéquation à la clinique. Ils doivent déterminer une matrice adéquate pour leur expérimentation *in vitro* devant répondre à des problématiques d'ordre analytiques et technologiques (Tableau 9). Est-ce que le matériel permettra une bonne récupération des cellules ? Est-ce que l'analyse d'images sera difficile ? Pourra-t-on moduler le support ? Mais devront également répondre au cahier des charges industriel à savoir : est-il reproductible sur l'efficacité, la viabilité ? Augmente-t-on le risque de contamination ? Est-il certifié pour une utilisation en clinique et est-il facile à manipuler à grande échelle (grade BPF notamment) ? Ainsi, un hydrogel synthétique biodégradable déjà certifié CE qui n'est pas d'origine animale est sûrement une base intéressante de travail pour l'ensemble de l'ingénierie tissulaire.

Tableau 9 : Pertinence scientifique et clinique de l'utilisation de biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire

Techniques	Matrices à base de MEC (Laminine, collagène, gel MEC)	Hydrogels naturels	Hydrogels synthétiques	Biomatériaux durs (polymères)
Pertinence Biologique	+++	+++	+/-	+/-
Reproductibilité	-	++	+++	+++
Risque de contamination	-	++	+++	+++
Modulabilité / Customisation	-	+	++	+
Récupération des cellules	+/-	+	++	+++
Analyses d'images	+	++	++	++
Utilisation en clinique	+/-	+/-	++	++

Ces problématiques de sécurité et de reproductibilité des produits fabriqués compliquent la production et l'accès aux essais cliniques. Ainsi, certaines méthodes voient le jour pour s'affranchir de ce casse-tête, quitte à être plus éloignées de la physiologie.

- **Méthodes sans biomatériaux :**

Les techniques de cultures sans biomatériaux permettent aux cellules de s'auto-assembler pour former des agrégats cellulaires non adhérents appelés sphéroïdes. Ces sphéroïdes miment un tissu solide en sécrétant leur propre matrice extra-cellulaire et possédant leur propre gradient de nutriments. Les systèmes de cultures sans biomatériaux de sphéroïdes sont des méthodes reproductibles, avec des structures de tailles et de formes semblables permettant leur utilisation *in vitro* dans des systèmes de criblage à haut débit. On peut y trouver le système de la goutte pendue ¹²² ou l'utilisation de microplaques à faible attachement ¹²³. La génération de tissus cartilagineux est un exemple concret utilisant cette technologie 3D avec le MTI Européen Spherox® (CO.DON AG), agrégats sphériques de chondrocytes autologues humains cultivés *ex vivo*.

L'autre atout des techniques de cultures sans biomatériaux réside dans l'augmentation du rendement industriel. Dans de nombreux essais cliniques d'ingénierie cellulaire à base d'injections de cellules souches mésenchymateuses (CSM), il est nécessaire au préalable d'amplifier ces cellules. La mise au point de cultures en bioréacteurs permettrait une amplification plus importante et plus rapide des cellules tout en réduisant le coût de production ¹²⁴. Des industriels vont même jusqu'à breveter certaines techniques de culture 3D ce qui est le cas de Pluristem Therapeutics Inc. avec son brevet (No. EP2366775B1). Ce brevet concerne l'utilisation de cellules stromales adhérentes du placenta ou du tissu adipeux, pour faciliter la prise de greffe de cellules souches hématopoïétiques des patients présentant une moelle osseuse dysfonctionnelle.

Les mêmes problématiques scientifiques et cliniques incombent à ces technologies sans biomatériaux ([Tableau 10](#)).

Tableau 10 : Pertinence scientifique et clinique des technologies sans biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire.

Techniques	Système de la goutte pendue	Microplaques à faible attachement	Système de microfluidique	Bioréacteurs
Culture à long terme	+++	+	++	+++
Récupération des cellules	++	+++	-	+++
Analyses d'image	++	+++	+++	-
Coût	+	++	-	-
Utilisation en Clinique	++	+++	-	+++

3. Thérapie génique

La thérapie génique repose sur l'utilisation de gènes comme médicament. Un gène est un fragment déterminé d'un segment d'ADN (locus). L'ADN contenu dans le noyau des cellules humaines peut être transcrit en ARN messager (ARNm), puis traduit en protéines (Figure 28).

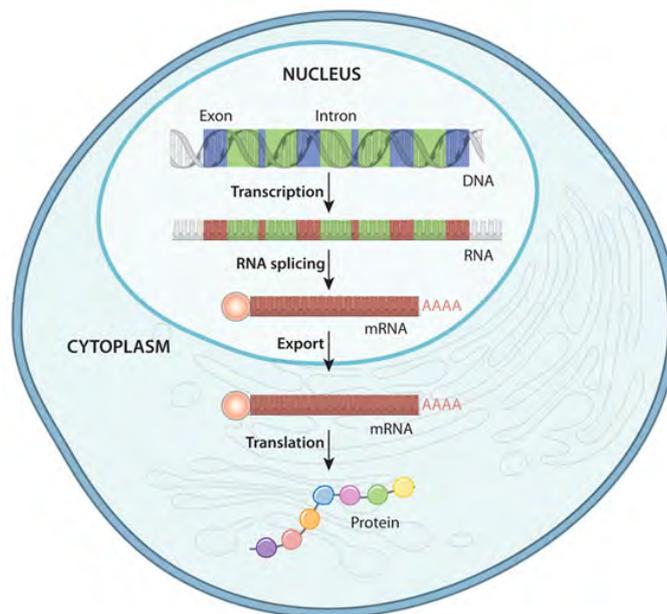


Figure 28 : Généralités d'expression des gènes dans une cellule eucaryote.

Source : © 2010 Nature Education

Transcription de l'ADN en ARN, épissage de l'ARN en ARN messager (mRNA), exportation de l'ARN nucléaire vers le cytoplasme et traduction de l'ARNm en protéine.

La thérapie génique repose sur quatre éléments fondamentaux : le gène transféré, le vecteur utilisé pour véhiculer le gène à l'intérieur de la cellule, qui est la cellule cible, et la méthode de transfert.

3.1. Le type de gène transféré

Le gène transféré peut être de différentes natures, principalement :

- un gène normal codant une **protéine fonctionnelle** pour corriger la déficience chez des patients atteints de maladies génétiques ;
- un gène « tueur » (également appelé **gène suicide**) dont le transfert va conduire à la mort des cellules (cancéreuses le plus souvent) dans lequel il s'exprime ;
- un gène codant pour une molécule physiologique agissant à distance comme les **cytokines**, dans le cas d'immunothérapies du cancer ;
- un gène codant pour un **agent vaccinal** anti-tumoral, anti-viral ou anti-parasitaire (vaccinothérapie) ;
- un gène **marqueur** permettant d'évaluer l'efficacité du transfert et de suivre le devenir d'une population cellulaire donnée (« tracking »).

3.2. Les méthodes de transfert

De telles thérapies peuvent être utilisées avec une méthode de traitement *ex vivo* (ex. Strimvelis®) ou directement administrée *in vivo* (ex. Glybera®) (Figure 29) :

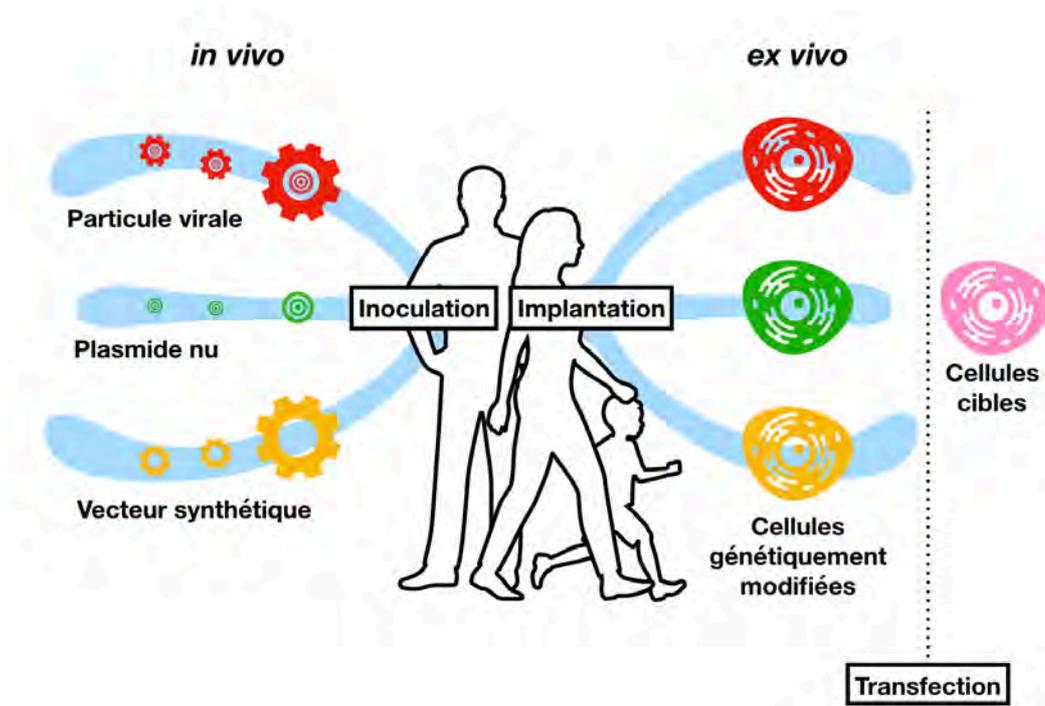


Figure 29 : Méthodes de transfert de gènes.

Le **transfert *ex vivo*** consiste à transfecter *in vitro* des cellules (autologues, allogéniques ou xénogéniques) avec un vecteur portant le gène d'intérêt, puis à implanter ces cellules génétiquement modifiées chez le patient.

Le **transfert *in vivo*** qui consiste à directement inoculer dans l'organisme le produit de thérapie génique (moins coûteux et moins traumatisant) mais est moins spécifique quant aux cellules cibles.

3.3. Le type de vecteur utilisé

Pour véhiculer ces différents gènes d'intérêt, plusieurs types de vecteurs sont actuellement utilisés chez l'Homme. On retrouve des vecteurs viraux, des vecteurs plasmidiques ou des vecteurs synthétiques. L'utilisation de méthodes physiques telles que le transfert de gènes par des aiguilles, ADN balistique, électroporation, sonoporation, photoporation, magnétofection, ou hydroporation sont également envisageables ¹²⁵.

3.3.1. Les vecteurs viraux

Le vecteur viral est actuellement une des techniques les plus efficaces pour transférer un gène. ¹²⁶. Divers types de virus sont utilisés pour générer les vecteurs viraux autorisant une délivrance transitoire ou permanente du gène dans les cellules cibles. On trouvera :

- les **vecteurs adénoviraux (AV)** : Les adénovirus sont des virus à ADN qui peuvent transduire transitoirement presque n'importe quel type de cellule de mammifère. L'adénovirus entre dans les cellules cibles en se liant au récepteur coxsackie - adénovirus. La capacité d'emballage des adénovirus est de 7-8 kb.
- les **vecteurs viraux adéno-associés (AAV)** : les virus adéno-associés sont capables de transduire une large gamme de types de cellules prolifératives ou quiescentes, avec un virus auxiliaire comme l'adénovirus ou le virus de l'Herpès pour produire des protéines recombinantes dans les cellules. Les virus adéno-associés ont une capacité d'emballage allant jusqu'à 4,9 kb.
- les **vecteurs rétroviraux (RTV)** : les rétrovirus intègrent de manière stable leurs génomes dans les chromosomes des cellules hôtes. Ces virus sont des virus à ARN à brin positif et peuvent entrer théoriquement dans n'importe quel type de cellule de mammifère (préférentiellement en prolifération). Les rétrovirus peuvent transporter des gènes étrangers d'environ 8 kb.
- les **vecteurs lentiviraux (LV)** : les lentivirus sont un sous-groupe de la famille des rétrovirus et permettent une expression stable à long terme dans le génome de la cellule hôte qu'elle soit proliférante ou quiescente.
- les **autres vecteurs viraux** : autres systèmes de vecteurs viraux basés sur le virus de la vaccine (souche Ankara MVA atténuée), le virus de l'Herpès simplex (HSV), le baculovirus.

Plusieurs vecteurs présentent des options cliniquement pertinentes, comme l'AV, l'AAV, et le LV. Toutefois, des précautions sont à prendre quant au choix de ces vecteurs viraux (Figure 30).

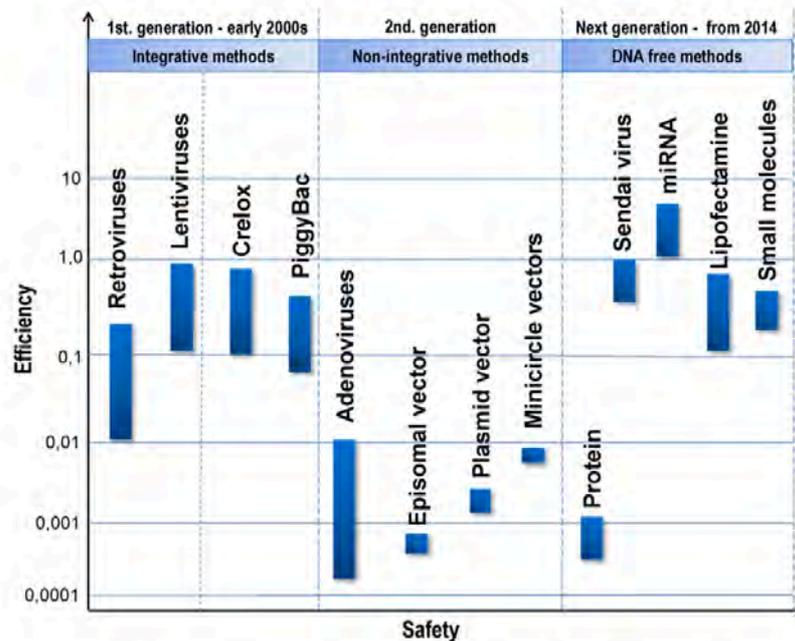


Figure 30 : Efficacité et sûreté des méthodes de transfert de gènes ¹²⁷.

Le choix du vecteur dépend de sa/son :

- **Sécurité :**

- **Recombinaison absente** : les virus pathogènes sont parfois utilisés pour créer des vecteurs viraux, ils sont modifiés de manière spécifique pour minimiser les risques lors de leur manipulation. Les vecteurs viraux utilisés en clinique sont généralement non-réplicatifs (LV, AV), mais peuvent être réplicatifs dans certaines cellules (MVA, HSV).

- **Faible toxicité / immunogénicité** : le vecteur viral devrait avoir un effet aussi minime que possible sur les tissus ou les cellules transfectées. Ce paramètre a une importance cruciale dans les études nécessitant une administration de gène *in vivo*, car la réponse immunitaire se développera dans l'organisme contre le corps cellulaire étranger. Ce fût notamment le cas avec les AV, qui ont été responsables de la mort tragique de Jessie Gelsinger en 1999. La cause de ce décès a été reliée à l'activation systémique de son système immunitaire inné par une réponse primaire cytotoxique anti-adenovirale. Mais après de nombreux progrès dans le génie génétique en recherche et développement, plusieurs industriels développent actuellement des AV de nouvelles générations (atténués et moins immunogènes) pour la clinique.

- **Ciblage et expression :**

- **Tropisme cellulaire adaptable** : la plupart des vecteurs viraux sont construits pour infecter une gamme de cellules aussi large que possible mais parfois le contraire est préféré (ex. des AAV tissu spécifiques comme le poumon avec les AAV5 ; l'oeil avec les AAV2/4 ; le coeur avec les AAV9).

- **Stabilité d'expression** : certains virus sont génétiquement instables et peuvent réarranger rapidement leurs génomes. Par conséquent, les vecteurs instables sont généralement évités dans le processus des vecteurs viraux. Les vecteurs LV sont plus largement utilisés en raison de leur profil d'intégration plus favorable, qui favorise les loci géniques plutôt que les sites de contrôle promoteurs ou transcriptionnels, ce qui limite le potentiel d'oncogenèse ¹²⁸. Ce qui avait été observé par les travaux pionniers d'Alain Fischer sur les rétrovirus.

- **Régulation de la transcription possible** : des progrès importants ont été réalisés dans ce domaine où le ciblage transcriptionnel a pu être réalisé dans de nombreux vecteurs viraux ¹²⁹. Le décryptage progressif du génome humain a permis l'identification d'un nombre très important de promoteurs activateurs ou silencieux, ainsi que des séquences de régulation capables de générer des vecteurs viraux régulés transcriptionnellement.

- **Production :**

- **Sélection** : les vecteurs viraux doivent contenir des propriétés de sélection comme la résistance à un certain antibiotique, de sorte que les cellules qui ont intégré le vecteur viral puissent être isolées et purifiées avant d'être utilisées.

Dans l'UE et aux États-Unis, Glybera® (2012) et Strimvelis® (2016) sont les deux premières thérapies géniques approuvées, développées respectivement par UniQure et GSK, qui utilisent des vecteurs viraux (AAV et LV). Le retrait de Glybera® par l'EMA en 2017 n'étant pas dû à un manque d'efficacité du MTI mais par manque de marché (car traitant une maladie rare à un prix très élevé). En 2016, l'EMA a approuvé l'utilisation d'Imlygic® (talimogene laherparepvec) produit par AMGEN qui est un virus oncolytique HSV1 codant pour le GM-CSF dans le mélanome non résecable de l'adulte. Dernièrement, les cellules CAR-T approuvées par la FDA sont des cellules génétiquement modifiées *ex vivo* par des rétrovirus codant pour l'expression d'un récepteur CAR ([Tableau 11](#)).

Tableau 11 : Liste non-exhaustive de vecteurs viraux utilisés comme MTI ¹³⁰

Famille du vecteur viral	Immunogénicité	Intégration du génome	Expression du transgène	Taille du génome empaqueté	MTI
Adenovirus (AV)	Haute	Non-intégratif	Transitoire	Intermédiaire	Advexin® ¹ , Cerepro® ¹
Adeno-virus associé (AAV)	Faible	Non-intégratif	Potentiellement durable	Petite	Glybera® ²
Herpes simplex virus (HSV)	Haute	Non-intégratif	Potentiellement durable	Intermédiaire	Imlygic® ³ Zalmoxis®
Retrovirus (RV) : gammaretrovirus & lentivirus (LV)	Faible	Intégratif	Durable	Longue	Strimvelis®, Kymriah® ³ Yescarta® ³

¹ AMM retirée par EMA

² AMM non renouvelée

³ Approuvé par la FDA

L'application des vecteurs viraux en clinique est très vaste (maladies génétiques rares ou pathologies plus communes comme les cancers etc.). On peut citer les résultats prometteurs dans les hémophilies A (déficit en facteur VIII) et B (déficit en facteur IX) publiés dans le « New England Journal of Medicine » fin 2017 avec 2 études, utilisant des AAV codant le facteur IX ¹³¹ ou le facteur VIII ¹³².

3.3.2. Les vecteurs plasmidiques

L'énorme potentiel des plasmides en tant que vecteurs non viraux pour la thérapie génique a été reconnu depuis les années 1990 ¹³³. On retrouve des plasmides dans les organismes procaryotes (les bactéries) et chez les eucaryotes (dont les levures). Un plasmide est une molécule d'ADN circulaire double brin, qui possède obligatoirement une origine de réplication (appelée ori), afin qu'il puisse se répliquer indépendamment du chromosome de la cellule et un gène de sélection (typiquement de résistance à un antibiotique ou ABR) pour qu'il ne soit pas perdu par l'organisme au fil des multiplications cellulaires. Les plasmides utilisés en recherche biomédicale peuvent être bien plus complexes, et contenir également des cassettes de clonage, qui sont en fait des séquences courtes reconnues par des enzymes de restriction capables de couper l'ADN au niveau de ces séquences.

Comparés aux vecteurs viraux, les plasmides sont plus faciles et moins chers à produire, à expédier et stocker, et ont une durée de conservation beaucoup plus longue. Il est à noter que la fabrication de constructions virales implique la création et l'utilisation d'intermédiaires plasmidiques pour la formation de particules virales. La nature modulable des plasmides permet également un clonage moléculaire simple, ce qui les rend faciles à manipuler et à concevoir pour un usage thérapeutique. Les plasmides s'intègrent de manière stable dans les cellules par recombinaison ¹³⁴ et, contrairement aux virus, peuvent

être administrés de manière répétée. Les avantages importants des vecteurs d'ADN non viraux par rapport aux vecteurs viraux et aux vecteurs à base d'ARN ont obligé les chercheurs à travailler pour améliorer leur sécurité et leur utilité. En effet, l'utilisation d'antibiotiques et de leurs gènes de résistance dans la préparation des vecteurs plasmidiques est découragée par des organismes de réglementation comme la FDA et l'EMA en raison du risque de transfert horizontal et de réplication des gènes de résistance dans les bactéries du microbiome humain. Afin d'éliminer les séquences superflues *ori* et *ABR* plusieurs méthodes existent. Soit ces vecteurs, appelés pCOR (pour « *conditional origin of replication* »), sont sélectionnés sans utilisation d'antibiotique, soit il est possible d'effectuer des recombinaisons spécifiques permettant la formation de minicercles et de minivecteurs.

En effet, grâce à la recombinaison intramoléculaire de deux séquences, la partie de la séquence indésirable d'un plasmide (y compris *ori* et *ABR*) est entièrement éliminée de manière ciblée et il en résulte deux anneaux d'ADN. L'un est un plasmide résiduel (également appelé **Miniplasmide**) avec l'ensemble des séquences indésirables, et l'autre est le **Minicercle**, qui est constitué presque exclusivement de la séquence circulaire de la cassette d'expression d'intérêt (Figure 31). La séparation des deux anneaux a lieu à l'aide d'un procédé de chromatographie, dans lequel seul le Minicercle est purifié (donc intéressant pour l'utilisation pharmaceutique).

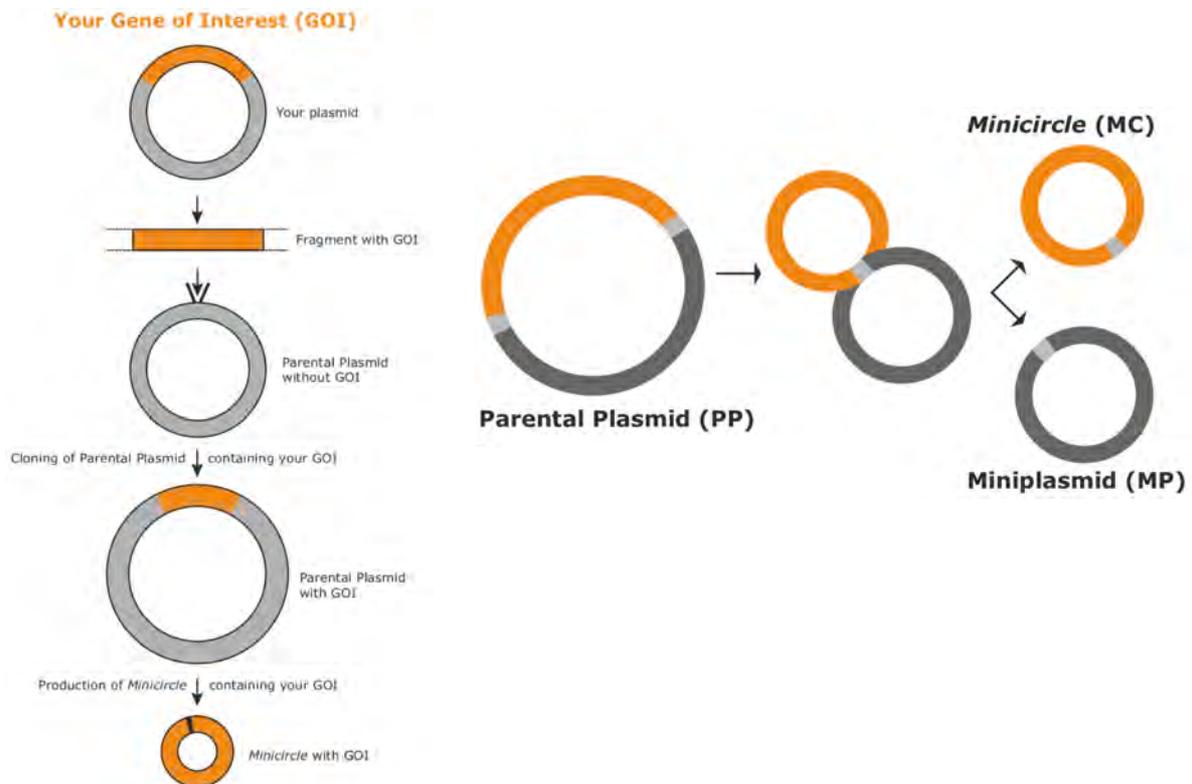


Figure 31: Fabrication d'ADN Minicercle à partir d'un plasmide parent contenant seulement les gènes d'intérêts (GOI).

Source : © plasmidfactory

Dans des essais de transfection avec de l'ADN Minicercle à gène rapporteur par rapport à des plasmides standard correspondants, les Minicercles présentent des taux de transfection nettement plus élevés que les plasmides classiques ¹³⁵. En outre, leur petite taille due à leur forme super-spiralée, et donc fortement condensée, améliore nettement leurs propriétés de transfection.

Ces suppressions de séquences non désirées et inutiles peuvent également être à l'origine de vecteurs à ADN miniaturisés, appelés minivecteurs (Figure 32). Les minivecteurs sont des vecteurs d'ADN non viraux minimisés similaires aux minicercles, mais avec des différences importantes ¹³⁶. Comme les minicercles, les minivecteurs sont synthétisés à partir d'un plasmide parent par recombinaison site-spécifique mais sont beaucoup plus petits que des minicercles (environ 350pb contre 650 pb).

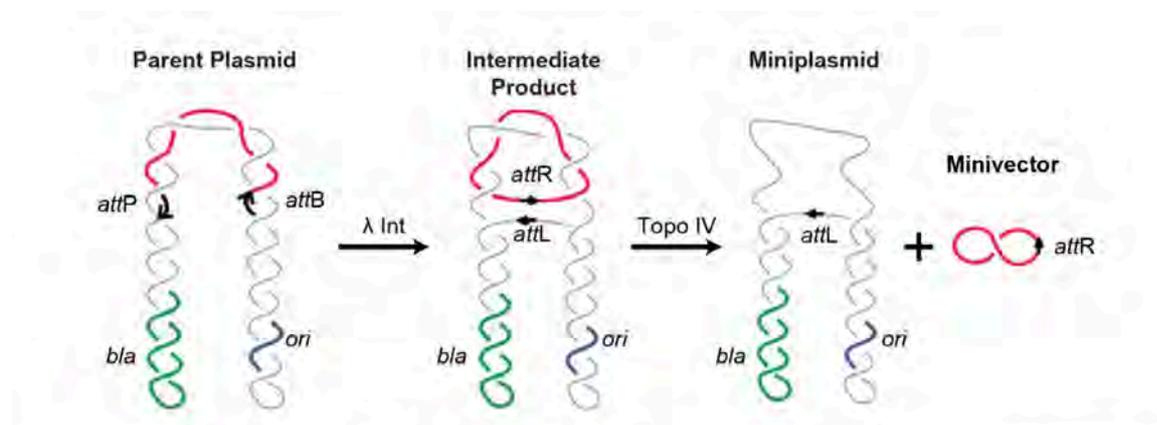


Figure 32 : Génération de minivecteur à ADN ¹³⁷.

En raison de l'amélioration de la sécurité par rapport aux vecteurs viraux, les plasmides ont permis un certain nombre de pistes cliniques ¹³⁷. Même si aucun MTI utilisant cette technologie n'est commercialisé en Europe cinq demandes de classification au CAT ont été effectuées entre 2010 et 2017, envisageant un changement des futures thérapies géniques (Annexe 3).

3.3.3. Les vecteurs synthétiques

Les vecteurs synthétiques ont pour but de transférer de l'information génétique en compactant l'ADN dans un premier temps afin de le protéger, et dans un deuxième temps, d'interagir avec la cellule cible pour s'internaliser dans le cytosol et dans un dernier temps, d'importer l'information au noyau pour engendrer l'expression de la protéine thérapeutique d'intérêt (Figure 33).

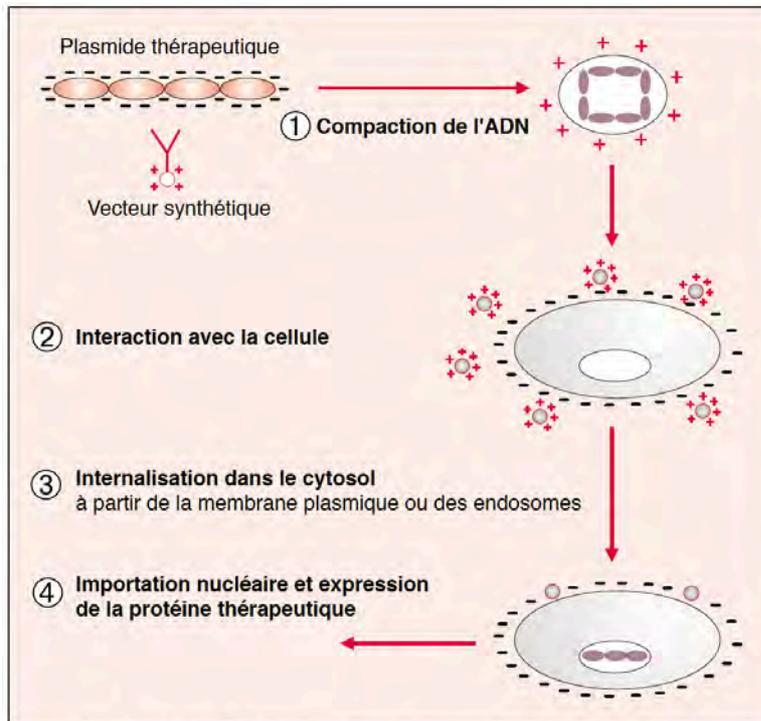


Figure 33 : Principales fonctions des vecteurs synthétiques ¹³⁸.

Il existe différents types de vecteurs synthétiques ; la plupart sont des cations chargés positivement pour protéger l'ADN chargé négativement. On peut citer les lipides cationiques qui ont montré d'excellents résultats dans des expériences *in vitro*, mais leur transposition *in vivo* n'a pas été montré comme efficace et ne peut conférer qu'une expression génique transitoire.

L'utilisation de polymères cationiques s'associant à l'ADN par des liaisons électrostatiques comme la poly(L)lysine a été montrée comme efficace pour le transfert de gène *in vitro* ¹³⁹. Les polymères cationiques se sont révélés prometteurs comme une alternative aux vecteurs viraux ayant une biodégradation sûre et prévisible, mais le problème est leur imprévisible endocytose et cytotoxicité. A l'heure actuelle, ces méthodes de transferts ne sont pas encore au point et des améliorations sont en cours ¹²⁵, avec la formation de nouveaux composés comme la lipofectamine.

Il y a donc deux problèmes majeurs avec les approches de thérapie génique non virales basés sur la délivrance et l'expression des gènes apportés par un plasmide modifié. En raison de ces problèmes, les vecteurs non viraux n'ont pas encore été testés pour le traitement de maladies héréditaires systémiques. Cependant, l'application du transposon « Sleeping Beauty System » (SBTS) a changé ce point de vue. Les transposons, ou éléments transposables, ont été décrits dans de nombreuses espèces allant du poisson à l'homme en passant par la mouche ¹³⁴. Ce vecteur plasmidique non-viral, qui combine les avantages des vecteurs viraux et de l'ADN nu a connu le développement le plus rapide de tous les vecteurs maintenant en essai clinique chez l'Homme.

Le SBTS comprend deux éléments :

- un transposon contenant une cassette d'expression génique,
- et un source d'enzyme : la transposase.

La transposase catalyse l'excision du transposon de sa position initiale et, par un mécanisme de « couper/coller », permet sa réintégration ailleurs dans le génome (Figure 34).

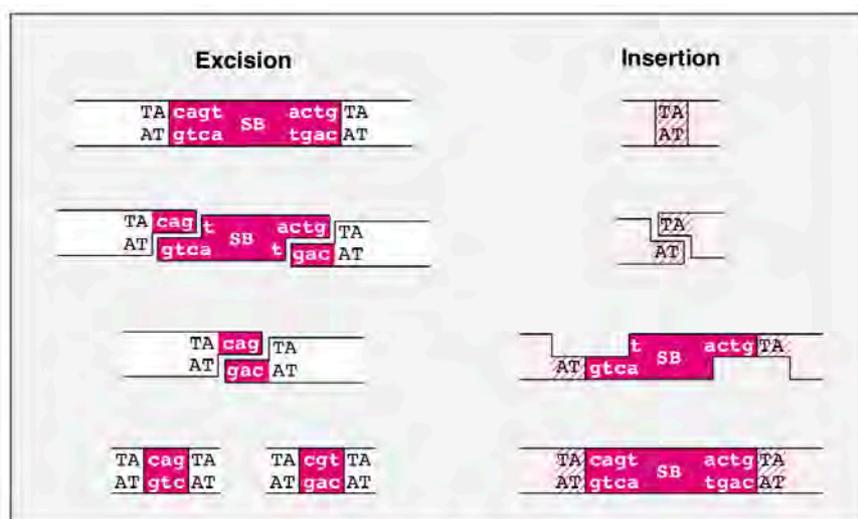


Figure 34 : Transposition de Sleeping Beauty ¹⁶³.

Les différentes étapes de la transposition de Sleeping Beauty sont décrites à gauche pour l'excision, et à droite pour l'insertion. La transposase coupe les deux extrémités du transposon au niveau des séquences inversées répétées du site d'excision, créant ainsi des extrémités 5' sortantes de trois bases. Elle clive également le site d'insertion au niveau d'une séquence dinucléotidique TA, mais dans ce cas, les extrémités sont 3' sortantes. L'élément excisé est alors transféré du site d'excision vers le site d'insertion où il s'intègre à nouveau dans le génome. La dernière étape est la réparation de l'ADN au niveau des deux sites.

Plusieurs autres systèmes de transposon d'ADN montrant une bonne intégration dans les cellules murines et humaines ont été développés au cours des dernières décennies (Tableau 12). L'un d'eux est le transposon « *piggyBac* » montrant un intérêt majeur en médecine régénérative comme un outil de reprogrammation des cellules différenciées en iPSC ¹⁴⁰.

ADVANTAGES	
VECTORS	
Retroviral/Lentiviral	Transposons
High Efficiency Transduction	High level of expression
High Transgene Expression	Stable genomic integration
High Reproducibility	Less immunogenic compared to viral vectors
Well characterized systems	Facilitates implementation of clinical trial
Flexibility of pseudotyping env genes of choice to maximize transduction efficiency	Plasmid DNA is not cost prohibitive and not hazardous to produce
	Nucleofection of whole resting PBMC and subsequent T cells expansion

DISADVANTAGES	
VECTORS	
Retroviral/Lentiviral	Transposons
Tedious work for production, Potentially dangerous	Low to mid/variable transfection efficiency
High cost of production	Possibility of transposase integration
Requirement for packaging cell lines	
Possible oncogene activation	
Pre-activation of lymphocytes	

Tableau 12 : Comparaison des systèmes de transferts viraux versus transposons ¹⁴¹.

En conclusion, les méthodes intégratives s'appliquant aux vecteurs viraux (ex. rétroviraux et lentiviraux) possèdent un avantage indéniable grâce notamment à leur importante efficacité d'expression du transgène. Cependant, ces méthodes possèdent un risque considérable de formation de tumeurs malignes. À cause de ce risque, différentes approches non-intégratives sont utilisées (ex. plasmides, système de transfert d'ARN transitoire Lentiflash® de Vectalys etc.) et semblent être prometteuses pour la clinique. Tandis que d'autres techniques non-intégratives synthétiques nécessitent des améliorations substantielles pour obtenir un résultat semblable. À l'échelle mondiale, le nombre total d'essais cliniques de thérapie génique actifs signalés est de 2597 ¹⁴². Les vecteurs d'ADN non-viraux (ex. plasmides, lipofection) ont été jusqu'ici utilisés moins fréquemment que les vecteurs viraux (21% vs 69%) ; pourtant les vecteurs non viraux sont beaucoup moins immunogènes que les vecteurs viraux.

3.4. Le choix des cellules cibles

Le choix des cellules ciblées par ces vecteurs est lié à la maladie et/ou à l'organe concerné, sachant que les maladies qui font actuellement l'objet de ces protocoles peuvent être des déficits héréditaires (mucoviscidose, déficits immunitaires etc.), des maladies infectieuses (SIDA, hépatite B), ou des cancers. Les cellules les plus utilisées restent les cellules de l'immunité (à savoir les lymphocytes T), ainsi que certaines bactéries (ex. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pseudomonas*...).

3.5. Cas des cellules CAR-T

L'un des MTI les plus prometteurs en thérapie génique de ces dernières années a été la génération des CAR-T ; cellules T génétiquement modifiées exprimant un **récepteur antigénique chimérique** (CAR). Le transfert adoptif de ce type de cellules est parvenu à de grands progrès dans le traitement de maladies malignes.

Les CARs sont des immuno-récepteurs synthétiques dont le domaine extra-cellulaire est généralement un fragment variable à chaîne unique (scFv) dérivé d'un anticorps qui reconnaît spécifiquement une protéine à la surface d'une cellule tumorale. Le scFv est lié à une signalisation intra-cellulaire qui joue un rôle majeur dans l'activation, la prolifération, la persistance et la cytotoxicité des lymphocytes T. Ces CARs sont composés d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire CD3 zeta qui induit l'activation des T (Figure 35). Plusieurs domaines de co-stimulation tels que le CD28, ou 4-1 BB complètent la construction des CAR dans les générations plus récentes (2^{ème} à 4^{ème}).

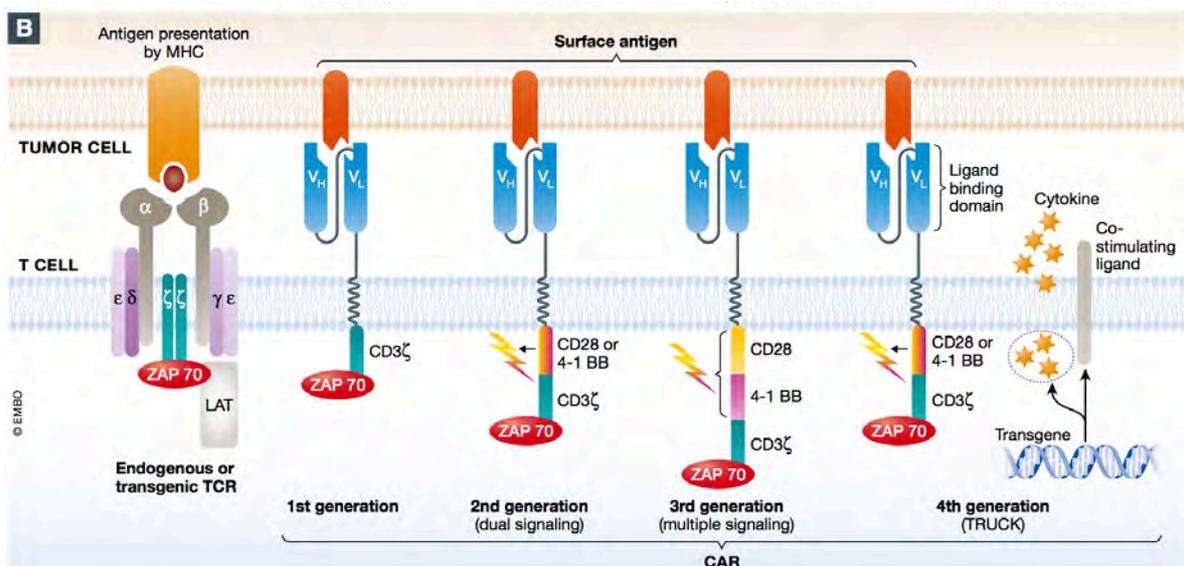


Figure 35 : Les différentes générations de CAR-T ¹⁴³.

A partir d'une collection de sang (aphérèse), les lymphocytes T (CD4+/CD8+) sont isolés du reste des autres cellules sanguines par sélection immunomagnétique pour la plupart, puis activés *in vitro* afin d'être fonctionnels *in vivo*. Ces cellules sont ensuite génétiquement modifiées en utilisant un vecteur (lentiviral le plus souvent) pour faire exprimer le CAR de la construction souhaitée. Ces cellules transfectées appelées CAR-T sont alors amplifiées et congelées avant d'être transportées, décongelées et administrées au receveur (Figure 36). Le but de cette thérapie est donc de cibler spécifiquement une protéine à la surface d'une cellule délétère à l'image des anticorps (Ac) monoclonaux. Néanmoins, la réponse immunitaire engendrée par les CAR-T après reconnaissance de l'Ac-Ag est bien plus rapide, intense et d'une durée d'action plus importante qu'avec des anticorps monoclonaux.

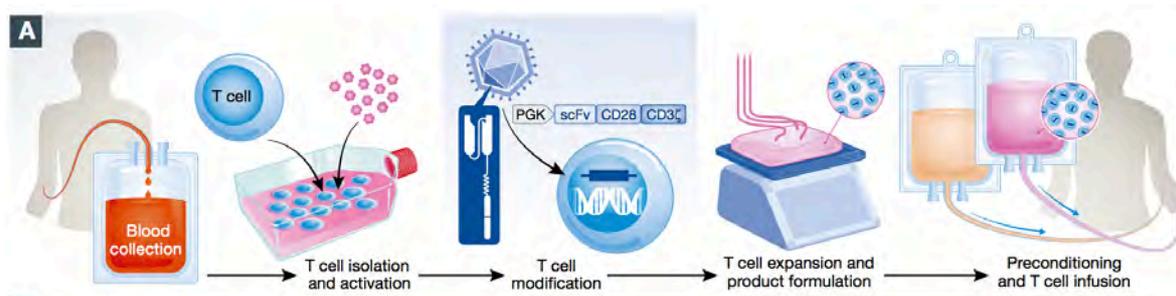


Figure 36 : Le processus de génération des cellules CAR-T ¹⁴³.

Le premier essai clinique de CAR-T avait pour objectif de guérir les carcinomes épithéliaux avancés ovariens et les cancers métastatiques rénaux en visant respectivement, le récepteur aux folates ¹⁴⁴ et l'anhydrase carbonique (CAIX) ¹⁴⁵. Ces études furent suivies par des essais sur des patients atteints de neuroblastomes ¹⁴⁶ et lymphomes folliculaires ¹⁴⁷. Récemment, le succès clinique de ces CAR-T incombe aux CAR-T anti-CD19 de 2^{ème} génération ¹⁴⁸, à savoir Kymriah[®] (construction CD3z + 4-1 BB) traitant les leucémies aiguës lymphoblastiques B (LAL-B) ¹⁴⁹ ¹⁵⁰ et Yescarta[®] (construction CD3z + CD28) traitant les lymphomes B non Hodgkiniens réfractaires ; approuvées par la FDA en 2017 ¹⁵¹.

Dans le premier essai de phase II non randomisé multicentrique de Kymriah[®] (tisagenlecleucel) de Novartis, incluant 75 malades (âge médian : 11 ans), le taux de réponse global était de 81% à 3 mois et aucune maladie minimale résiduelle (MRD) n'était retrouvée chez les répondeurs. Les taux de survie sans événement et de survie globale à 6 mois étaient respectivement de 73 et 90% et à 12 mois de 50 et 76% ¹⁵².

Le deuxième essai de phase II ¹⁵³ concerne le suivi à long terme de 53 adultes (âge médian : 44 ans), atteints de LAL-B très lourdement pré-traités, ayant reçu une injection de cellules CAR-T 19-28z produites au Memorial Sloan-Kettering Cancer Center de New York (USA). Ce traitement a permis d'obtenir un taux de réponse complète de 83%, très semblable avec ce type de traitement chez l'enfant et l'adulte jeune. Avec un suivi médian de 29 mois, la survie sans événement est de 6,1 mois et la survie globale de 12,9 mois portées respectivement à 10,6 et 20,1 mois chez les patients qui avaient moins de 5% de blastes médullaires avant traitement.

Ces résultats à long terme chez l'adulte paraissent un peu décevants comparés à ceux rapportés chez l'enfant et l'adulte jeune dans l'article de Shannon L. Maude et al. et soulèvent donc plusieurs questions :

- Quel est le suivi minimum pour évaluer l'efficacité ?
- Est-ce que les LAL-B de l'enfant et du jeune adulte sont plus sensibles aux CAR-T que celles des adultes ?
- Quelle est la meilleure construction de CAR-T en termes d'efficacité clinique ?

En ce qui concerne l'essai clinique ZUMA-1, testant Yescarta® (Axicabtagene Ciloleucel) de Gilead, ¹⁵⁴, il a été conduit chez 108 patients atteints de lymphome B non Hodgkinien soit réfractaire après 2 lignes de traitement, soit en rechute dans l'année suivant une autogreffe de CSH. Les patients ont reçu au moins 2×10^6 cellules CAR-T positives par kg en dose unique. Sur les 101 patients évaluable, le taux de réponse fut de 82% dont 54% de rémission complète. Au suivi médian de 15,4 mois, 42% des patients restaient répondeurs dont 40% en rémission complète. La toxicité, incluant 3 décès, a été analogue à celle de toutes les CAR-T : syndrome de libération cytokinique, toxicité neurologique, médullaire, etc. Les dossiers de Kymriah® et Yescarta® ont été déposés auprès de l'EMA.

Plus récemment, des CAR-T anti-CD22 contre la LAL-B, anti-BCMA (pour « B-cell maturation antigen ») contre le myélome multiple (JCARH125 de Juno Therapeutics-Celgene) voient le jour ¹⁵⁵, et en recherche des CAR-T bi-spécifiques sont en élaboration ¹⁵⁶.

Applications non oncologiques des CAR-T : Par ailleurs, la société française TxCell conduit actuellement des essais cliniques sur des MTI de thérapie génique à base de CAR-Treg visant le HLA A2 pour prévenir la GvH chronique après transplantation de moelle osseuse. TxCell prévoit de déposer son premier dossier réglementaire en vue d'initier une première étude chez l'homme à la fin du quatrième trimestre 2018. Encore à l'état de recherche, des CAR-Treg auraient pour vocation d'être utilisées dans des pathologies auto-immunes comme l'hémophilie A due à un déficit en FVIII ¹⁵⁷, ou certaines scléroses.

L'utilisation de cellules CAR-T est en plein essor dans le monde (avec plus de 220 essais répertoriés en 2016) et remplaceront peut-être un jour la greffe allogénique de CSH ainsi que de nombreux traitements anti-cancéreux (Figure 37).

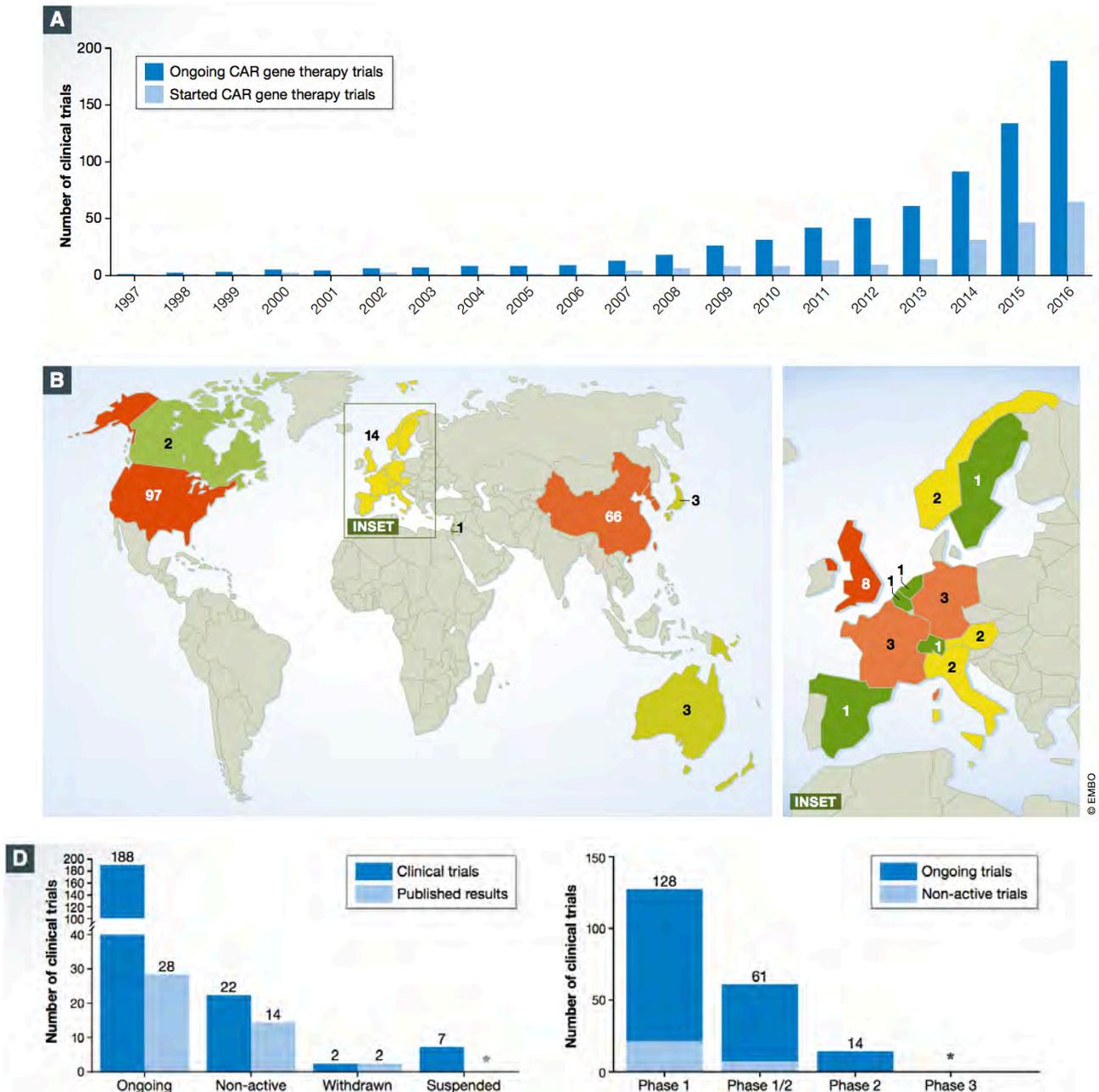


Figure 37 : Essor clinique des technologies à base de cellules CAR-T dans le monde ¹⁴³.

A. Nombre d'essais cliniques CAR en cours et débutants de 1997 à 2016 ; B. Répartition géographique des essais cliniques CAR en cours ; D. Etat et phases de développement des essais cliniques CAR.

3.6. Edition du génome

Un rêve devenu réalité pour les chercheurs est le développement d'outils pour la modification efficace et sûre de locus génomiques spécifiques dans les cellules. À ce jour, la délivrance de gènes a généralement reposé sur l'utilisation de vecteurs viraux avec une intégration aléatoire du génome dans l'ADN de l'hôte et leur difficulté inhérente à influencer et à modifier les niveaux d'expression génique. Au cours des dernières années, des «ciseaux» de gènes spécifiques comprenant des nucléases à doigt de zinc (ZFN)

¹⁵⁸, des nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALEN) ¹⁵⁹ et CRISPR / Cas9 (pour «*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/RNA-guided nuclease CAS9* ») ont été développés pour la modification efficace de n'importe quel locus génétique dans n'importe quel type de cellule ¹⁶⁰.

3.6.1. CRISPR/Cas9

L'outil d'édition du génome CRISPR / Cas9 guidé par l'ARN a particulièrement révolutionné les sciences fondamentale et appliquée de manière semblable à la réaction de polymérisation en chaîne (PCR) ouvrant la possibilité d'explorer et de manipuler le génome de manière très spécifique ¹⁶¹. Dans la nature, CRISPR / Cas9 fait partie d'un système de défense bactérienne vis-à-vis d'adénovirus. Concrètement, les cellules sont transfectées par un plasmide qui code la protéine Cas9 et une séquence d'ARN guide (Figure 38). Ces protéines forment un complexe qui reconnaît les séquences spécifiques d'ADN du gène d'intérêt et coupent la double hélice d'ADN. Soit la tentative de la cellule de réparer la cassure fait taire le gène en utilisant un processus appelé jonction d'extrémités non homologues, soit un gène de remplacement est introduit afin de remplacer le gène d'intérêt défectueux ; ce processus est appelé réparation dirigée par homologie.

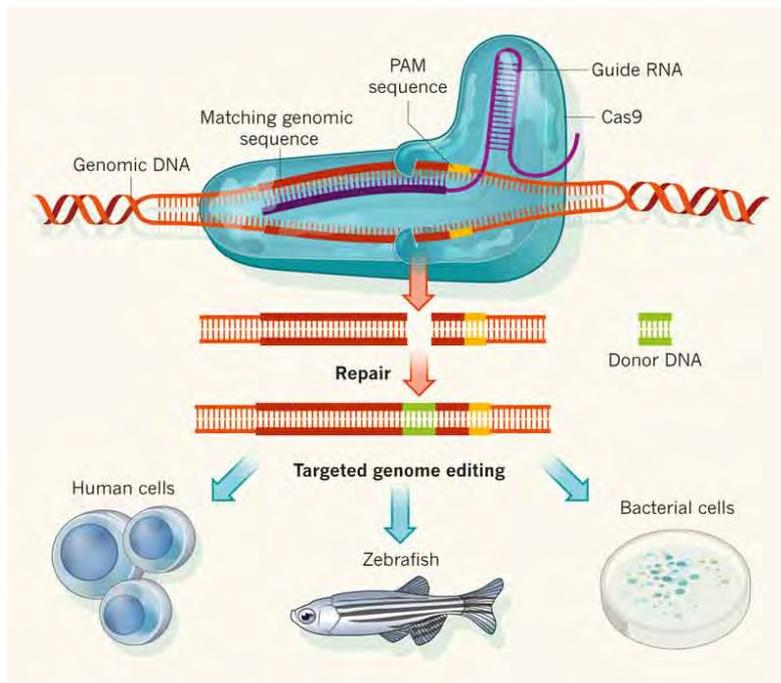


Figure 38 : Schéma d'action de la technologie d'édition du génome Crispr/cas9 ¹⁶².

L'édition du génome médiée par CRISPR / Cas9 est en développement et son applicabilité dans une variété de types de cellules comprenant des cellules souches embryonnaires et adultes telles que les CSH murines et humaines a été montrée. De plus, les génomes de zygotes de singes et humains ont été efficacement modifiés par CRISPR / Cas9, bien que les génomes aient également contenu des mutations indésirables hors cible (« off target ») ¹⁶³. La faisabilité de la modification du gène de la lignée germinale

(embryon) humaine a suscité des débats très médiatisés sur les implications éthiques de telles expériences, en Europe, la Convention d'Oviedo de 1997 (STE n°164) l'interdit. Encore aucun MTI utilisant cette technologie n'est pour l'instant commercialisé.

3.6.2. TALENs

A l'instar de CRISPR/Cas9, le mécanisme des TALENs a été découvert plus tôt en 2009 chez des bactéries : les xanthomonas, responsables de maladies chez différentes espèces de plantes. Il a été identifié chez ces bactéries des motifs TALE (pour « *transcription activator-like effector* ») : une succession de peptides capable d'interagir avec des séquences précises d'ADN de la plante hôte. Grâce à ce mécanisme, les Xanthomonas peuvent modifier l'expression de certains gènes du végétal pour favoriser leur croissance. Les chercheurs ont ensuite associé une nucléase (le plus souvent FokI) à ce mécanisme d'identification génétique. Cette nucléase est capable de couper les brins d'ADN. Pour parvenir à sectionner un gène, il faut associer deux TALENs, ayant chacun le rôle de couper l'un des brins de la double-hélice d'ADN (Figure 39).

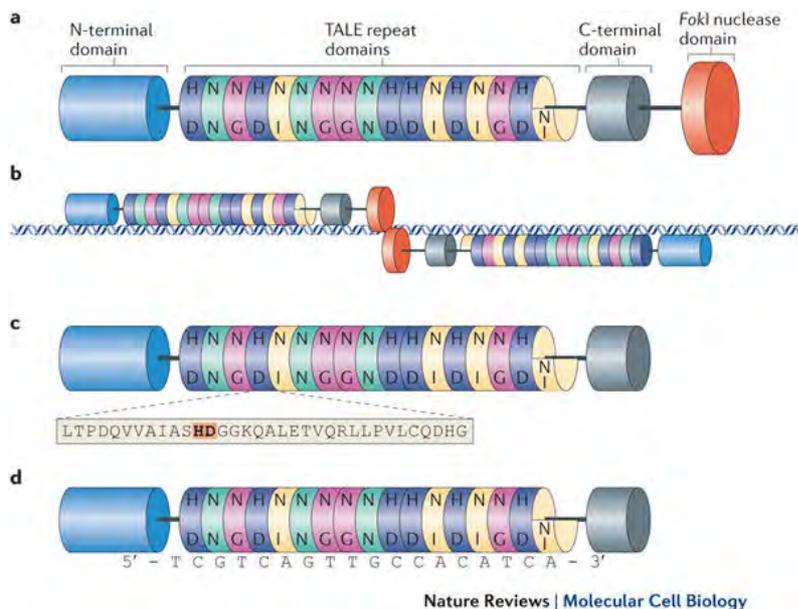


Figure 39 : La technologie TALEN ¹⁶⁴.

a. Les répétitions TALE sont représentées par des disques colorés. Les lettres à l'intérieur de chaque répétition représentent les deux résidus hypervariables. Les domaines N-terminaux et C-terminaux dérivés de l'activateur de transcription (TALE) qui sont requis pour la liaison à l'ADN sont indiqués. Le domaine nucléase non spécifique de l'endonucléase FokI est représenté en rouge. b. Les TALENs se lient et clivent en tant que dimères sur un site d'ADN cible. Le clivage par les domaines de nucléase FokI se produit dans la séquence "espaceur" qui se trouve entre les deux régions de l'ADN lié par les deux monomères TALEN. c. La séquence d'acides aminés d'une répétition TALE unique est étendue avec les deux résidus hypervariables et surlignée en orange et en gras. d. Le domaine de liaison à l'ADN dérivé de TALE est aligné avec sa séquence d'ADN cible.

Cependant, la création d'une TALEN est une opération plus onéreuse et moins accessible que la technologie CRISPR/Cas9 d'où l'engouement pour cette dernière. Utilisée par les UCART (« *Universal Chimeric Antigen Receptor T-cells* ») de l'entreprise Cellectis (en collaboration avec Servier et Pfizer), cette technologie TALEN permet de réprimer l'expression du TCR des LT, et de gérer ainsi des cellules allogéniques dépourvues de risque immunogène ⁸⁸. Les résultats des premiers essais cliniques de UCART ont été présentés lors du 44^{ème} congrès de l'*European society for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT) en mars 2018 : 2 études de phase 1 évaluant UCART19, cellules CAR-T allogéniques anti-CD19 dans la LAL-B CD19+ chez l'adulte et l'enfant.

La première étude, **CALM** (pour « *UCART19 in Advanced Lymphoid Malignancies* »), est une étude ouverte d'escalade de dose évaluant la sécurité, la tolérance et l'activité anti-leucémique d'UCART19 chez des patients adultes atteints d'une LAL-B CD19+, en rechute ou réfractaire. Parmi les 9 patients traités (âge médian : 23 ans), 4 avaient reçu 1 à 3 traitements antérieurs et 5 avaient reçu 4 traitements ou plus. Six patients ont reçu une dose totale de 6×10^6 cellules UCART-19 et 3 entre 6 et 8×10^7 cellules. Six réponses complètes ont été observées dont 5 avec négativation de la MRD en cytométrie de flux (FACS) ou qPCR, qui ont toutes pu recevoir une transplantation de cellules souches allogéniques. Quatre patients sont décédés, 1 de toxicité (neutropénie septique), 1 de progression de la maladie et 2 après transplantation allogénique, l'un d'infection et l'autre d'une hémorragie pulmonaire, alors qu'ils étaient MRD négatifs. L'essai se poursuit à la dose de 6 à 8×10^7 cellules.

La seconde étude, **PALL** (pour « *Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia* ») est une étude de phase I ouverte, non comparative, évaluant la sécurité et la capacité d'UCART19 à induire une rémission moléculaire chez des patients pédiatriques atteints de LAL-B CD19+, en rechute ou réfractaire. Elle a inclus à ce jour 6 patients (âge médian : 3,75 ans). Un patient n'avait reçu qu'un traitement antérieur, 2 avaient reçu 3 traitements et 3 avaient reçu 4 traitements ou plus. Tous les 6 étaient en rémission complète entre 28 et 42 jours après la perfusion d'UCART19 (2×10^7 cellules au total ou entre $1,1$ et $2,3 \times 10^6$ cellules / kg). La MRD s'est négativée chez 5 patients (FACS) et chez 3 patients (PCR). Cinq des six patients ont reçu une transplantation allogénique. Tous les patients ont développé un syndrome de relargage cytokinique (CRS), mais qui a toujours été d'évolution favorable. Trois patients sont en vie à 1,5, 10 et 11 mois dont 2 avec une négativité persistante de la MRD. Par ailleurs, deux enfants traités dans le cadre d'un programme compassionnel étaient toujours en vie et en rémission 24 et 30 mois après transplantation allogénique. Ces résultats sont encore très préliminaires et devront de toutes les façons être mis en perspective avec ceux obtenus avec les CAR-T autologues.

3.6.3. Zinc Finger Nucléases

La technologie des nucléases à doigts de zinc ou « zinc finger nucléases » (ZFN) fait appel à des protéines hybridées générées à partir de la fusion de gènes codant des protéines à doigts de zinc, qui permettent l'interaction avec une séquence d'ADN spécifique, et qui sont associées à une nucléase à l'image de la technologie TALEN.

L'édition du génome clinique a été décrite pour la première fois en 2009 en utilisant le gène ZFN du récepteur du VIH (CCR5) dans des cellules T CD4 + autologues de patients VIH ¹⁶⁵, et un essai d'édition de gènes basé sur ZFN pour prouver la faisabilité d'un traitement génétique chez des patients hémophiles est en cours ¹⁶⁶. Le potentiel de cette technologie pour une thérapie génétique présentant de multiples mutations pathogènes telles que la β -thalassémie ou les déficiences immunitaires primaires est actuellement à l'étude ¹⁶⁷ {deBruin:2015dj}. Ces technologies possèdent différents avantages et inconvénients (Tableau 13).

Tableau 13 : Résumé des technologies d'édition du génome

Propriétés	CRISPR/Cas9	ZFN	TALEN
Reconnaissance	ARN-ADN	Protéine-ADN	Protéine-ADN
Spécificité (off-target)	Non spécifique	Non spécifique	Spécifique
Construction	Un ARN de 20 nucléotides fusionné à un ARN trace et à une endonucléase cas 9.	Séquence en doigt de zinc qui reconnaît spécifiquement une séquence de 3 bp liée à FokI.	Séquence de protéines spécifiques liée à une séquence nucléotidique et à une nucléase de type FokI.
Mécanisme d'action	Induire une rupture à double brin. Le résultat peut être une NHEJ ou HDR. Dépend de la conception de l'outil.		
Fabrication	Le plus facile ; Requiert un simple clonage d'adaptateur d'oligonucléotides de 20nt ciblant chaque gène et exprimés dans un plasmide.	Requiert un composant protéique spécifique pour chaque séquence.	Challenge technique du aux séquences répétées.

(Source : ©Microboids)

4. Résumé des technologies utilisées

Les innovations biotechnologiques transparaissent grandement dans le paysage des essais cliniques et des MTI actuellement commercialisés.

Nous pouvons donc résumer les MTI à l'utilisation de :

- **Cellules souches** : iPSC, CSH, CSM, Cellules progénitrices adultes (neurone, foie, coeur...); etc
- **Immunothérapie cellulaire** : cellules T ; CAR-T ; TCR ; cellules NK ; TIL ; etc.
- **Ingénierie tissulaire** : cultures cellulaires complexes en 3D avec ou sans biomatériaux,
- **Nouveaux vecteurs** : synthétiques ; AAV ; LV ; RTV ; AD ; etc.
- **Edition du génome** : CRISPR/Cas9 ; TALENs ; ZFN ; etc.
- **Constructions d'expression de nouvelle génération** : nouvelles capsides ; des éléments de régulation innovants incluant des promoteurs synthétiques ; des éléments inductibles pour réguler l'expression génique dans le temps ou en réponse à des stimuli externes : interrupteurs d'arrêt moléculaire pour améliorer la sécurité ; etc.

CHAPITRE III : LES DÉFIS DU DÉVELOPPEMENT DES MTI EN PRATIQUE

Les MTI représentent une opportunité incroyable de changer la vie de patients atteints de maladies incurables *via* les nombreuses technologies précédemment évoquées. Toutefois, si ces thérapies ne sont pas délivrées à temps, tant au niveau clinique que logistique, leur bénéfice sera sans importance. La grande variété de MTI cellulaires et géniques et leur labilité engendre de nouveaux défis à relever lors du développement par rapport au cycle pharmaceutique traditionnel. Kymriah® est arrivé des essais cliniques sur le marché en seulement 5 ans comparé aux 10 ans en moyenne des médicaments classiques, et beaucoup d'industriels envisagent de raccourcir encore un peu plus ce temps. De ce fait, avec l'évolution des pratiques, l'établissement d'un circuit pharmaceutique robuste est nécessaire pour garantir le bon déroulement lors de l'arrivée de ces thérapies (Figure 40).

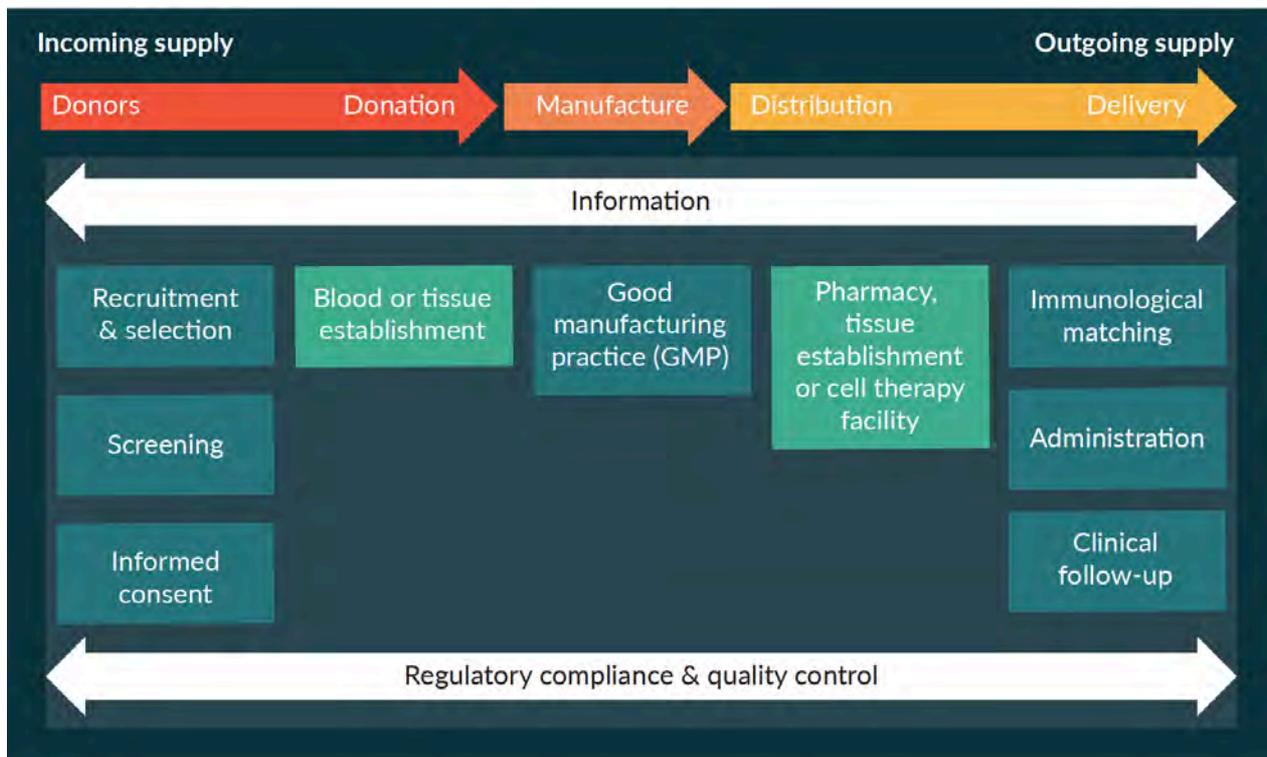


Figure 40 : Schéma du circuit d'un MTI ¹⁶⁸.

1. L'approvisionnement des matières premières

1.1. Gérer la grande variabilité des matières de départ

L'aspect original de la plupart des MTI est que leurs **matières de départ** (« **Starting Materials** ») sont des cellules ou tissus de patients ou issus de dons, donc prélevés sur un site clinique. Les matériaux de départ sont définis « comme des matières utilisées pour la synthèse du principe actif, qui sont incorpo-

rées en tant qu'élément de la composition de la substance intermédiaire ou finale » ¹⁶⁹ (ex. tissu adipeux, leucaphérèse, moelle osseuse). Le don, l'obtention et les analyses de cellules ou tissus humains doivent être en accord avec les directives tissus/cellules (2004/23/EC, 2006/17/EC, 2006/86/EC) ou la directive des cellules dérivées du sang (2002/98/EC) et doivent avoir lieu dans des **établissements agréés**. Celles-ci s'appliquent tant aux dons allogéniques qu'autologues.

Les produits **allogéniques** peuvent provenir d'un seul don ou d'un pool d'un faible nombre de dons qui forment la **banque de cellules principales** (« master cell bank »). Cette banque de cellules principales sera divisée en plusieurs banques de cellules de travail (« working cell bank ») qui aboutiront à la production de différents lots de MTI cliniques (Figure 41). Puisque ces banques sont en quantité limitée, un des défis majeurs des thérapies allogéniques est la **reproductibilité des lots de MTI produits et des résultats cliniques** relativement variable selon les lots de MP. Une attention particulière devra donc être portée très tôt dans le développement de ces MTI afin de sélectionner les « meilleurs » donneurs pour l'application clinique recherchée. Dans le cas de cellules souches mésenchymateuses en vue d'une régénération osseuse, il peut être pertinent de sélectionner les donneurs selon différents critères, à savoir le nombre de CFU-F (tests clonogéniques) reflétant le nombre de progéniteurs, la vitesse de prolifération ou encore leur capacité de différenciation ostéoblastique *in vitro*. Mais il sera crucial d'étudier la reproductibilité sur plusieurs banques de cellules principales dans le cas d'une rupture de stock due à une forte demande ou dans le cas d'un incident lors de la conservation (ex. défaillance du système de distribution d'azote liquide ou des cuves d'azote).

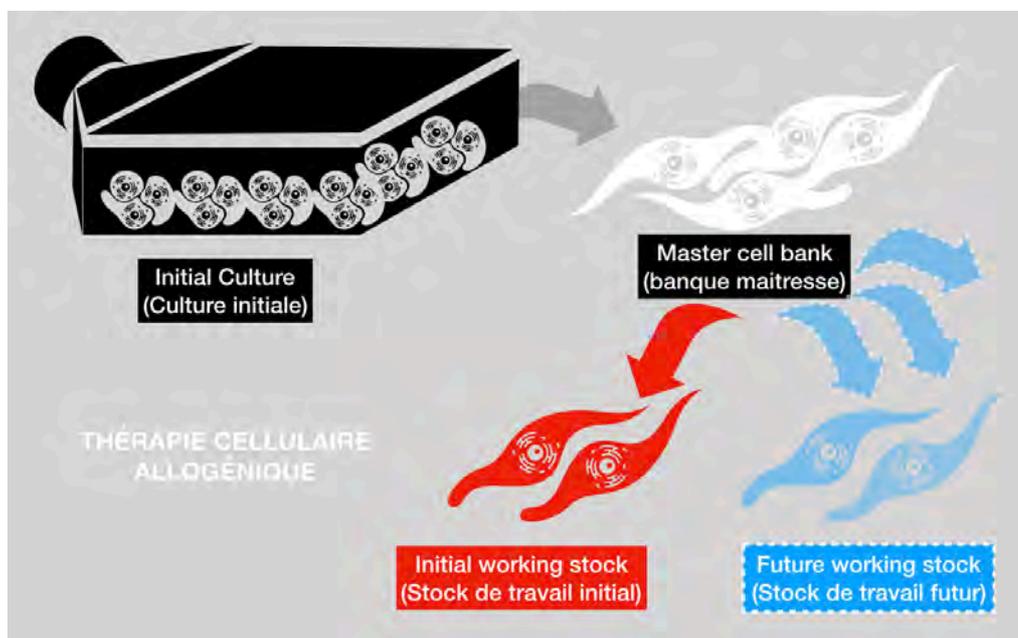


Figure 41 : Schéma de la gestion des stocks cellulaires allogéniques dans un établissement pharmaceutique.

Les produits **autologues** sont quant à eux spécifiques d'un patient. Ils doivent faire face à ce même défi de reproductibilité inter-individu à ceci près qu'une sélection de la MP n'est intrinsèquement pas envisageable. Dès lors, la robustesse du procédé de prélèvement, de fabrication et des contrôles qualité reste la seule option à disposition pour améliorer l'efficacité clinique du MTI.

1.2. Le contrôle des matières premières : un enjeu sécuritaire

Le **contrôle des matières premières** fait partie de la stratégie globale de contrôle pour tout médicament ^{170 171} 7. Un mauvais contrôle des matières premières contribuera probablement à la variabilité du produit et pourrait même avoir une incidence sur la sécurité du MTI. Parce que le producteur est finalement responsable de la sécurité de ses produits, il est impératif qu'il comprenne parfaitement l'origine et la qualité des matières premières qu'il utilise. Pour atteindre ce niveau de connaissance de chacune des matières premières utilisées, il est nécessaire que le producteur établisse un **dialogue ouvert et honnête** avec l'ensemble de ses fournisseurs. L'accord doit contenir des dispositions claires en ce qui concerne « *le transfert d'informations et notamment sur les tests effectués par le fournisseur, les données de traçabilité et les informations relatives à l'état de santé du donneur dans le cas des matériaux de départ* » 7.

Selon les bonnes pratiques de fabrication, les MP sont distinguées en « **Starting materials** » & « **Raw materials** » définies comme toutes autres substances utilisées dans la production ou l'extraction de la substance active mais qui ne dérivent pas directement de celle-ci.

L'ensemble de ces matières premières est réceptionné par le producteur et **mis en quarantaine** avant l'étape de contrôle menant à la libération de ces MP pour leur utilisation dans le processus de fabrication. L'établissement de **fiches de spécifications et d'acceptabilité** en fonction des référentiels qualité en vigueur (tels que les monographies de la Pharmacopée, les autorisations d'essais clinique ou de mise sur le marché ainsi que les BPF 6.20 Eudralex Vol.4) guideront les différents échantillonnages et tests à réaliser sur ces différentes matières premières.

Ces **tests** déterminés d'après une approche basée sur le risque doivent être focalisés notamment sur le risque de **contamination**. Dans le cas des matières premières non biologiques, il advient de s'assurer de leur **stérilité** et dans le cas de la matière première de départ d'origine biologique de la **sécurité** bactérienne et virale (Hépatites B/C/E, VIH-1/2, HTLV, syphilis ou encore virus de West Nile) et la transmission d'encéphalopathie spongiforme animale. Il est important de reconnaître qu'un résultat « positif » d'une matière de départ contrairement aux autres matières premières ne signifie pas forcément l'exclusion de la production. Un MTI autologue généré à partir de cellules présentant déjà une contamination virale peut être administré à ce même patient et avoir un intérêt thérapeutique (ex. cas d'un CAR-T anti-leucémique B autologue produit à partir de lymphocytes T chez un patient séropositif VIH). L'importance est d'obtenir le plus rapidement possible (voire même en amont de la production) le **statut infectieux** du

patient prélevé afin de protéger non seulement les scientifiques et les techniciens lors des manipulations de ces matières premières contaminées, mais surtout l'environnement de production pour éviter le **risque de contamination croisée** avec d'autres produits ou lots.

Chaque MP doit également être **échantillonnée** sauf si une justification permet de limiter le nombre de MP prélevées. Cette exemption est limitée aux fournisseurs ne produisant qu'un seul produit et aux MP provenant directement de fabricants, audités et approuvés dans des récipients scellés. Des méthodes statistiques sont appliquées pour déterminer le nombre d'échantillons en fonction de la taille du lot. Le but de l'échantillonnage est de contribuer à la traçabilité d'un lot de MTI produit. Les exigences de base concernant l'échantillonnage sont décrites dans la partie 1 du chapitre 6 des BPF 7.

Une procédure écrite doit décrire :

- la méthode d'échantillonnage,
- le matériel à utiliser,
- la quantité d'échantillon à prélever,
- les instructions pour toute division de l'échantillon,
- le type et la nature du récipient à utiliser pour le prélèvement,
- l'identification des contenants prélevés,
- toute précaution particulière à observer lors de l'échantillonnage de produits stériles et dangereux,
- les conditions de stockage,
- les instructions de nettoyage et de stockage du matériel de prélèvement.

Cas particulier des MP à AMM : Les médicaments possédant une AMM et étant utilisés dans la production de MTI (ex : héparine) sont déjà libérés par l'établissement pharmaceutique fournisseur. Une analyse de risque peut montrer qu'il n'est pas nécessaire qu'ils subissent autant de tests que d'autres MP sans AMM (comme le sérum de veau foetal, la collagénase, la trypsine...), toutefois ces substances feront l'objet d'un échantillonnage et d'un contrôle visuel tracé par lot.

Cas pratique : Illustrons ces propos par la mise en place d'un tel outil d'aide au contrôle des matières premières réalisée à la plateforme EFS des MTI à Toulouse. L'établissement de fiches de spécifications et d'acceptabilité a permis de mettre en lumière 6,5% de lots non conformes aux exigences qualité définies en interne. Ce contrôle en amont de la production a mis en lumière un certain nombre de problèmes en terme d'intégrité et d'inviolabilité des MP, limitant ainsi les répercussions potentiellement délétères sur la stérilité des lots de produits finis ([Annexe 4](#)).

Les milieux de culture cellulaire de mammifères sont des MP critiques, puisqu'ils conditionnent la croissance des cellules. Ils sont composés d'eau, glucose, acides aminés, sels, vitamines, lipides et protéines apportés synthétiquement, et par l'adjonction de lysat plaquettaire humain (HPL) ou sérum de veau foetal (FBS).

La tendance actuelle de culture cellulaire en conditions « xeno-free » (sans produits d'origine animale) pousse les industriels et scientifiques à utiliser de plus en plus le HPL que le FBS ¹⁷². Cependant, ces ajouts issus de matières biologiques apportent une variabilité notamment pour le HPL et nécessitent d'être bien contrôlés notamment par des fiches de spécifications et d'acceptabilité avant d'être utilisés pour la fabrication d'un MTI (Figure 42).

La variabilité du HPL est due à ses étapes de fabrication à partir de concentrés plaquettaires de plusieurs donneurs. En effet, les différentes techniques de préparation mènent à des concentrations de leucocytes différents (+/- filtration des leucocytes), à une dilution variable des facteurs de croissance lors du remplacement du plasma (par une solution additive) ou lors de l'inactivation virale (photo-inactivation par rayonnement ultra-violet +/- psoralène ou vitamine B12, voire rayonnement gamma). La production de HPL reste donc un défi dans le domaine des biotechnologies et impacte fortement la production de MTI en aval par une variabilité des MP en amont.

Exemple de fiche de spécifications d'un FBS, matière première intervenant dans la composition des milieux de culture cellulaire (Figure 42). Un lot de FBS avant d'être libéré, doit être **identifié** en utilisant par exemple un test électrophorétique permettant de séparer les différentes protéines, puis de doser ces protéines (Ph. Eur. 2.5.33) et son osmolalité (Ph. Eur. 2.2.35) en établissant des critères d'acceptation et de rejet du lot. Les **impuretés** doivent être recherchées : dans le cas présent la présence d'hémoglobine par spectrophotométrie. La recherche de **contaminants** est primordiale notamment par des tests d'endotoxines (Ph. Eur. 2.6.14), de stérilité (Ph. Eur. 2.6.1), de mycoplasmes (Ph. Eur. 2.6.7) et de virus bovins pour le FBS. Enfin, des tests de **fonctionnalité** peuvent être entrepris pour vérifier l'efficacité du produit, en l'occurrence pour le FBS par des tests de croissance cellulaire matérialisés par le calcul de temps de doublement de population par exemple.

▶ TABLE 3
Example dossier (3.2.S.2.3) information for biological raw materials.

A. Biological raw materials			
Raw material	Grade	Supplier	Process step(s)
Collagenase	In-house	Super Enzymes Ltd	Step 1
Fetal bovine serum (FBS)	In-house	Sera Supplies Inc.	Steps 2, 3
Porcine trypsin	In-house	Super Enzymes Ltd	Steps 3, 4
B. Example of incoming raw material testing; FBS			
Test	Test method	Acceptance criteria	Test
Identification			
Identity	In-house (electrophoresis)	Complies with reference	Identity
Assay (biological activity)			
Growth test	In-house (population doubling time, PDT)	PDT, 24–36 hours	Growth test
C. Specification, FBS			
Test	Test Method	Acceptance Criteria	
Identity			
Identity	In-house (electrophoresis)	Complies with reference	
General tests			
Osmolality	Ph. Eur. 2.2.35	280–365 mosmol/kg	
Total protein	Ph. Eur. 2.5.33	30–45 mg/mL	
Impurities			
Hemoglobin	In-house (spectrophotometry)	<4 mg/mL	
Contaminants			
Endotoxins	Ph. Eur. 2.6.14 (LAL method)	<10 IU/mL	
Sterility	Ph. Eur. 2.6.1	No growth	
Mycoplasmas	Ph. Eur. 2.6.7	No growth	
Bovine viruses†	<i>In vitro</i> diagnostic test kits	Not detected	
Assay (biological activity)			
Growth test	In-house (population doubling time, PDT)	PDT, 24–36 hours	

†Not listed here to simplify table.
 Further details of control of adventitious agents are also included in 3.2.A.2 of the CTD.

Figure 42 : Exemple d'une fiche de spécifications et d'acceptabilité d'un sérum de veau foetal (FBS) en condition BPF ¹⁷².

L'ensemble de ces tests réalisés par le fournisseur et/ou le producteur sont récapitulés dans une fiche de spécifications et d'acceptabilité établie par lot de matière première et/ou par livraison d'un même lot (définie selon l'analyse de risque de l'établissement). Ces documents à conserver dans les archives servent à la sortie de quarantaine et la libération par le responsable contrôle qualité des lots de MP afin de démarrer la production de MTI en ayant minimisé les risques de non-conformité.

1.3.La stabilité des matières de départ influence le modèle de production

Avec les thérapies allogéniques, bien que des dépenses significatives ont été faites sur la localisation, le consentement et la collection du don initial, l'expédition est unique et relativement simple à coordonner. Cependant, l'envoi de don autologue peut être plus complexe et problématique que la délivrance du produit fini. Ceci étant dû au fait que le transport est souvent réalisé à des températures relativement élevées (2-8°C) dans lesquelles les cellules ont une durée de vie réduite, alors que la plupart des produits finis sont ou seront éventuellement envoyés et conservés congelés. L'impact de ces exigences astringentes augmente considérablement le coût du circuit des MTI à moins que les centres de prélève-

ment/production soient proches des patients. Cette alternative est illustrée par le développement de Strimvelis® où les patients doivent voyager depuis l'Europe entière jusqu'à Milan, où se trouve le seul centre habilité à fabriquer le produit ; la durée de vie des cellules modifiées étant très courte et celles-ci devant être réinjectées sous six heures.

La survie cellulaire peut dans certains cas être augmentée par la cryopréservation (ex. CART anti-CD19). Toutefois, si cette étape n'a pas été prévue au début des essais cliniques, le producteur aura l'obligation de re-valider l'ensemble de son procédé de fabrication afin de montrer l'innocuité de la cryoconservation sur l'efficacité et la toxicité de son MTI.

La stabilité des matières de départ influence donc fortement le circuit et plusieurs modèles de production peuvent être envisagés :

- **Cas 1 : Production centralisée** - la matière première biologique de départ et le MTI doivent être suffisamment stables pour le transport dans différents sites géographiques, dans le cas contraire il faut faire venir les patients (ex. Strimvelis®).
- **Cas 2 : Production centralisée avec un pré-traitement de la matière initiale régionalisé** - Le don labile peut être pré-traité à l'hôpital ou dans un centre partenaire sous-traitant (ex. EFS) afin d'augmenter sa stabilité (ex. séparation et congélation de cellules mononucléées à partir d'un prélèvement sanguin) puis envoyé dans le centre producteur.
- **Cas 3 : Production décentralisée** - où les dons labiles sont rapidement envoyés aux différents centres de production MTI régionalisés ou sous-traitants.

Le cas 1 est le plus sûr et le moins complexe d'un point de vue production. Le cas 2 peut être un modèle plus économique et peut faire intervenir des entreprises de sous-traitance pour le pré-traitement, évitant un trop grand investissement. Le cas 3 semble attractif mais le risque pour le producteur est important notamment du fait du peu d'hôpitaux qui produisent des MTI et du faible nombre de laboratoires travaillant en conditions BPF. De plus l'ouverture de plusieurs sites est coûteux en temps (transfert technologique, audit) et argent (personnel, BPF).

Le choix du modèle de développement n'est pas uniquement relatif à la stabilité des matières premières mais également à l'incertitude de la balance offre/demande, la complexité de fabrication et la stabilité du produit fini ([Figure 43](#)).

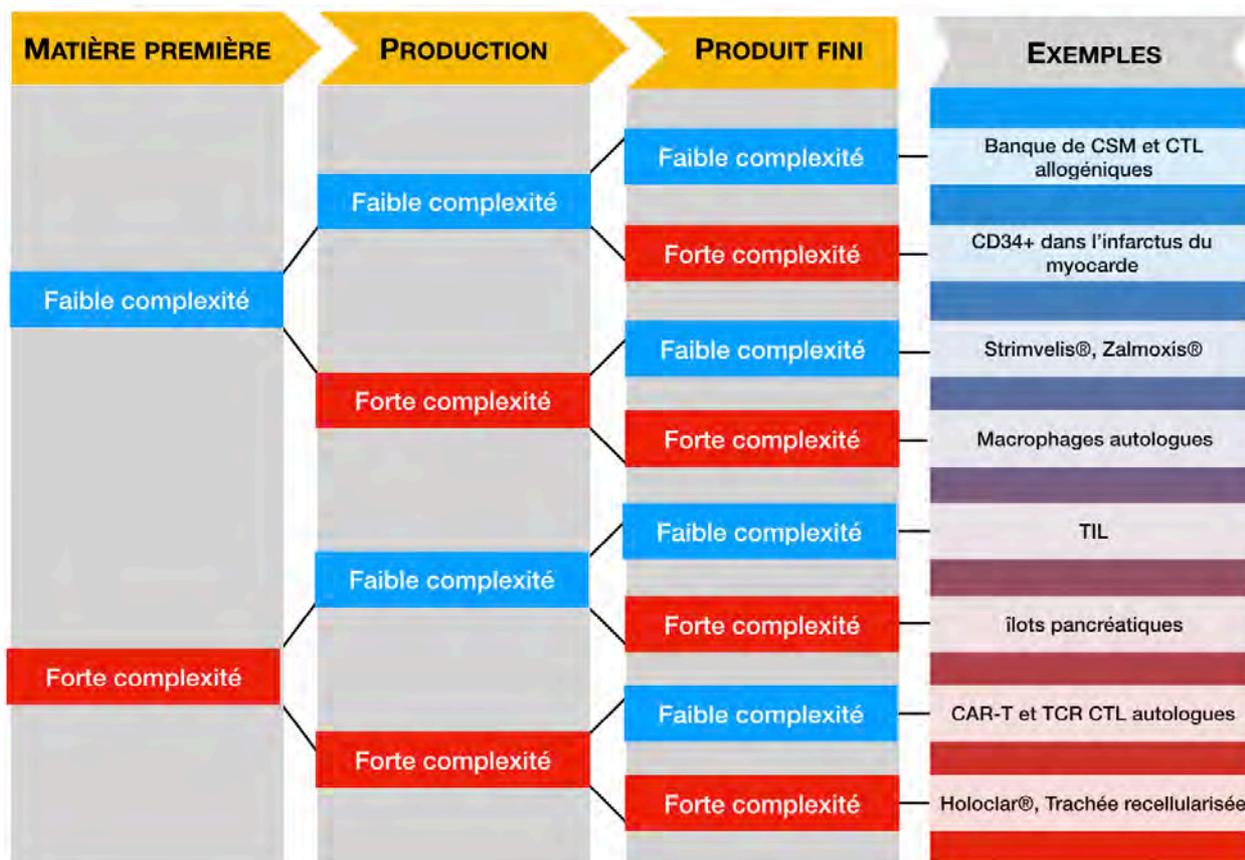


Figure 43 : Diagramme décisionnel du modèle de développement des MTI selon la complexité du circuit ¹⁶⁸.

Holoclar® est une cornée autologue produite à partir de cellules souches adultes épithéliales pour le traitement de la déficience en cellules souches limpides causée par une brûlure. Une biopsie cornéenne est prélevée de l'oeil normal du patient localement et expédiée à un centre de fabrication européen où le produit est fabriqué sous 10 à 14 jours, puis renvoyé pour l'implantation chirurgicale. Ainsi l'approvisionnement et la demande (qui sont liés) sont incertains et la production décentralisée. L'ensemble du circuit est complexe avec un matériel de départ et un MTI labiles, une fabrication assez compliquée, et une longue logistique aller/retour en concordance avec une planification chirurgicale.

Strimvelis® est une thérapie génique *ex vivo* de CSH autologue pour SCID-ADA - une forme rare de d'immunodéficiences congénitales. En principe, le fabricant fait face aux mêmes défis de complexité du circuit qu'Holoclar® mais par la nature ultra-orpheline de la maladie (peu de patients), l'entreprise GSK a trouvé plus efficace de transporter le donneur / patient (un et le même) près du centre de fabrication. Cette solution présente l'avantage de faciliter l'administration et d'être suivi par une équipe clinique spécialiste de la pathologie.

Zalmoxis® est une cellule T allogénique génétiquement modifiée avec un vecteur rétroviral codant pour une forme tronquée du récepteur humain low affinity nerve growth factor (Δ LNGFR) et de la thymidine kinase de l'*Herpes simplex virus 1* (HSV-TK Mut2). Cette thérapie génique est utilisée comme traitement adjuvant chez les patients adultes atteints d'hémopathies malignes à haut risque subissant une greffe de CSH haplo-identique. Les fabricants font face aux mêmes défis de complexité qu'Holoclar®, mais le matériel de départ (cellules T donneuses) peut être cryoconservé, permettant ainsi une logistique plus judicieuse dans le temps et l'espace.

2. Les défis de la mise en place d'une plateforme de production

2.1. La conception et qualification des locaux de production

La plupart des MTI sont issus de cellules vivantes qui ne peuvent être stérilisées, ils requièrent donc une production dans des conditions **aseptiques**. La première fonction d'un local est d'assurer la qualité du produit. Ce local a pour but de réduire le **risque de contaminations particulière et microbiologique**. Inversement un local adéquat à l'usage doit dans certains cas protéger l'environnement contre le risque de dispersion d'organismes génétiquement modifiés dans la nature. C'est le cas des médicaments de thérapie génique répondant à la réglementation OGM, et en France respectant les recommandations du manuel du Haut Conseil des Biotechnologies (HCB) pour l'utilisation confinée d'OGM. La conception d'une salle blanche aseptique diffère donc du type de MTI produit à l'intérieur. C'est l'un des défis les plus importants à relever dans le développement d'un MTI car il conditionnera l'ensemble de la production, et les modifications en cas de défaut se révèlent souvent laborieuses, onéreuses et chronophages.

2.1.1. La conception des locaux de production

Selon les directives européennes, « Leur plan, leur agencement, leur conception et leur utilisation doivent tendre à minimiser les risques d'erreurs et à permettre un nettoyage et un entretien efficaces en vue d'éviter les contaminations, dont les contaminations croisées, le dépôt de poussières ou de saletés et, de façon générale, toute atteinte à la qualité des produits »⁷. En effet, cette salle blanche (Figure 44) est une **zone à atmosphère contrôlée** (ZAC) qui a pour principes de :

- Minimiser la **génération de particules** internes : en choisissant des matériaux de construction spécifiques, en éliminant les points d'accumulation (plinthes arrondies et minimisation du nombre d'étagères) et en facilitant le nettoyage et la décontamination.
- Être en **pression différentielle** positive (ou négative si OGM selon les BSL « Biological Safety Levels ») empêchant la contamination particulière de pénétrer dans la salle blanche (ou d'empêcher la dissémination des OGM en dehors de la salle) et éliminant la contamination produite par les manipulateurs. Concevoir une cascade de pression est essentielle et fait intervenir la création de sas entre la

ZAC et l'environnement. La différence de pression entre ces deux environnements est de +/- 10-15Pa. Ces sas sont notamment utilisés pour l'habillage et déshabillage du personnel en entrée et sortie en ZAC. La création de passe-plats (petit sas dans le mur) permet le transfert du matériel (MP, produit fini, et déchets) correspondant à un flux différent de celui des manipulateurs.

- Empêcher l'entrée de particules et micro-organismes vers la ZAC et permettre l'évacuation de celles générées par l'intermédiaire d'une **centrale de traitement d'air** (CTA). Cette CTA permet de maintenir la surpression (ou dépression) requise en fonction de la classe des zones, d'assurer le nombre de renouvellements d'air (en volume d'air/heure) requis pour la santé des occupants selon des normes d'hygiène et sécurité du lieu de travail (hors BPF), et de garantir un nombre de brassage d'air déplacé (en nombre de brassage/heure) requis par les normes pharmaceutiques (BPF). L'air entrant dans une ZAC est contrôlé notamment par des **filtres HEPA** (à haute efficacité sur les particules aériennes), dispositifs capables de filtrer, en un passage, au moins 99,97 % des particules de diamètre supérieur ou égal à 0,3 µm.

Ces ZAC sont classées en fonction du degré de propreté de A à D et doivent être choisies en fonction de l'activité réalisée à l'intérieur (Tableau 14). La préparation même d'un MTI est réalisée dans une zone classée A (équipement de laboratoire) :

- sous un poste de sécurité microbiologique (PSM) à flux laminaire installé dans une ZAC classée B généralement,
- ou dans un isolateur hermétique installé dans une ZAC de classement inférieur C ou D car le risque de contamination d'un isolateur par le manipulateur et l'environnement est moins important qu'avec un PSM (semi-ouvert sur l'extérieur).

CLASSE	AU REPOS		EN ACTIVITE	
	Nombre maximal autorisé de particules par m ³ de taille ≥ a			
	0,5 µm	5 µm	0,5 µm	5 µm
A POSTE DE TRAVAIL SOUS FLUX LAMINAIRE	3.500	1	3.500	1
B	3 500	1	350 000	2 000
C	350 000	2 000	3 500 000	20 000
D	3 500 000	20 000	NON DEFINI	NON DEFINI
LIMITES RECOMMANDÉES DE CONTAMINATION BIOLOGIQUE				
CLASSE	Échantillon d'air ufc/m ³	Boîte de Pétri (Ø 90 mm) ufc/4 heures	Géloses de contact (Ø 55 mm) ufc/plaque	Empreintes de gants (5 doigts) ufc/gant
A	< 1	< 1	< 1	<< 1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	/
D	200	100	50	/

Tableau 14 : Recommandations BPF des limites des contaminations particulaire et microbiologique selon les différentes classes et l'activité (UFC : Unité Formant Colonie)⁷.

Concevoir ce type d'environnement doit également comprendre la **gestion des flux** dans sa réflexion. Le but étant d'optimiser les déplacements du personnel, des matières, des produits et des déchets pour minimiser les risques de contamination des produits due à l'intervention humaine. La conception des salles, couloirs, et sas devra prendre en compte ces flux en évitant de les croiser le plus possible.

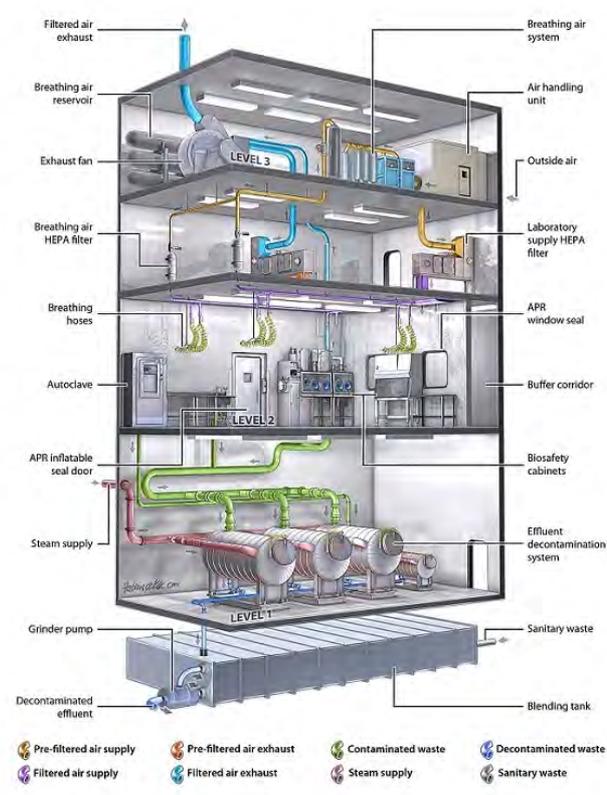


Figure 44 : Illustration des différentes zones et matériaux composant une zone de production de MTI de qualité BPF

Source : © NIAID

2.1.2. La qualification des locaux de production

Une fois construite, ces zones ainsi que les équipements sont qualifiés pour leur utilisation en production à visée clinique. L'industriel doit établir un plan de validation (ou VMP « Validation Master Plan ») qui présente et justifie la démarche de qualification qui sera mise en oeuvre par la suite. On distingue différents niveaux de qualifications qui sont énumérés dans les BPF : QC, QI, QO, et QP.

- Qualification de la conception (QC)

Le premier élément de la validation de nouvelles installations, systèmes ou équipements est la qualification de la conception (QC). La conformité de la conception aux BPF doit être démontrée et documentée.

- Qualification de l'installation (QI)

La qualification de l'installation (QI) doit être réalisée sur les installations, systèmes et équipements neufs ou ayant subi des modifications. La QI doit vérifier qu'ils sont conformes à la conception approuvée et aux recommandations du fabricant.

- Qualification opérationnelle (QO)

La qualification opérationnelle (QO) doit succéder à la qualification de l'installation conforme. La QO doit vérifier si ces installations, systèmes et équipements fonctionnent comme prévu sur toute la gamme d'exploitation en fonction des procédés de fabrication, mais aussi dans des cas de conditions critiques ou «pire cas» (« worst case »). Le fait de franchir avec succès le stade de la qualification opérationnelle doit permettre d'achever les procédures d'étalonnage, d'exploitation et de nettoyage, la formation des opérateurs et les exigences en matière d'entretien préventif. Elle doit permettre une « libération » officielle des installations, systèmes et équipements.

- Qualification des performances (QP)

La qualification des performances (QP) doit suivre le passage réussi des stades de qualification installation et de qualification opérationnelle. La QP doit vérifier si ces installations, systèmes et équipements sont en mesure de fonctionner de façon efficace et reproductible au cours du temps. Elle s'effectue avec les opérateurs en place et les équipements en activité.

Pour chacune de ces étapes de qualifications, la démarche de traçabilité documentaire doit comporter le protocole, les tests et le rapport. Ces documents doivent être conservés dans le cas d'audit par les instances nationales de santé. Cette démarche peut se résumer à l'adage :

« Ecrire ce que l'on doit faire ; Faire ce que l'on écrit ; Ecrire ce l'on a fait »

2.2. Validation d'un procédé de production

Un procédé de production est généralement segmenté en une série d'étapes fonctionnelles qui peuvent différer entre les types de cellules et en fonction des besoins spécifiques du produit.

Un processus typique pour les produits à base de **cellules** suit ces étapes (Figure 45) :

- Réception du matériel de départ (par exemple, aphérèse ou moelle osseuse, ou éventuellement lignée cellulaire / banque de cellules pour les thérapies allogéniques) ;
- Traitement des cellules - Lavage pour éliminer la majorité des types cellulaires indésirables ;
- Sélection / enrichissement - Sélection des cellules cibles ou enrichissement ;
- Ingénierie cellulaire - Activation, modification génétique ;
- Culture cellulaire - Amplification dans des flasques statiques ou bio-réacteurs (environ 1 à 30 jours) ;

- Traitement des cellules - Lavage pour éliminer les impuretés ;
- Formulation du produit - Réduction du volume, formulation et potentiellement cryoconservation ;
- Stockage / expédition du produit final sur le site clinique pour la perfusion du patient.

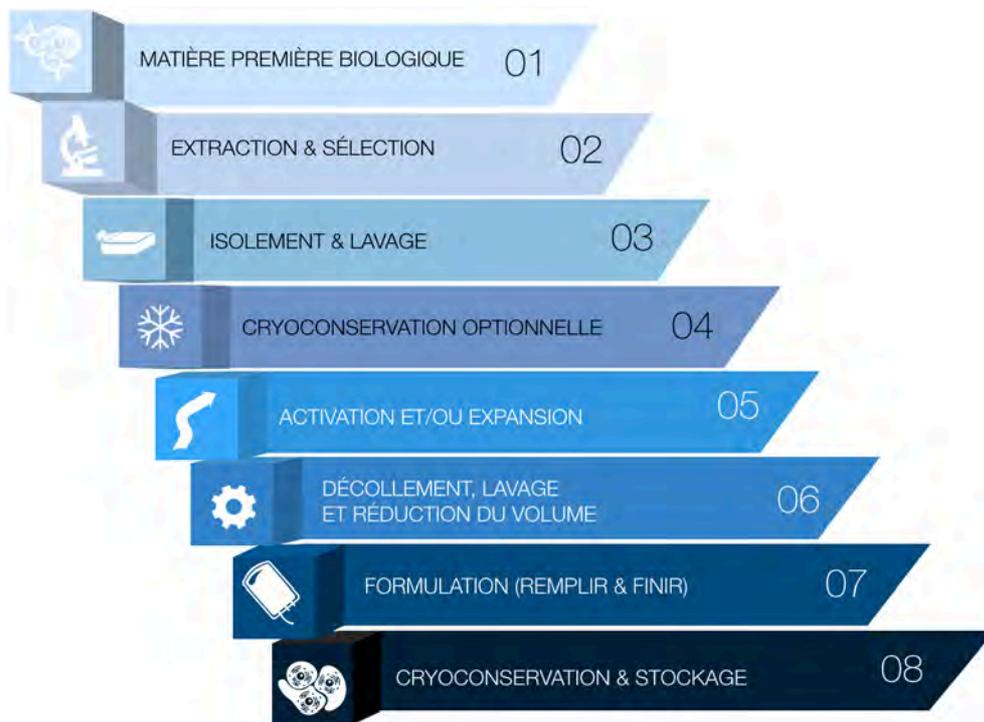


Figure 45 : Schéma du procédé classique de fabrication d'un MTI.

Les procédés de fabrication de thérapie **génique** impliquent généralement des étapes moins nombreuses et souvent plus simples :

- Amplification vectorielle et expansion cellulaire ;
- Expansion cellulaire / vectorielle de bio-réacteur - Culture de bio-réacteur ;
- Perturbation cellulaire - Transduction ;
- Purification - Chromatographie, élimination de l'ADN ;
- Polissage - Microfiltration / ultrafiltration ;
- Remplissage & conditionnement - Transférer au stockage, cryoconservation.

La validation rapide et efficace de ce type de procédé de production est un défi économique majeur pour la plateforme de production. Le procédé doit être le plus stable possible afin de minimiser les variations inter-lots. Les matières premières doivent être définies et compatibles avec une production pharmaceutique (Chapitre III.1.2). Les contrôles qualité (méthodes) doivent être validés, et les spécifications « *in process* » et sur le produit fini doivent être définies. Le pharmacien responsable est le garant du respect de ces exigences.

L'élaboration d'un procédé de production doit être justifié par une preuve de concept scientifique (recherche et développement). Il nécessite donc d'avoir anticipé l'influence de tous les changements techniques sur l'effet final du produit (ex. cryoconservation). Une fois écrit, le procédé est réalisé 3 fois au minimum (« runs ») pour être validé. Ces lots de transfert sont produits dans les mêmes conditions que les lots cliniques, et ont pour but d'évaluer et de définir les caractéristiques du produit fabriqué. Ils ne seront pas utilisés en clinique.

La validation du procédé de fabrication aseptique pour les produits pharmaceutiques doit inclure une simulation du procédé par « **Media Fill Test** » (MFT) ou « **Media Process Test** » (MPT) utilisant du milieu de culture nutritif en lieu et place de tous les réactifs entrant dans le processus de production. Le principe des MFT (ou test de remplissage aseptique) est de mettre en évidence le risque potentiel de produire des lots non stériles en étudiant l'impact des méthodes de travail et de l'environnement. Par ailleurs, les MFT permettent de confirmer l'efficacité du processus global de qualification/validation déroulé en amont : QI/QO (vérification du fonctionnement des équipements), formations des manipulateurs aux BPF (procédures et méthodes de travail), validations des procédés (fabrication, nettoyage, stérilisation), efficacité de la filtration stérilisante le cas échéant. Il permet également d'habiliter les manipulateurs à la production aseptique.

Avant d'entreprendre une production de lots cliniques, suivre ce cheminement permet d'évaluer les risques, les étapes critiques, et permet ainsi d'agir en amont en modifiant le cas échéant la méthode. Enfin, effectuer ces tests à blanc a pour but de garantir la reproductibilité, la robustesse du procédé de fabrication dans l'unité ainsi que d'habiliter le personnel manipulateur. La validation du procédé aseptique est donc un pré-requis à la production des MTI.

2.3.La gestion du personnel

La formation et la gestion managériale du personnel est un challenge pour les responsables d'une plateforme de production de MTI. être à la tête d'un établissement pharmaceutique implique de grandes responsabilités. Mais « la qualité de la fabrication des médicaments repose sur l'ensemble du personnel. Pour cette raison, le fabricant doit disposer d'un personnel qualifié et en nombre suffisant pour mener à bien toutes les tâches qui lui incombent. Les responsabilités individuelles doivent être clairement comprises par les intéressés et formalisées. Tous les membres du personnel doivent être sensibilisés aux principes des bonnes pratiques de fabrication qui les concernent ; il convient d'assurer leur formation initiale et continue et notamment d'y inclure les instructions d'hygiène en rapport avec l'activité concernée. » 7.

En France, les MTI sont des médicaments, donc soumis au monopole pharmaceutique. C'est alors au pharmacien responsable que revient la responsabilité de certifier/libérer un lot de médicament. Les

« personnes clés » d'un établissement de production de MTI sont les responsables de la production, du contrôle qualité et la personne qualifiée (le pharmacien responsable en France).

Rôle du responsable de production : Au minimum, doit s'assurer que la fabrication est effectuée conformément aux spécifications et instructions, de la qualification et de l'entretien des locaux et des équipements utilisés dans les opérations de fabrication et de s'assurer que les validations appropriées sont faites.

Rôle du responsable contrôle qualité : Il doit s'assurer que les locaux et les équipements sont appropriés et qualifiés lors d'opérations de contrôle et que le personnel travaillant sous sa responsabilité est correctement formé (ingénieur, techniciens, agents d'entretien). Des contrôles en cours de fabrication peuvent être effectués dans la zone de production à condition qu'ils ne comportent aucun risque pour le produit. En particulier, il assume la responsabilité des tâches suivantes :

- (i) Approbation des spécifications, des instructions d'échantillonnage, des méthodes d'essai et d'autres procédures de contrôle qualité.
- (ii) Approbation des conditions pour les tests externalisés.
- (iii) Contrôle des matières premières, des matières de départ, des dispositifs médicaux utilisés dans les MTI combinés, des matériaux d'emballage, des produits intermédiaires, et des produits finis (y compris leur approbation ou leur rejet).
- (iv) Supervise le contrôle des échantillons.
- (v) S'assurer que tous les tests nécessaires sont effectués et que les enregistrements associés sont évalués.
- (vi) Assure le suivi de la stabilité des produits.
- (vii) Participe aux enquêtes liées à la qualité du produit

Rôle de la personne qualifiée (Pharmacien responsable en France) : doit avoir comme pré-requis une formation et une expérience en adéquation avec les MTI comprenant des connaissances sur la biologie cellulaire et tissulaire, les différentes techniques biotechnologiques et de culture cellulaire, ainsi que la caractérisation et la fonctionnalité de ces produits. Les personnes qualifiées doivent particulièrement être irréprochables sur leur connaissance des étapes de fabrication et de contrôle qualité pour lesquelles ils prennent leurs responsabilités. La principale responsabilité est de vérifier et de certifier que chaque lot produit dans leur unité a été fabriqué et vérifié conformément aux :

- (i) exigences d'AMM / et d'autorisation d'EC,
- (ii) spécifications de production de médicament (ex. BPF)
- (iii) spécifications du produit dans le pays de destination (dans le cas des exportations).

En terme pratique, il doit y avoir plusieurs personnes qualifiées/pharmaciens dans une unité de production notamment pour pallier les absences. Les personnes qualifiées peuvent cumuler le fait d'être soit

responsable de la production, soit du contrôle de la qualité. L'importance réside dans le fait que le responsable de la production ne peut pas être le responsable du contrôle de la qualité d'un même lot. Il y a une séparation de ces activités afin de permettre un deuxième regard indépendant ⁷.

Les manipulateurs ingénieurs/techniciens doivent être formés et évalués régulièrement à s'habiller, et manipuler en ZAC (tâches critiques qui leur incombent). La bonne communication et le bon déroulement des tâches sont essentiels notamment dans un contexte de pic d'activités où les erreurs humaines sont plus fréquentes due à la fatigue et la répétition des actes. Pour réduire ces erreurs, la rotation des postes de travail permet d'augmenter l'attention du personnel et sa polyvalence en réduisant la monotonie d'une production à grande échelle. Ce type de management peut être appliqué à l'industrie des MTI.

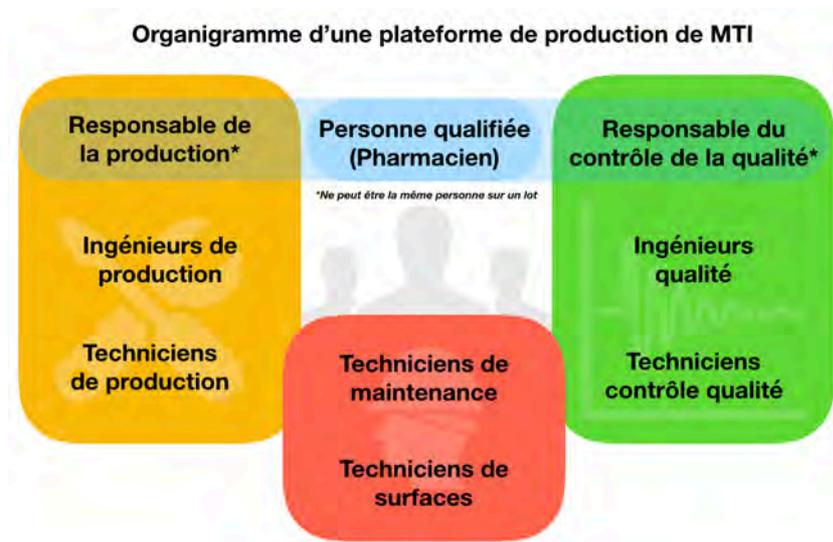


Figure X : Organigramme d'une plateforme de production de MTI.

2.4. Les défis des contrôles qualité d'un MTI

Le panel des MTI est très large, les technologies utilisées sont variées (cellules, vecteurs, biomatériaux...). Il apparaît alors difficile de résumer les CQ des MTI à une liste claire et immuable. La caractérisation et la fonctionnalité des MTI doivent être étudiées au cas par cas ce qui en fait un défi majeur pour le développement. Toutefois quand il s'agit de médicaments, certains CQ sont ubiquitaires particulièrement les tests de stérilité.

2.4.1. Les tests de sécurité microbiologique

Le **statut microbiologique** d'un médicament issu du vivant est un facteur de risque important d'infection chez le receveur. Les micro-organismes potentiellement responsables sont détectables par différents tests décrits dans la Pharmacopée Européenne (**Eu.Ph. 2.6.**).

- La **stérilité des produits cellulaires (Eu. Ph. 2.6.27)** où les flacons d'hémocultures aérobie et anaérobie sont inoculés avec un volume de suspension cellulaire défini puis incubés dans un système de détection microbienne automatisé tel que le **Bactec™** (Becton Dickinson), ou **BacT/ALERT** (BioMérieux) pendant une durée de 7 jours au minimum, durée qui aura été validée au préalable (**Figure 46**). L'absence de croissance bactérienne est un pré-requis à la libération d'un MTI. Lorsque cette donnée ne peut pas être obtenue sur le produit fini dans le temps imparti avant l'injection au patient, les données disponibles sur produit intermédiaire devront être prises en compte.

- **A noter** que les solutions ne contenant pas de cellules (cas des placebo dans certains essais cliniques) doivent être testées selon Eu. Ph. 2.6.1.

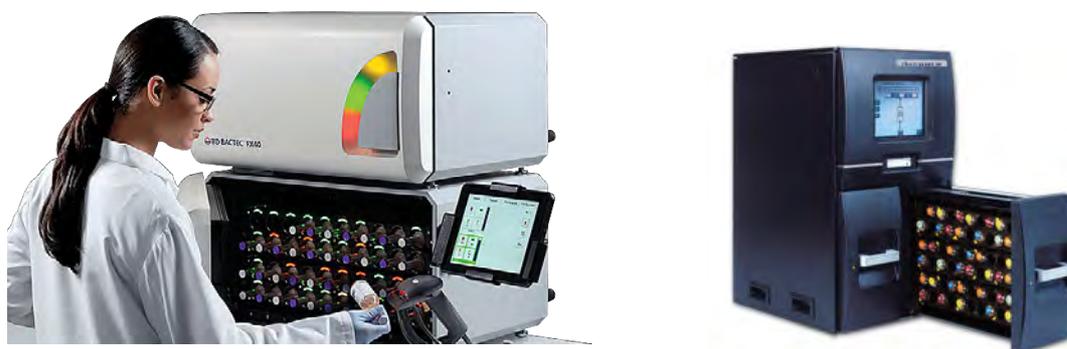


Figure 46 : Illustration des automates de détection microbienne BD Bactec™ (gauche) et BacT/ALERT™ (droite).

Sources : ©BD & ©Biomérieux

- La recherche de **mycoplasmes (Eu. Ph. 2.6.7 et 2.6.21)** qui sont des bactéries sans paroi cellulaire, potentiellement pathogènes pour l'Homme (*ex. Mycoplasma pneumoniae*), et difficiles à cultiver *in vitro* (2 à 3 semaines). Ainsi, l'amplification du génome bactérien par qPCR à partir du surnageant de culture cellulaire ou des cellules elles-mêmes permettra leur détection précoce.

- L'essai des **endotoxines bactériennes (Eu. Ph. 2.6.14)** est destiné à la détection ou la quantification des endotoxines produites par des bactéries gram-négatives, au moyen d'un lysat d'amœbocytes de limule (*Limulus polyphemus* ou *Tachypleus tridentatus*). Il peut être réalisé par 3 techniques : gélification (induction de la formation d'un gel), turbidimétrie (développement d'une turbidité par clivage d'un substrat endogène), colorimétrie (développement d'une coloration par clivage d'un complexe peptide-chromogène synthétique).

2.4.2. Les tests de caractérisation biologique et pureté

La **caractérisation biologique** du produit final est donc primordiale. En effet, les MTI à base de cellules présentent de nombreuses inquiétudes liées à leurs propriétés intrinsèques biologiques et sont renforcées par le manque de connaissances fines de leur devenir *in vivo*. Les produits cellulaires à base de cellules souches en sont l'exemple type (**Figure 47**).

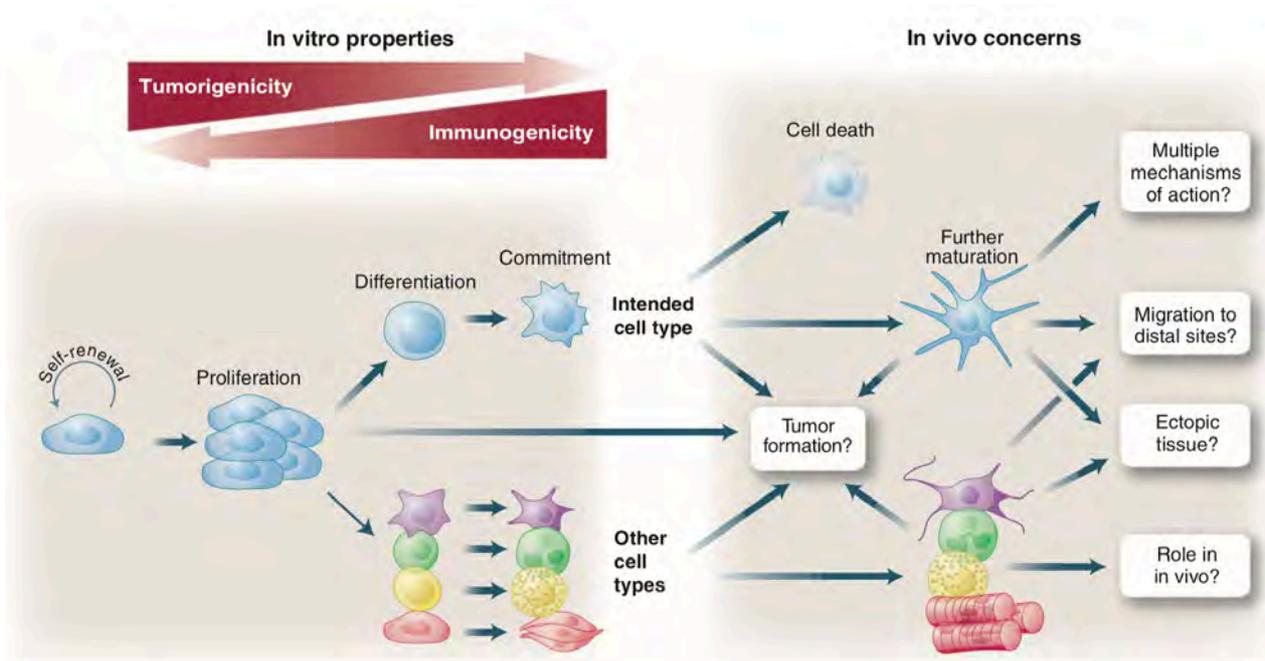


Figure 47 : Évaluation des risques des produits à base de cellules souches ¹⁷³.

Les cellules pluripotentes (ex. iPSC) et multipotentes (ex. MSC) engendrent donc différentes préoccupations notamment en ce qui concerne :

La **tumorigénicité** : le potentiel de formation de tumeurs représente une préoccupation liée à l'auto-renouvellement des cellules indifférenciées, alors que les cellules à d'autres niveaux de maturation peuvent également présenter un risque.

L'**hétérogénéité** : de nombreuses thérapies à base de cellules souches ne consisteront pas en une population de cellules cibles pures et homogènes, ce qui soulève des questions supplémentaires sur les risques que les cellules non ciblées peuvent présenter, ainsi que leur rôle physiologique après l'administration.

La **migration et formation de tissu** à partir du site de transplantation sont également préoccupantes, en particulier lorsque des produits à base de cellules souches sont introduits dans des sites anatomiquement sensibles.

La **mort cellulaire** : de plus, la différenciation des produits à base de cellules souches qui sont allogéniques vis-à-vis du receveur entraîne une incompatibilité immunologique accrue due à l'expression d'antigènes exogènes. La mort d'une grande partie de la population cellulaire transplantée, qui n'est pas propre aux cellules souches, peut constituer un risque supplémentaire.

Afin de contrôler au maximum ces paramètres, le producteur de MTI doit selon une **analyse des risques** déterminer et conduire les **contrôles qualité** nécessaires ¹⁷⁴. Quels sont-ils ? Quelles sont les défis et les difficultés rencontrées ? Peut-on établir des normes ?

L'identité et la pureté des cellules et vecteurs doivent être contrôlées avant l'administration aux patients. Pour ce faire différentes techniques analytiques sont à notre disposition, décrites dans la Pharmacopée Européenne (**Eu.Ph. 2.7.**) :

- La **numération** cellulaire (**Ph. Eur. 2.7.29**) est réalisée par comptage manuel sur chambre de Malassez, ou automatique par test cytofluorimétrique (FACS). Il permet de calculer également le **temps de doublement de population** : $(t - t_0) \cdot \log 2 / \log (N - N_0)$, où $t - t_0$ est le temps de culture (en h), N le nombre de cellules récoltées et N_0 est le nombre de cellules dans la phase initiale. Ce temps de doublement de population peut être un outil d'évaluation de la croissance et donc de la vitalité cellulaire en culture.

- Le pourcentage de **viabilité** cellulaire (**Ph. Eur. 2.7.29**) déterminé manuellement par **coloration au bleu de trypan** (avec comptage sur hématimètre de Malassez ou Toma), ou automatiquement par **FACS** où les cellules sont incubées avec de l'iodure de propidium ou du 7-AAD qui est extrudé par les cellules viables. Le nombre de cellules vivantes sera rapporté sur le nombre de cellules totales pour obtenir un pourcentage (donnée quantitative). L'injection de cellules mortes, outre leur inefficacité, pourrait engendrer un effet opposé à l'effet recherché.

- **L'immunophénotypage (Ph. Eur. 2.7.24)** par analyse FACS. Le but de l'essai est de déterminer les molécules antigéniques à la surface des cellules qui contribuent à définir leur **identité / pureté**. Brièvement, les cellules sont incubées avec des anticorps appropriés conjugués à différents fluorochromes (ex. APC, FITC, PE, ou PC7) pendant 20 minutes à +4°C, puis lavées avec du tampon phosphate salin (PBS). Les cellules sont donc analysées par FACS et chaque marqueur est exprimé en pourcentage du nombre total de cellules analysées. Par exemple, si le MTI comprend des CSH (exprimant majoritairement le CD34+ en surface) alors un des critères libérateurs pourrait être un pourcentage de cellules CD34+ $\geq 80\%$. Sachant que les 20% de cellules restantes CD34- devront être documentées en termes d'impureté ou de cellules fonctionnelles présentant d'autres marqueurs.

- Les tests **caryotypiques** / dosage d'**hTERT** permettent de prévoir la **tumorigénicité** des cellules. Le caryotype standard des bandes G est utilisé pour évaluer les anomalies chromosomiques. Les cellules sont bloquées en métaphase par de la colchicine, soumises à un choc hypotonique pour disperser les chromosomes, fixées par un mélange alcool-acide acétique puis étalées sur lame en cas de culture en suspension. On applique ensuite différentes techniques de « banding » permettant d'obtenir un marquage spécifique de chaque chromosome (traitement par la chaleur, par la trypsine...). Les mi-

toses sont capturées sur un logiciel analyseur d'images et les chromosomes sont alors classés par paires. Après la culture cellulaire, la cytogénétique constitutionnelle est analysée généralement pour 20 à 30 mitoses. A propos d'hTERT (Téломérase), c'est un gène fortement exprimé dans les cellules souches embryonnaires (CSE) et dans certaines cellules tumorales. L'absence d'expression comparée à des CSE (contrôle positif) peut indiquer un très faible risque de transformation.

- D'autres tests peuvent être entrepris comme le **séquençage** pour identifier l'ADN des médicaments de thérapie génique. Les techniques de **séparation chromatographique et électrophorétique** permettent de vérifier l'identité et la pureté de médicaments de thérapie génique par la détection d'ARN ou ADN contaminants ou non. Ainsi que les techniques pour vérifier l'**expression des protéines** d'intérêt par Western Blot notamment.

2.4.3. Les tests de fonctionnalité

Malgré ces quelques tests de caractérisation des populations cellulaires, d'autres contrôles qualité sont désormais entrepris pour répondre aux questions des autorités réglementaires sur le devenir de ces cellules *in vivo* : ce sont les tests **fonctionnels**. Ces tests fonctionnels spécifiques sont importants non seulement pour la fabrication du MTI, comme un outil pour évaluer la qualité et la cohérence du produit, mais aussi pour le développement clinique afin de prédire l'efficacité clinique du produit et **tester d'établir un lien effet-dose**. Ce lien dose-efficacité est difficile à établir pour les produits biologiques en général, et pour les MTI, le défi est encore plus compliqué. En effet, ces produits cellulaires présentent un haut niveau de complexité moléculaire, et leurs **modes d'action** (MoA) peuvent ne pas toujours être pleinement compris et impliquer de multiples voies et mécanismes.

Un test de fonctionnalité idéal doit posséder différents attributs ([Figure 48](#)), il devrait :

- être représentatif du MoA,
- couvrir le produit et l'ensemble de ces constituants (ex. toutes les sous-populations de cellules),
- être suffisamment sensible et spécifique pour détecter la dégradation ou la perte d'activité du produit,
- être précis,
- être rapide,
- permettre de démontrer la reproductibilité entre les lots,
- être prédictif d'une efficacité clinique,
- fournir des résultats quantitatifs dans un temps imparti permettant la libération du MTI selon les critères d'acceptation (= libératoire),

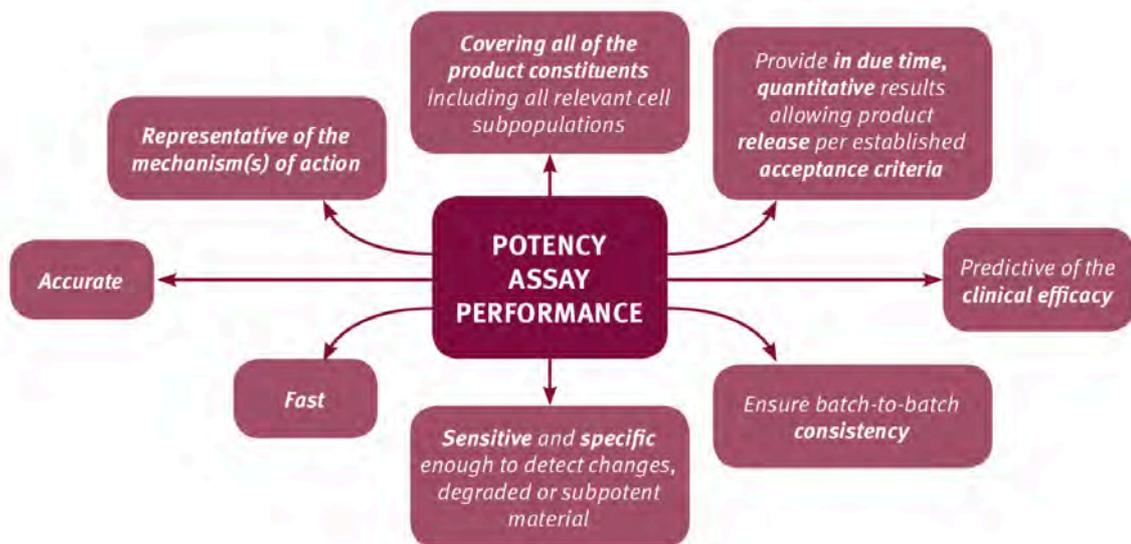


Figure 48 : Attributs des tests de fonctionnalité ¹⁷⁵.

Ces tests de « potency » concernent :

- des tests biologiques basés sur des **animaux**, qui mesurent la réponse biologique d'un organisme au produit ;
- des tests biologiques basés sur la **culture cellulaire**, qui mesurent la réponse biochimique ou physiologique au niveau cellulaire ;
- des dosages **biochimiques**, qui mesurent les activités biologiques telles que les taux de réactions enzymatiques ou les réponses biologiques induites par les interactions immunologiques.

Exemple de test sur les animaux :

- **Xéngreffe dérivée du patient** appelée PDX (pour « patient derived xenograft ») est très utilisé en oncologie comme modèle d'étude pré-clinique souvent murin. Récemment, un lien entre l'efficacité des cellules CAR-T sur les tumeurs solides et une analyse en temps réel par imagerie par bioluminescence a été réalisé dans un modèle murin PDX *in vivo* ¹⁷⁶. Un traqueur qui permet de suivre le devenir des CAR-T ainsi que leur migration et leur expansion *in vivo* en réaction à la tumeur solide. Ce type d'analyse permettrait dans le cas de CAR-T allogénique de choisir la meilleure banque de cellules en amont de la thérapie.

Exemples de tests de culture cellulaire :

- Les **tests de clonogénicité** sont pertinents pour évaluer la **fréquence de cellules progénitrices** (ex. CSM, ADSC, iPSC) : la clonogénicité des cellules est appréciée par la mesure du taux d'unités formant des colonies (CFU). Concrètement, une à plusieurs centaines de cellules sontensemencées, puis incubées à 37°C. La culture est arrêtée une dizaine de jours après, les cellules sont alors fixées et

colorées au Giemsa. Les colonies de plus de 50 cellules sont ensuite comptées pour donner un nombre de CFU / cellules ensemencées. Pour Holoclar®, le premier médicament à base de cellules souches approuvé en Europe (en février 2015), la combinaison du test clonogénique avec des marqueurs de population cellulaire spécifiques pour les cellules actives et de soutien a été utilisée comme référence comme test de fonctionnalité. La caractérisation cytologique a ici permis de sélectionner la quantification d'un marqueur de cellules souches limbiques comme CQ libérateur, car il a été démontré qu'il était significativement lié à la réussite clinique.

- L'étude du **potentiel de différenciation** des cellules progénitrices par mesure de **marqueurs géniques et histologiques** après une différenciation spécifique induite *in vitro*. Par exemple, ces méthodes seraient adéquates pour corréliser le potentiel ostéogénique de CSM en vue de régénérer de l'os avec une suppression des gènes de l'ostéogénèse (ex. *OSX*, *RUNX2*, *OPN*, et *OCN*) par RT-PCR, couplées à une coloration histologique au rouge d'alizarine ou Von Kossa pour détecter la minéralisation de la matrice sécrétée ⁶⁶. Ce type de tests de fonctionnalité pourrait être envisagé dans le choix de cellules allogéniques pour réaliser les banques de cellules principales. Ces derniers permettraient selon l'indication du MTI de déterminer les lots susceptibles d'engendrer la meilleure réponse clinique. Au vu de la longueur du procédé, il semble toutefois difficile de les utiliser pour la libération du produit final d'une thérapie autologue. En revanche, les marquages immuno-histologiques ([Tableau 15](#)) peuvent contribuer à la libération du produit dans de brefs délais comme pour le médicament d'ingénierie tissulaire Apligraf® qui permet d'évaluer la qualité de l'épiderme formé *in vitro* à l'aide d'une biopsie ¹⁷⁴.

Paramètre testé	Mesure quantitative	Spécification
Couverture épidermique	Pourcentage de la surface de la matrice dermique recouverte d'épiderme	> 95 %
Développement épidermique	Pourcentage de développement épidermique acceptable qui combine plusieurs aspects du développement fonctionnel ; une couche basale de kératinocytes de forme cubique-colonnaire, cinq couches suprabasales stratifiées ou plus et ≥ 1 couche(s) cornée(s)	> 70%
Viabilité des kératinocytes de la couche basale	Pourcentage de l'épiderme contenant des kératinocytes basaux avec un cytoplasme basophile et sans vacuolisation sévère ou nécrose; vacuolisation et nécrose utilisées comme paramètres pour déterminer la viabilité des kératinocytes basaux	> 95 %
Viabilité des kératinocytes de la couche cellulaire suprabasale	Pourcentage de kératinocytes contenant un cytoplasme basophile sans vacuolisation, nécrose ou pycnose (non viable).	> 90%
Épaisseur dermique	Épaisseur moyenne de la matrice dermique dans cinq champs choisis au hasard sur la longueur de l'échantillon	> 40 µm
Densité des fibroblastes	Densité des fibroblastes dans cinq champs choisis au hasard de la matrice dermique ; noyaux pycnotiques (non viables) non inclus dans le dénombrement	≥ 4 noyaux de fibroblastes par champs
Aspect de la matrice	Détermination du pourcentage de collagène de la matrice dermique présent sur la lame qui se colore uniformément sans grands trous ou inclusions	≥ 95% de coloration uniforme

[Tableau 15 : Liste de tests de fonctionnalité histologiques proposés par Apligraf® \(Organogenesis Incorporated\) ¹⁷⁴.](#)

De plus, la fonctionnalité de l'absorption d'eau percutanée fut corrélée par des tests d'activité mitochondriale au MTT, la sécrétion de VEGF et des essais in vivo dans des modèles murins.

Exemple de tests biochimiques :

- Dosage des **sécrétions cellulaires** par ELISA. Pour la production d'IL-12 pour la confirmation de cellules dendritiques matures ¹⁷⁷, la production d'IFN γ pour la confirmation de lymphocytes T cytologiques anti-viraux actifs ¹⁰¹.

Une approche matricielle de ces tests de fonctionnalité peut être entreprise afin de corréler un ensemble de données expérimentales avec une réponse clinique ¹⁷⁸.

La stratégie d'analyse de la fonctionnalité doit être abordée tôt dans le développement du produit, non seulement pour remplir son rôle critique dans l'évaluation de la qualité, mais aussi pour initier les études de caractérisation et de corrélation détaillées qui justifieront le contrôle qualité global. Plusieurs promoteurs se sont vu retarder l'AMM de leur MTI au cours du processus d'évaluation à cause du manque de contrôles qualité fonctionnels pertinents (ex. Provenge®, ChondroCelect®), et ont dû combler les lacunes au dernier moment pour y parvenir ; ce qui aurait pu être au moins partiellement résolu en mettant en œuvre des études pertinentes plus tôt dans le développement.

2.4.4. Internaliser ou externaliser les CQ ?

Une des problématiques que rencontrent alors les promoteurs d'essais cliniques et les centres producteurs concerne l'entité réalisant ces tests de contrôles qualité. Deux choix sont possibles, à savoir l'**internalisation** de la méthode avec validation du protocole interne, ou l'**externalisation** de la méthode d'analyse si le développement de méthode est trop chronophage et/ou nécessite une mobilisation importante de main d'œuvre spécialisée, pas toujours présente et suffisamment formée en interne. Des plateformes expertes comme la plate-forme ECell France à Toulouse proposent des tests biologiques de culture cellulaire (de caractérisation et de fonctionnalité) tandis que des laboratoires d'Histologie-Anatomie pathologique comme le LabHPEC à Toulouse permettent de réaliser des tests biologiques chez l'animal dans des conditions de bonnes pratiques de laboratoire (BPL). L'importance pour un promoteur d'essais cliniques ou un centre producteur qui externalise ses CQ est de pouvoir auditer régulièrement ces plateformes pour s'assurer de la conformité des analyses pratiquées.

Le développement de plateformes expertes labellisées BPL est indispensable au vu de la demande croissante cellulaire et génique, et à l'évolution importante des CQ vers une combinaison de multiples tests de nouvelles technologies tels que le séquençage nouvelle génération ou NGS ¹⁷⁹, l'imagerie sub-cellulaire dynamique, l'analyse sur culture 3D d'organoïdes de patients ¹⁸⁰ ou sur cellule unique (« single cell »), le développement de l'intelligence artificielle ¹⁸¹ etc. Un maillage national serait un atout majeur pour le développement de ces thérapies innovantes puisque le temps de réponse entre le prélèvement

d'un échantillon et son analyse doit être le plus court possible et que le prix de l'analyse doit être le plus faible possible. Le manque de concurrence et de plateformes répondant aux besoins des académies est un frein à l'heure actuelle en France.

En conclusion, les contrôles qualité des MTI doivent être une des préoccupations majeures et initiales des promoteurs et des centres producteurs. Etablir (Figure 49) et valider (Eudralex 10.4) des tests de sûreté microbiologique, de caractérisation et de fonctionnalité devraient commencer tôt dans le développement en y apportant les preuves de concept ; en collectant les données ; et en corrélant avec une réponse clinique dans les premières phases pré-cliniques et cliniques. L'ensemble des tests de fonctionnalité même si non-libératoires doit pouvoir évoluer dans les phases de développement intermédiaire et avancé, et contribuer à la prédiction de l'efficacité clinique pour chaque lot. L'externalisation d'une partie des CQ du produit est au choix du promoteur et du centre producteur en fonction de leurs besoins et de l'attractivité mais surtout la réactivité des plateformes expertes labellisées.

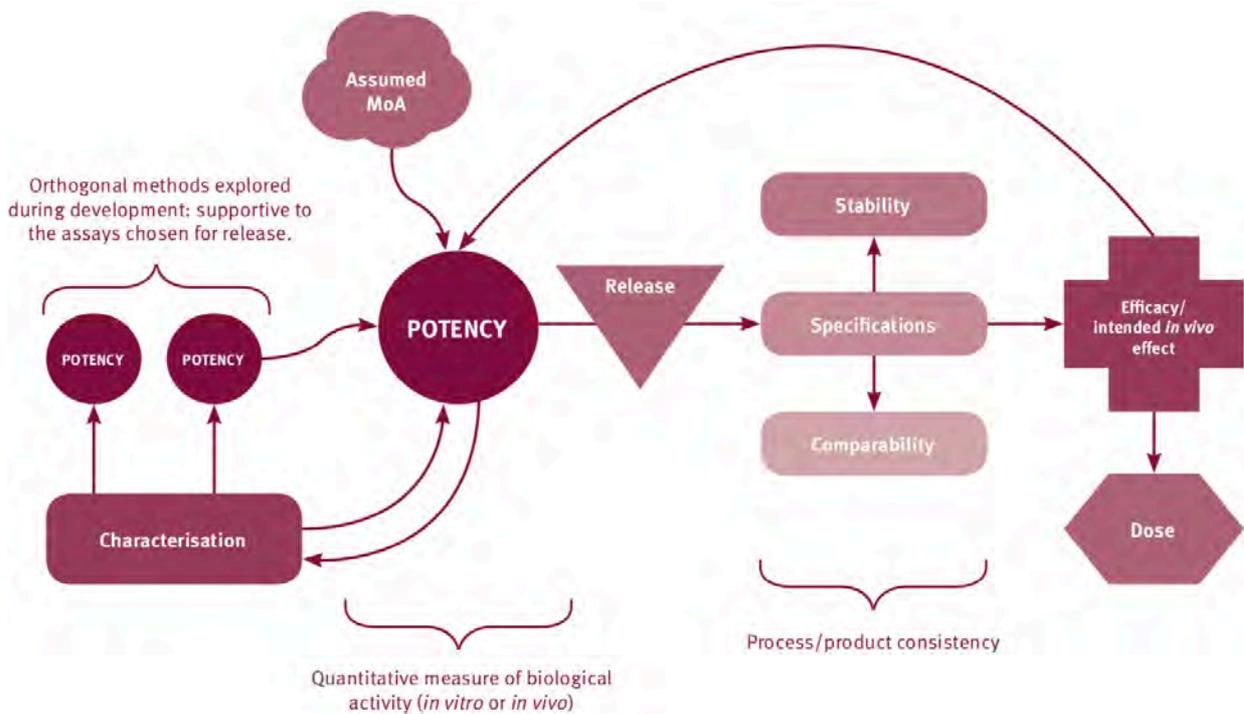


Figure 49 : Détermination des tests de fonctionnalité (« Potency ») lors du développement clinique d'un MTI 175.

Lors d'un essai clinique l'ensemble de la démarche ainsi que des CQ sont répertoriés dans un document confidentiel faisant partie des documents soumis aux autorités nationales : l'IMPD (pour « Investigational Medicinal Product Dossier ») propre à chaque MTI et à chaque centre producteur. En effet, décrit dans la directive 2001/20/EC, l'IMPD comprend des résumés d'informations relatives à la qualité, la fabrication et le contrôle de tout produit expérimental (y compris le produit de référence et le placebo) dont les données proviennent d'études non cliniques et cliniques. C'est sur la base de cet IMPD com-

prenant les différentes spécifications que la certification du lot est réalisée par la personne qualifiée (pharmacien en France).

2.5. Les critères de certification/libération du produit fini

La libération (dans le cas d'un médicament avec AMM) ou certification (dans le cas d'un médicament expérimental en phase d'essai clinique) d'un lot est à la charge de la **personne qualifiée** (ou pharmacien). Pour réaliser cette certification/libération, le pharmacien se base sur l'ensemble des documents relatifs à la qualification des locaux, équipements, personnels, ainsi que des CQ environnementaux, matières premières, produits intermédiaires (*in process*) et du produit fini. Le **dossier de lot** dans son ensemble est donc nécessaire à la certification.

Dans beaucoup de cas, les MTI sont congelés lors de la dernière étape de la production (ex. Kymriah® cellules CAR-T anti CD19), et sont mis en quarantaine en attendant que l'ensemble des CQ dont les CQ libérateurs soient réalisés. Cependant, certains produits ne peuvent pas être congelés (ex. Holoclar®) et requièrent une libération immédiate pour injection ou transplantation dans un temps très court (parfois quelques heures). Ce dernier exemple nécessite alors une **libération en deux étapes** où les CQ « *in process* » des produits intermédiaires sont utilisés pour la libération initiale (appelée libération conditionnelle) ; tandis que la libération finale ne sera possible que plusieurs semaines après, quand toutes les données de CQ seront disponibles (par exemple la stérilité du produit fini). Cette procédure de libération en deux étapes requiert un haut niveau d'évaluation des risques aboutissant à l'établissement de contrôles intermédiaires pertinents et robustes, ainsi qu'un circuit très contrôlé pour s'assurer que l'utilisateur final peut être contacté dès que des données de CQ non conformes et sensibles apparaissent. C'est le cas des contaminations microbiennes qui ne peuvent être détectées sur le produit fini. Dans l'éventualité qu'une telle contamination se déclare, un processus doit être mis en place et évalué afin que les conseils d'un clinicien microbiologiste puissent être transmis au médecin référent et au patient. Il va de soi que ce genre de non-conformité doit faire l'objet d'une déclaration de pharmacovigilance aux agences réglementaires compétentes (en France, l'ANSM).

3. Les enjeux technologiques post-production

3.1. Le conditionnement final et la cryoconservation

Les MTI subissent des étapes de modifications substantielles en suivant le procédé de production validé, à la suite desquelles ces produits sont conditionnés de manière aseptique puis cryoconservés ou directement administrés.

Le choix du conditionnement primaire final est donc une étape à ne pas négliger dans le développement d'un MTI. Principalement parce que le MTI va être conservé à long terme à l'intérieur de celui-ci et

qu'il doit de ce fait conserver l'intégrité et l'efficacité du médicament quelles que soient les conditions de stockage (cryoconservation en azote vapeur ou liquide). Ce conditionnement doit être également adapté à la production à grande échelle ainsi qu'aux réglementations en vigueur. Idéalement, le conditionnement doit être sélectionné dans les phases I/II des essais cliniques de la thérapie cellulaire ou génique afin d'éviter des retards dans la commercialisation du MTI. Cependant la plupart des compagnies ne voulant pas investir dans des essais cliniques de phases précoces ne se posent la question du conditionnement que lorsque le produit est proche d'une phase III et de la commercialisation.

Plusieurs compagnies offrent pourtant des solutions avec des systèmes de remplissages et de fermetures de flacons en conditions aseptiques. La technologie Crystal AT-Closed Vial® (Aseptic Technologies, Belgique) est actuellement utilisée pour le stockage de plusieurs MTI de thérapie cellulaire allogénique ou autologue (Figure 50). Cette technologie réduit le risque de contamination lors de l'étape de remplissage de plus d'un facteur 100. Une autre compagnie propose une technologie de remplissage de flacons équivalente appelée CellSeal® (Cook Regentec, USA) adaptée à la cryoconservation et aux banques de cellules.

Ces technologies travaillent sur une robotisation des procédés de grade clinique. Ces appareils utilisés actuellement en Corée (ex. Kolon Life Science) et au Japon sont des systèmes totalement clos, petits, et décontaminés à l'H₂O₂. Pour ces raisons d'automatisation et d'auto-isolation, ils évitent aux producteurs de travailler en ZAC de classe B, la classe D étant suffisante, et permettent de réduire les coûts de production.

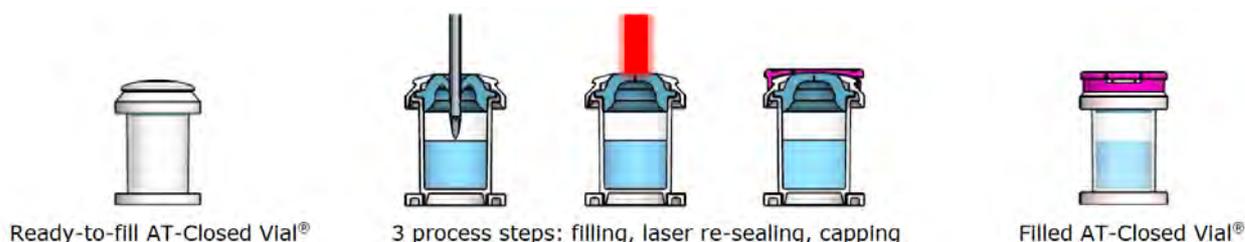


Figure 50 : Technologie Crystal AT-Closed-Vial® par Aseptic Technologies.

Le processus global de remplissage des flacons prêts à l'emploi AT-Closed Vials® se fait en très peu d'étapes :

1. **Remplissage** : le bouchon est percé d'une aiguille spécialement conçue pour distribuer le produit à l'intérieur du récipient ;
2. **Fermeture** : la trace de ponction est refermée par un faisceau laser sur le bouchon ;
3. **Bouchage** : simple encliquetage du bouchon en plastique, à l'intérieur de la barrière.

Les poches de cryoconservation doivent répondre aux mêmes réglementations que les flacons pour prévenir les fuites et les contaminations. Macopharma (France) a développé une poche innovante pour la congélation du sang de cordon. Cette dernière est un dispositif médical stérile (marquée CE) ayant pour but la congélation à long terme de cellules dans des vapeurs d'azote jusqu'à -196°C (Figure 51). Dans un même registre, il existe les poches innovantes KryoSure™ (Saint-Gaubin, UK) fabriqué en fluoroéthylènepropylène : une substance inerte chimique, immunologique, et biologique. Ces poches restent flexibles à -196°C et sont utilisées par de nombreuses compagnies de thérapie cellulaire notamment

grâce à leur grand volume de stockage. Toutefois, le changement de procédés de cryoconservation en poches vers des flacons est possible.

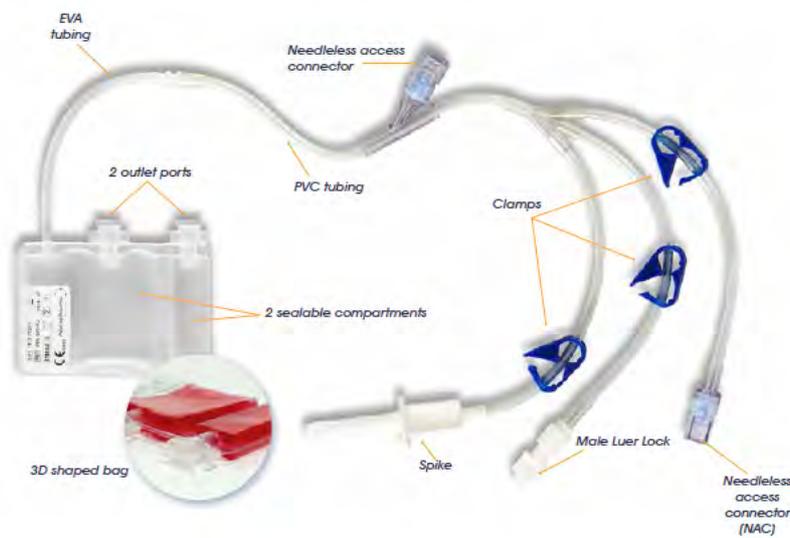


Figure 51 : Poche de cryoconservation de sang de cordon de Macopharma.

Source : ©Macopharma

Composée d'un compartiment principal de 20mL et 5mL pour le contrôle qualité après décongélation, de plusieurs tubulures en EVA et PVC à connecteurs Luer Lock.

L'étape de congélation des cellules est une étape clé du procédé de fabrication. Alors que des produits cellulaires non congelés sont généralement utiles pour établir les preuves de concept ou les études pré-cliniques, la cryoconservation du produit final est préférée une fois que ce produit entre dans des phases cliniques ou/et est commercialisé. La cryoconservation permet aux cliniciens et aux patients une certaine flexibilité dans la programmation du traitement et permet de faciliter l'envoi de milliers de doses à travers les différents centres cliniques mondiaux.

Les cellules, à la différence d'autres médicaments sont conservées sur le long terme à des températures inférieures à -130°C . A de telles températures, toute activité biologique s'arrête, protégeant les cellules de lésions métaboliques ou chimiques. Plusieurs études ont démontré qu'une vitesse de congélation lente et constante à $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ permettait un rendement optimal et une meilleure viabilité des cellules après décongélation **{Yokoyama:2012iz}** ¹⁸².

La congélation de cellules peut être effectuée de manière à contrôler la descente en température à l'aide d'appareils spécifiques comme le CryoMed™ (Thermo Fischer Scientific, USA), le Freezal™ (Cryopal, FR) ou encore le Digitcool™ (Cryobiosystem, FR). Ces congélateurs programmables sont à valider en amont ¹⁸³ et permettent de standardiser la vitesse de congélation par palier en fonction du volume de

la poche. La congélation à - 80°C des cellules est plutôt utilisée lors de conservation de courte durée et pratique pour leur transport. C'est une alternative rentable en prenant en considération la faible consommation des appareillages électriques et sans azote. Une fois atteint -80°C, les cellules peuvent être transférées dans des cuves à azote liquide et y demeurer plus de dix ans sans dégradation ¹⁸⁴.

Pour assurer la sûreté et l'efficacité du produit final, ces méthodes de cryoconservation doivent être standardisées et entreprises en amont (en phase pré-clinique si possible). Une des grandes préoccupations des producteurs de MTI est la composition du milieu de congélation. De nombreuses études ont démontré que l'utilisation de milieux contenant communément entre 5 et 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) était le milieu optimal pour conserver les cellules ¹⁸⁵. Plusieurs solutions commerciales existent telles que le CryoStor® medium (Stemcell, Canada), d'autres compagnies développent des milieux sans sérum comme HyClone™ HyCryo-STEM (GE Healthcare, USA), StemMACS™ Cryo-Brew (Milteny Biotec, Allemagne) ou même certaines sans DMSO pour les iPSC comme le CryoSOfree™ (Sigma-aldrich, Merck, Allemagne) ou le StemCell Keep™ (BioVerde, Japon), puisque le DMSO influence l'expression d'OCT-4. Selon le type cellulaire congelé (CSH, iPSC, CAR-T, MSC...) ou les conditions de températures de cryo-préservation (congélation lente ou rapide = vitrification), les composants de ces milieux sont donc ajustés.

Tandis que des MTI décongelés avant l'administration subissent plusieurs étapes de lavages et de concentrations, certains doivent être manipulés le moins possible (afin de prévenir une contamination ou d'augmenter la durée de vie du médicament). Ceci sous-entend que les composants du milieu de cryoconservation peuvent dans ce cas être directement injectés aux patients. Il est donc de la responsabilité du producteur d'étudier la relative toxicité de ces composants et de vérifier sa concordance avec les BPF afin de minimiser l'apparition d'effets indésirables après administration chez les patients.

Si le choix du conditionnement pour la cryoconservation est primordial, il ne faut pas négliger la facilité d'utilisation de ces MTI par le service clinique. En effet, idéalement, les thérapies cellulaires et géniques se délivreraient via des formulations et/ou packagings pratiques comme des seringues pré-remplies afin que les manipulations au lit du patient soient minimales et leur administration soit facilitée. On peut citer un exemple de seringue ([Figure 52](#)) utilisée pour administrer un MTI d'ingénierie tissulaire : la MBCP™ Technology (Biomatlante, France). Ce MTI doit être reconstitué extemporanément par le chirurgien en ensemencement un biomatériau avec des CSM pour la reconstruction osseuse ¹⁸⁶. Ce système mis en place utilise donc deux seringues accolées l'une à l'autre pour l'ensemencement puis le décrochage de la seringue cellulaire permet une injection facilitée pour le chirurgien du MTI sur le site lésionnel. En réalité, la plupart des MTI arrivent sous forme de flacons à reconstituer par les pharmacies ou les unités de thérapie cellulaire pour obtenir ces formulations simples d'utilisation offrant une solution à court terme.



Figure 52 : Seringues pré-remplies de MBCP™ Technology - In'Oss™

Source : ©Biomatlante

Une perspective à long terme d'amélioration des systèmes serait de travailler sur la conservation de ces produits cellulaires à température ambiante afin d'éviter les manipulations extemporanées ainsi que les conditionnements peu appropriés à une utilisation clinique.

3.2.La traçabilité et l'intégrité des données

La documentation est un élément majeur du système d'assurance de la qualité et est primordiale pour assurer la conformité des opérations aux exigences BPF. « L'objectif principal du système documentaire utilisé doit être d'établir, de contrôler, de surveiller et d'enregistrer toutes les activités qui influent (directement ou indirectement) sur tous les aspects de la qualité des médicaments ». La documentation peut exister sous des formes variées, incluant les supports papier, électroniques ou photographiques. La traçabilité et l'intégrité des données sont des défis cruciaux de l'assurance qualité des MTI (FDA : 21 CFR PART, Annexe 11 des BPF). En effet, les plateformes MTI se développent et deviennent de plus en plus automatisées, les équipements se complexifient et augmentent, la maintenance du processus de qualité devient alors de plus en plus difficile. La question qui se pose pour les développeurs est : « comment créer un réseau sûr de collecte d'informations et de centralisation permettant de suivre toutes les étapes de la production de la matière première jusqu'à l'administration du produit final au bon patient en temps réel ? »

Ce type d'outils doit pouvoir répondre aux défis suivants :

1. **Gestion des procédés** : les processus de fabrication de certains MTI notamment de thérapie génique sont très complexes avec plus de centaines de références impliquant plusieurs matières premières, réactifs et consommables.
2. **Traçabilité exhaustive** : fournir un dossier complet des activités de fabrication, y compris une traçabilité complète, difficile et sujette aux erreurs de transcription.
3. **Facilité d'Étiquetage** : le système d'étiquetage sur papier est difficile à utiliser et nécessite de multiples étiquettes pour soutenir le processus, ce qui prend du temps et est une source potentielle d'erreur introduisant le risque de contamination croisée.
4. **Anticipation des audits** : démontrer la capacité de générer un enregistrement conforme aux réglementations pour chaque produit fabriqué est nécessaire pour l'établissement d'un essai clinique (Figure 53).



Figure 53 : Extrait des points clés de la directive 21 CFR PART 11 des BPF ¹⁸⁷.

On peut résumer l'intégrité des données par le concept de l'ALCOA. ALCOA est un acronyme utilisé par la FDA qui signifie « *Attributable, Legible, Contemporaneous, Original, and Accurate* » (Figure 54). Le concept sous-jacent de l'ALCOA est que la qualité des données influe directement sur la qualité des produits, en mettant l'accent sur l'exécution correcte des tâches la première fois et le rapport immédiat des résultats.



Figure 54 : Explication du concept de l'ALCOA de contrôle de la qualité ¹⁸⁷.

La **plateforme TrakCel** (USA) fournit un logiciel conçu spécifiquement pour gérer le circuit des MTI, et aide les développeurs à démontrer leur conformité réglementaire par la centralisation informatique des données en temps réel. Le schéma du circuit du MTI intégré à TrakCel garantit que chaque étape du processus, peu importe où cela se passe, est effectuée de manière cohérente avec le souhait du développeur via une géolocalisation des produits. Chaque acteur s'est vu attribuer des tâches spécifiques sur le processus global. L'intégration des données capturées dans TrakCel par les participants (ex. prise des empreintes du patient) et par les équipements (ex. transmission automatique des données de température pendant le transport) fournit une visibilité complète à travers la chaîne de production en un seul rapport de données. Toutes les activités de fabrication et les écarts de processus associés ont été enregistrés dans un journal d'audit à distance. Cela a également permis aux individus de surveiller l'état de l'échantillon et les procédures suivies sans devoir accéder à la salle blanche. Dans le cas des thérapies autologues, TrakCel facilite la traçabilité et s'assure que le matériel de départ est bien administré à la bonne personne (donneur d'origine), et garantit tant la sécurité des patients que la conformité du procédé selon les normes en vigueur.

Cependant, un tel système de communication en temps réel nécessite des transporteurs compatibles (ex. SAVSU technologies, USA). Quand ces technologies deviendront couramment utilisées, les futurs systèmes logistiques permettront aux unités de production de savoir où sont leurs produits et de pallier toute irrégularité, à ajuster leur créneau de production en temps réel, réduire le temps des analyses de données (puisqu'elles seront déjà transmises et approuvées) et ainsi d'accélérer la prise en charge thérapeutique pour le patient.

4. L'adaptation nécessaire du circuit hospitalier

Les MTI sont des thérapies avec un circuit hospitalier particulier du fait de leur labilité et de leur législation récente. La plupart sont certifiés par l'établissement pharmaceutique, sous forme congelée pour être transportés vers les centres cliniques au sein desquels ils sont stockés. Les pharmacies ont un rôle majeur dans la réussite de ces nouvelles thérapies puisqu'elles sont le garant de leur conservation et de leur dispensation avant administration par le clinicien. Cependant à l'heure actuelle ce circuit n'est pas parfaitement mis en place et de nombreux défis sont à relever afin de pallier ces problèmes concernant le dernier maillon de la chaîne.

4.1. Le défi du stockage des MTI dans les pharmacies à usage intérieur

Le transport des MTI du centre producteur vers les pharmacies à usage intérieur des hôpitaux est sous la responsabilité du producteur et reste très dépendant du type de MTI. La plupart de ces MTI sont des cellules congelées dans les centres de production, à l'image des CAR-T (Kymriah®, Yescarta®). Ces dernières sont envoyées aux centres cliniques du monde entier dans des conditions spécifiques de basses températures, ce qui alourdit les contraintes du système logistique. Le stockage temporaire des MTI dans les centres cliniques peut solutionner ces contraintes, mais crée inexorablement d'autres problèmes, concernant les besoins d'espace, de locaux spécifiques pour le stockage à de très faibles températures, notamment des installations cryogéniques incluant l'utilisation d'azote liquide. Si on prend le cas des PUI en France, aucune d'entre elles ne possède des locaux importants de stockage avec des cuves à azote surveillées en temps réel. Pourtant cette activité de stockage est sous la responsabilité des pharmacies. Il existe plusieurs solutions à ce type de problème.

Ces cellules cryoconservées à -196°C en vapeur d'azote sont souvent envoyées en « dry-shipper » (ou transporteurs à sec) composé d'un absorbant fixant l'azote liquide et d'un couvercle verrouillable. Ils sont reliés à une sonde de température et un enregistreur permettant le suivi pendant le temps de transport. Ce type de dispositif est un casse-tête pour les industriels, surtout pour les producteurs de thérapies autologues. Quand la chaîne de production atteint des milliers de doses par an, l'utilisation de dry-shippers devient un énorme challenge.

Les professionnels des chaînes du froid préconisent une logistique à 4 dry-shippers pour chaque MTI produit :

- Le premier prêt à partir pour la production en cours,
- Le deuxième en train d'être rempli d'azote,
- Le troisième en livraison avec la précédente production,
- Le quatrième de retour à la zone de production après administration du produit.

Les dry-shippers sont remplis manuellement et doivent être complètement rechargés au moment de leur envoi vers les centres cliniques pour maintenir une température optimale tout au long de la procédure de transport puis de stockage. La solution la plus facile serait de valider le stockage à court terme de cellules à des températures supérieures de type -80°C afin de les transporter dans de la carboglace, ce qui est une pratique courante en recherche. Cependant, ces conditions ne sont pas aisées à valider du fait de la forte variabilité de températures en fonction de la place des échantillons dans la boîte.

La validation de la stabilité des MTI à -80°C doit être entreprise dans ce cas très tôt dans le développement pour être utilisé dans les phases précoces des essais cliniques. Il est à noter que la conservation des CSH du sang périphérique à -80°C pendant plusieurs mois est utilisée en routine dans certains services cliniques de transplantation ¹⁸⁸.

Ce défi de cryoconservation est cependant moins prégnant pour les thérapies allogéniques qui peuvent être livrées en une seule fois et en doses multiples à une zone de stockage locale.

Une autre solution réside dans le fait de sous-traiter le stockage chez un établissement agréé possédant ces zones de stockage spécifique en routine, que sont les unités de thérapie cellulaire et génique (UTC/UTG) des hôpitaux ou de l'Etablissement Français du Sang (EFS). Cette sous-traitance ou prolongement de la PUI doit faire l'objet d'une convention signée par les différents partis pour le bon déroulement du circuit hospitalier des MTI. L'aspect compétitif et onéreux de surveillance des cuves à azote liquide entre CHU et EFS peut être un frein à la mise à disposition des MTI dans certaines villes si les acteurs ne mettent pas à disposition leur savoir-faire au service des patients.

4.2.Reconstitution et gestion des déchets MTI

En plus de la mise en place de la cryoconservation, l'hôpital est le dernier maillon du circuit des MTI. De ce fait, il est le garant de la préparation finale du MTI. Ces MTI doivent pour certains subir des modifications extemporanées non soumises aux BPF que sont la décongélation, le lavage, la dilution, ... (Eudralex Vol.4 - 16.1). Le personnel des PUI n'est pas systématiquement formé dans tous ces domaines (principalement la décongélation cellulaire) contrairement aux UTC et EFS dont ces activités représentent le corps de métier. Il incombe aux pharmacies de se renseigner sur les contrôles qualité à entreprendre après décongélation des cellules (numération cellulaire, viabilité), ainsi que sur les locaux (ex. PSM II) ou appareils à prévoir pour reconstituer correctement ces médicaments. En effet, c'est une ques-

tion qui se pose pour les cellules CAR-T qui arrivent bientôt sur le marché européen. Il apparaît que les promoteurs de ces essais cliniques ont choisi la validation des procédés de décongélation automatisée. L'automatisation permet d'éviter les trop grandes variabilités de viabilité cellulaire entre les centres investigateurs, contrairement à des décongélation « manuelles » à l'aide de bains-marie. Cette variabilité expérimentale est due à la non-standardisation de la montée en température autour de l'échantillon et du temps de décongélation provoquant une mort cellulaire variable.

Il existe donc des petits appareils en accord avec les BPF tels que le ThawSTAR™ (MedCision, USA) (Figure 55) et les CellSeal Automated Thawing System™ et VIA THAW CB1000/SG2™ (Asymptote, part of GE Healthcare, UK) qui sont capables de surveiller et contrôler la montée en température afin de standardiser les procédures de décongélation. Ces dispositifs de choix pourraient servir non seulement lors de la conception des MTI (ex. décongélation des matières premières), mais surtout être mis à disposition des pharmacies pour la décongélation du produit fini avant administration. De plus, l'enregistrement des données par ces appareils permettraient un contrôle fin par les promoteurs de la bonne réalisation de cette étape par les centres cliniques et d'effectuer rapidement les actions correctives si une défaillance est observée.



Figure 55 : Illustration de dispositifs de décongélation automatisée ThawSTAR™, CellSeal Automated Thawing System™ et VIA THAW CB1000™

Sources : ©MedCision, USA & ©Asymptote, UK

La mort cellulaire est intrinsèquement liée à la congélation/décongélation, et serait médiée par les mitochondries et l'activation de l'apoptose cellulaire *via* une voie dépendante des caspases ¹⁸⁹. Une alternative envisageable est l'utilisation d'inhibiteur des caspases (ex. Z-VAD-FMK) après décongélation pour retarder cette mort cellulaire, mais ce type d'agents pouvant affecter *a posteriori* la qualité des cellules notamment leur capacité à proliférer et se différencier doit être validé. Ceci reste une pratique rare, contraignante et à étayer avant de penser à une utilisation clinique ¹⁹⁰.

En résumé, ce sont aux promoteurs des essais cliniques de subvenir aux besoins de leur investigateur en termes de procédure de décongélation. Il apparaît intéressant que les PUI anticipent ces questions et choisissent soit de se rapprocher de centres experts (UTC, EFS) ou se dotent des outils adéquats de décongélation automatisée.

Les autres manipulations des MTI, comme la reconstitution ou la dilution d'un vecteur viral, ne posent pas de réelles difficultés pour des manipulateurs bien formés (ex. préparateur en pharmacie hospitalière). Dans le cas des reconstitutions de thérapies géniques *in vivo* conservées en flacons (ex. Imlygic®), potentiellement dangereuses pour le manipulateur, il existe des systèmes de transfert clos permettant de transférer le contenu du flacon dans la seringue d'injection en conditions aseptiques, tel que le système de BD Phaseal™. Ce type de système est déjà mis en place pour certaines chimiothérapies dans les PUI (Figure 56). Les manipulateurs et le matériel de reconstitution sont donc prêts pour faire face à cette activité.

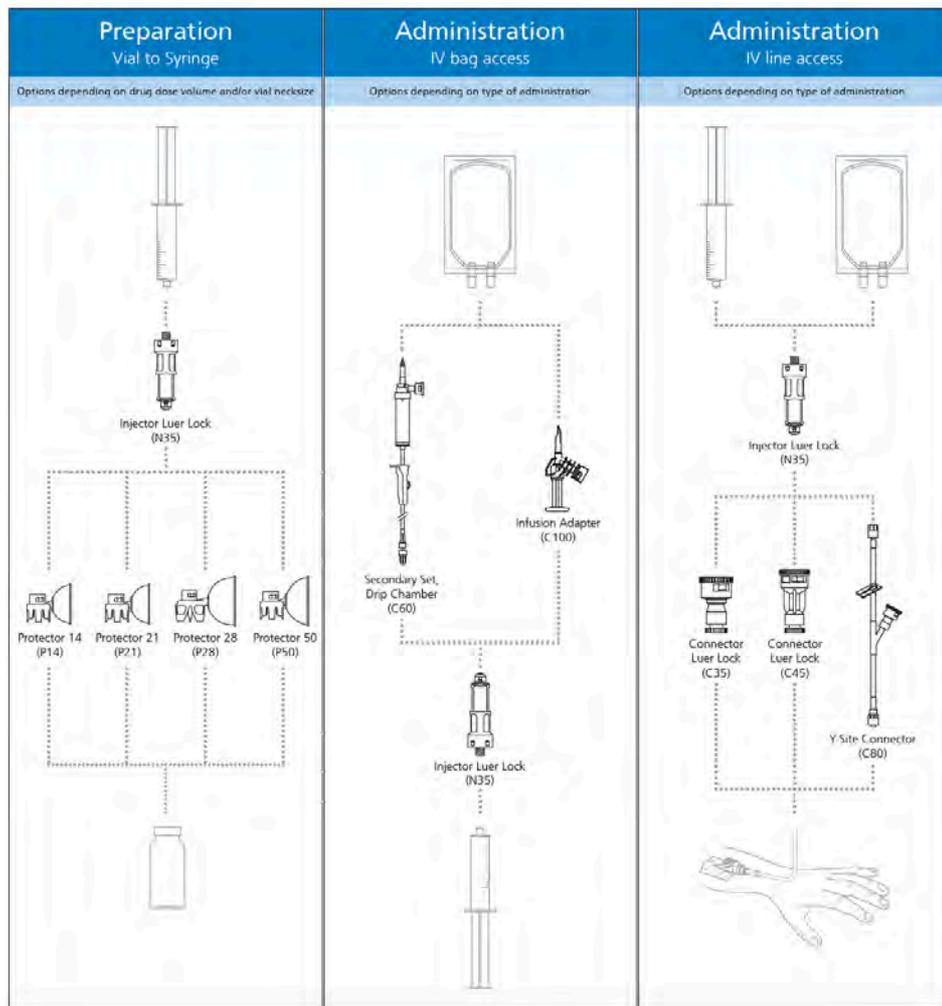


Figure 56 : Système BD Phaseal™ de transfert en milieu fermé adaptable à la reconstitution hors BPF de médicaments de thérapie génique à la PUI.

Source : © BD.

Le problème réside plutôt dans leurs connaissances théoriques, la présence de locaux dédiés et la croissance d'activité due à l'arrivée de ces MTI, que doit pouvoir supporter un centre hospitalier. Effectivement, les manipulateurs dans les pharmacies sont habitués aux préparations magistrales et hospitalières plus ou moins à risques comme les cytotoxiques. La formation et la sensibilisation du personnel travaillant sur ces médicaments est toutefois primordiale. Il s'agit d'établir des fiches de fabrication claires avec les promoteurs pour chaque MTI, de former et évaluer les manipulateurs sur la théorie et l'appliquer à l'aide de questionnaires, expériences à blanc ou encore diplômes universitaires (DU) spécifiques (ex. DU de l'Université Paris-Descartes, Médicaments de thérapie innovante : de la recherche à la gestion pharmaceutique). En termes de locaux, il est vraisemblable à la vue des indications majoritaires des MTI pour l'immuno-oncologie que ce sont les unités de productions de cytotoxiques et le service des essais cliniques des PUI qui seront sollicités. Ni l'un ni l'autre ne possèdent à l'origine des locaux spécifiques pour les OGM si ce n'est des PSM avec le risque de contamination croisée en présence d'autres préparations hospitalières (ex. cytotoxiques / OGM). Le HCB, qui qualifie les différentes zones de préparation des OGM, est sensibilisé à ces problématiques et dans la mesure du possible réduit les contraintes de préparation post-production par les pharmacies lors de l'émission de leur rapport. Généralement la reconstitution des MTI de thérapie génique sont classés C1 (où le risque de dissémination est très faible) et donc préparés dans un environnement L1 ; alors que la transfection de cellules se réalise lors de la production dans des zones plus confinées usuellement de type L2 ¹⁹¹.

L'élimination des déchets est également un point critique dans le circuit de la PUI. La plupart des MTI peuvent être détruits par la filière des déchets d'activités de soins à risques infectieux (DASRI). La nécessité d'une décontamination à l'aide d'un autoclave est toutefois recommandée par le HCB pour les MTI OGM. Cependant, les PUI n'étant, à l'heure actuelle, que très peu équipées, une décontamination du MTI par de la javel en filière DASRI est couramment mise en oeuvre.

Les MTI étant préférentiellement en phases d'essais cliniques en France, les enjeux politiques pour les hôpitaux sont importants et la pharmacie ne peut être un frein pour le développement de ces MTI. Il advient donc aux directeurs de ces établissements de mettre en oeuvre des moyens supplémentaires autant personnels qu'immobiliers pour répondre à la demande.

4.3.Sécurité et prise en charge des effets indésirables

Les MTI sont généralement plus sûrs comparés aux petites molécules au même stade de développement, en partie parce que beaucoup sont basés sur des types de cellules humaines naturellement présentes dans le corps, et que les technologies cellulaires échouent très rarement dans les essais de phase I. Malgré cela, il reste de sérieux risques nécessitant une attention particulière. Les stratégies d'atténuation des risques de sécurité dépendent du type de technologie, mais comprennent une conception intelligente de produit, des essais et un développement pré-clinique minutieux, ainsi que des

mesures de précaution pour compenser les effets indésirables futurs visant à retirer ou désactiver le produit.

Les effets indésirables des médicaments de thérapie innovante sont variés et sont fonction des différentes cellules, virus ou tissus générés. Parmi ces effets secondaires indésirables, on peut citer les désordres **thromboemboliques** suites à l'injection intraveineuse de cellules, le rejet **immunologique** des cellules (GvHD) dans le cas de thérapies allogéniques, la réapparition ou la survenue de **cancer** suite à l'intégration d'un transgène.

Ces effets indésirables doivent faire l'objet d'une déclaration à la **pharmacovigilance** dès leur apparition chez les patients. A l'heure actuelle, ces effets sont répertoriés avec minutie puisque les MTI sont pour la plupart encore aux stades des essais cliniques, et font l'objet de directives par l'EMA ¹⁹².

Prenons l'exemple des cellules CAR-T, l'un des effets indésirables graves rencontré est le syndrome de relargage cytokinique (CRS) à la suite de la réaction immunitaire provoquée. Ces thérapies engendrent entre 50 et 100% des cas un relargage important de cytokines pro-inflammatoires notamment l'IL6, le TNF et l'IL10. Il existe une corrélation entre le degré d'activation et d'amplification des CAR-T après injection et la survenue de CRS entre 1 et 14 jours post-injection. Le premier signe clinique est l'apparition d'une fièvre très élevée (41°C). Les autres symptômes sont des myalgies, une fatigue, une anorexie et une hypotension. Le CRS peut alors conduire au décès des patients s'il n'est pas maîtrisé, comme ont pu le montrer les premiers essais cliniques de Kite en 2017 ¹⁹³.

Un des exemples clé en réponse à ces effets indésirables est **l'amélioration du contrôle du MTI par une conception intelligente**. Pour le CRS, il correspond à la mise en place de «switch on» lors de la construction des CAR-T (cas des CAR-T de Cellectis et Bellicum) ; où les cellules CAR-T injectées restent inactives jusqu'à leur co-activation par une molécule de signalisation externe. Bellicum utilise également un signal suicide offrant un niveau de contrôle supplémentaire. Cette approche offre des avantages clés par rapport aux CAR-T « nus » de premières générations qui peuvent être plus enclins à déclencher des CRS incontrôlés ou d'autres effets secondaires (comme des neurotoxicités).

Si la survenue des effets indésirables ne peut être anticipé lors de la conception, les pharmacies et les services cliniques ont le devoir de **se doter de tous les traitements nécessaires** à la bonne prise en charge de ces effets. Pour les CAR-T, l'administration d'inhibiteurs du récepteur à l'IL6 ou d'anti-IL6 restent les traitements de choix du CRS. Aux Etats Unis, le Tocilizumab® (anti-IL6R) possède une AMM pour cette indication. Il est souvent administré en concomitance avec des corticoïdes. Se procurer ces types de médicaments dans les PUI avec une dotation dans les unités de soins (ex. service de réanimation) est devenu alors un pré-requis à l'instauration de ces CAR-T dans un centre clinique.

Cette prise en charge n'est pas anodine notamment sur le plan financier (ex. 800€ la cure de Tocilizumab® et au minimum 14 jours d'hospitalisation). Elle demande donc une coordination forte (Figure 57) et un investissement supplémentaire des centres cliniques voyant le prix global du traitement par MTI être revu à la hausse ; ce qui engendre un frein à la commercialisation des MTI et un défi majeur à surmonter.

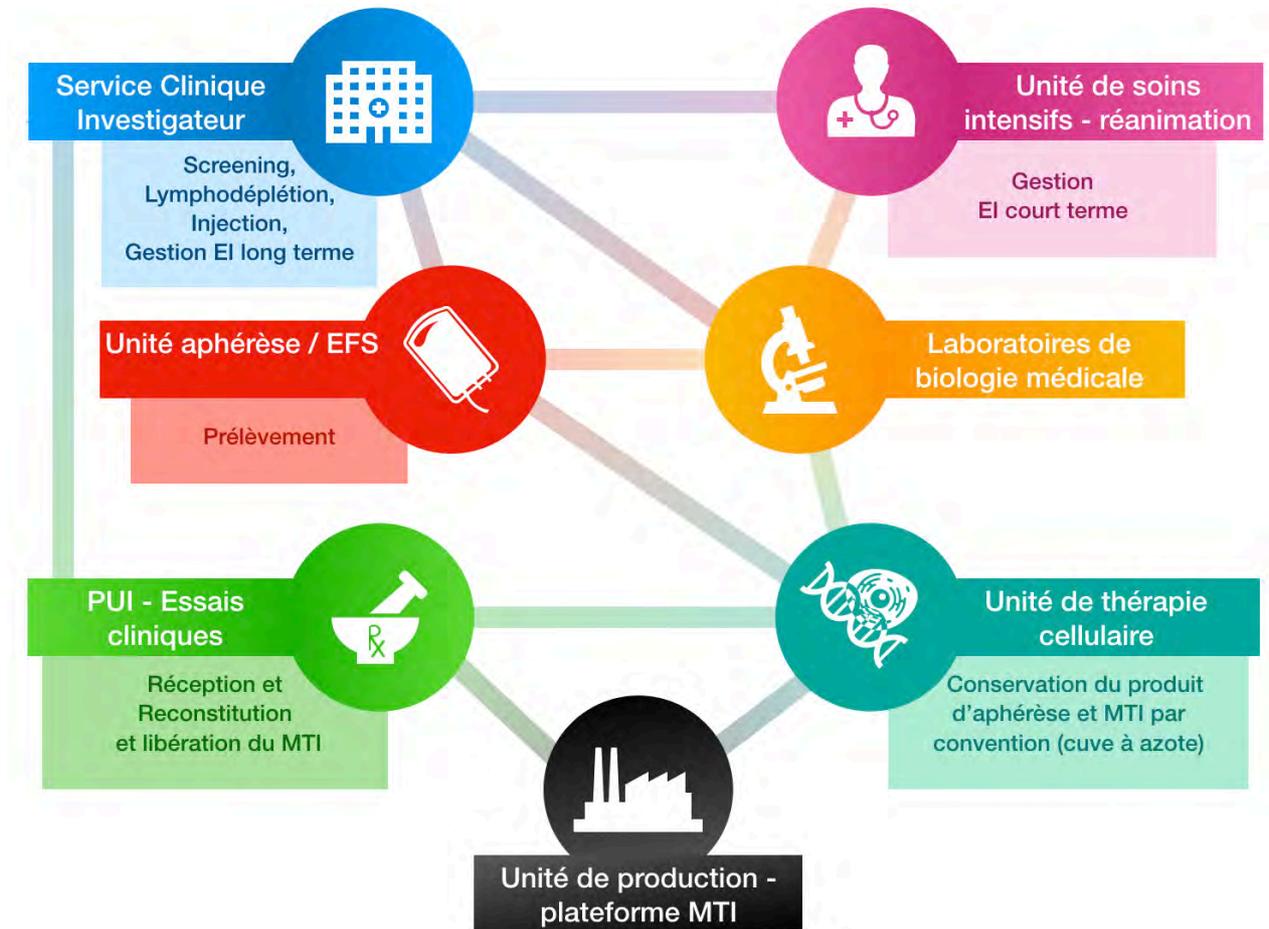


Figure 57 : Exemple de mise en place et interactions du circuit hospitalier des cellules CAR-T.

EI = effets indésirables

5. Les défis de la commercialisation des MTI

5.1. Investissements dans le champ des MTI

Le développement de MTI nécessite de nombreux et différents types d'investissements depuis le financement d'un projet de recherche, à la production clinique, jusqu'au stockage dans les unités cliniques. Les principaux succès des MTI proviennent de la recherche académique. L'exploitation vers la clinique nécessite un transfert technologique vers des producteurs BPF qui sont des établissements pharmaceutiques (Start-up et/ou Big Pharma), donc des investisseurs d'entreprises de biotechnologies.

Les investisseurs préfèrent généralement retarder l'investissement et éviter les frais de l'optimisation de la fabrication de médicaments jusqu'à ce qu'un produit soit suffisamment avancé en déve-

veloppement clinique (faible risque et intérêt important). Le démarrage des essais cliniques de phases précoces nécessite de grands investissements pour démarrer le développement (risques importants et intérêt incertain) de MTI. Les investisseurs préfèrent donc intervenir après les premières phases cliniques (I/II) pour justifier l'allocation des ressources nécessaires à l'adaptation de la production des MTI à une plus grande échelle. Cependant, il devrait être bien compris que la fabrication évolutive des MTI (augmentation des demandes) peut être économiquement impossible à gérer si les procédés ne sont pas modifiés, en particulier lorsque la fabrication devient particulièrement intensive en main-d'œuvre. Toute modification du processus de fabrication nécessitera des études de comparabilité, qui doivent être approfondies. Des modifications plus importantes du protocole de fabrication peuvent même nécessiter une nouvelle autorisation ou une répétition d'essais cliniques. Les investisseurs doivent alors s'engager à développer des processus évolutifs (quel que soit le nombre de demandes) en début de développement pour réaliser correctement leur essais cliniques, conditions requises à l'obtention d'une AMM, et indispensable de retour sur investissement de leur produit de première génération. De nombreux investisseurs ont préféré autoriser un produit de première génération avec un processus manuel et peu évolutif avant d'investir dans un produit de seconde génération évolutif et automatisé. Les investisseurs doivent être conscients des limites du retour sur investissement pour le produit de première génération lors de l'adoption de cette stratégie.

5.2. Remboursement des MTI

Dans le développement de médicaments, la stratégie de prix sera toujours principalement liée au prix d'acceptabilité perçu par le marché. Ce prix est déterminé selon différents facteurs tels que les produits concurrents, la taille du marché et surtout le bénéfice pour le patient. La complexité de la tarification des MTI est principalement due au manque de comparaison de leur efficacité clinique puisque ces thérapies innovantes ciblent majoritairement des maladies n'ayant aucune autre option thérapeutique. Par conséquent, il n'existe pas de données antérieures pour une évaluation précise des technologies et des stratégies de tarification appropriées, ce qui complique davantage le processus et limite les options pour une stratégie de remboursement claire ¹⁹⁴.

Pouvons-nous donc supposer que les méthodologies de remboursements actuelles ne peuvent pas fonctionner pour les MTI ?

Les dernières thérapies géniques approuvées par la FDA (Kymriah®, Yescarta®) confirment la tendance des industriels des biotechnologies à vendre leur MTI au prix fort. On parle de traitements de l'ordre de 475 000 \$ US par patient pour le premier CAR-T (Kymriah®, Novartis) et de 325 000 \$ US par patient pour le second (Yescarta®, Gilead). Si on prend l'exemple de Novartis, ceci s'explique par l'important investissement pour le développement estimé à 1 milliard d' \$ US qui doit être rentabilisé. Ces compagnies ont proposé de rembourser totalement la thérapie si les patients n'y répondent pas (au bout d'un mois), leur permettant de commercialiser le MTI à un prix très élevé, malgré des dépenses de fabri-

cation correspondant seulement au 1/10^{ème} du prix final (40 000 \$ US par traitement). Leur objectif se traduirait par une marge bénéficiaire de 84% en moyenne sur 10 ans. Le fait de rembourser le traitement après une évaluation à 1 mois après injection est critiquable, lorsque l'on sait que leur inefficacité clinique est réellement démontrée après plus d'un mois pour la plupart des cas de rechutes. Même si le prix est important, il est toutefois à noter que l'on parle ici d'un traitement novateur en prise unique avec un bénéfice encore inégalé pour traiter des situations inespérées. Si l'on compare le prix de certains traitements orphelins comme Spinraza® (Nusinersen) de Biogen qui coûte 750 000 \$ US la première année, Kymriah® revient 2 fois moins cher avec une injection unique pour une durée d'action prolongée de plusieurs années. Ce type de médicament « one shot » engendre un système médico-économique sans précédent et pose finalement plus un problème de commercialisation et d'accès plutôt qu'un problème de prix de remboursement, si l'efficacité prolongée est démontrée.

D'autres MTI possèdent déjà une AMM, comme Glybera® une thérapie génique *in vivo* à médiation virale adéno-associée qui compense la lipoprotéine lipase chez les patients atteints de déficience familiale en lipoprotéine lipase, à un prix de 1,1 à 1,4 million \$ US. La société Uniqure, développeur de Glybera®, première thérapie génique approuvée au monde, a récemment annoncé qu'elle ne demanderait pas le renouvellement de son autorisation de mise sur le marché auprès de l'EMA du fait de la demande trop faible. Par conséquent, ChondroCelect®, une thérapie tissulaire basée sur des cellules autologues, est la seule thérapie de pointe à avoir obtenu un remboursement national dans l'UE, mais seulement dans trois pays, à savoir l'Espagne, la Belgique et les Pays-Bas. Ceci est peut-être dû à son prix plus modeste de 24 000 \$ US par rapport aux autres MTI : Glybera® (1,1-1,4 millions \$ US) , Provenge® (93 000 \$ US) et à Strimvelis® (594 000 - 665 000 \$ US) ¹⁹⁵. Les autres thérapies innovantes autorisées par l'UE n'ont pas encore obtenu le remboursement national dans l'UE. Les méthodologies actuelles pour décider du remboursement des médicaments sont très différentes, en raison des différentes stratégies adoptées par les payeurs de soins de santé dans les différents pays, mais peuvent fonctionner pour les MTI.

En France, la Commission de la transparence, une subdivision de la Haute Autorité de Santé (HAS), évalue l'efficacité clinique et la sécurité et conclut sur le service médical rendu (SMR), ainsi que sur l'amélioration du service médical rendu (ASMR) comparateur approprié. Le SMR est utilisé par l'Union nationale des caisses d'assurance maladie pour fixer le taux de remboursement, tandis que l'ASMR est pris en compte par le comité économique des produits de santé (CEPS) du Ministère de la santé lors de la négociation du prix plafond remboursé. Les thérapies présentant à la fois une amélioration substantielle des bénéfices cliniques (ASMR I-III) et un impact budgétaire estimé à 20 millions d'euros font également l'objet d'une évaluation CE par la commission économique utilisée par le CEPS dans les négociations de prix.

Pour les MTI, qui sont principalement utilisés en milieu hospitalier, les comités des médicaments et des dispositifs médicaux stériles (COMEDIMS) jouent également un rôle central pour l'accès au marché, puisqu'ils décident de l'inclusion finale dans le formulaire des listes hospitalières ¹⁹⁶. Les prix des thérapies avec des améliorations modérées (ASMR IV-V) sont négociés sur la base des prix de référence nationaux, tandis que les prix pour les thérapies avec des améliorations substantielles du bénéfice clinique (ASMR I-III) sont comparés au prix du même traitement dans l'UE (Allemagne, Italie, Espagne et Royaume-Uni). Le score ASMR et les analyses CE sont utilisés comme leviers pour déterminer le niveau de prix acceptable pour le remboursement. Il convient de souligner qu'aucun seuil de remboursement selon un gain sur l'année de vie pondérée par la qualité (QALY) n'a été défini en France contrairement au Royaume-Uni, et que la CEESP ne devrait pas être prescriptive à cet égard. Les accords sur les prix et les volumes sont largement utilisés pour réduire l'incertitude entourant l'impact budgétaire.

En conclusion, l'établissement d'un prix de remboursement fait intervenir plusieurs strates et différents organismes. Cibler les populations de morbidité élevée et de besoins non satisfaits peut être avantageux, car le potentiel d'amélioration des avantages cliniques est plus grand, ainsi que le potentiel de capitalisation des compensations des coûts des soins de santé. De plus, le ciblage de petites populations peut également aider à réduire les préoccupations budgétaires des payeurs et les risques imposés de non-remboursement ¹⁹⁷.

DISCUSSION

Les médicaments de thérapie innovante (MTI) sont des médicaments qui s'appuient sur des matériaux génétiques, cellulaires ou actifs vivants pour offrir de nouvelles modalités de traitement dans un éventail de maladies aiguës et chroniques.

L'immuno-oncologie est actuellement un axe commercial majeur représentant plus de la moitié des essais cliniques et plus de 1,5 milliard de dollars d'investissements publics et privés, mais d'autres marchés cibles sont de plus en plus pris en considération. La plupart des essais cliniques sont en phase I/II et encore très peu de MTI sont commercialisés.

Toutefois, GlaxoSmithKline (GSK) a développé et autorisé la première thérapie génique *ex vivo* (Strimvelis). Novartis devrait largement lancer le premier produit CAR-T (thérapie génique) cette année en Europe. Déjà commercialisées aux Etats-Unis, Kymriah® et Yescarta®, les cellules CAR-T anti-CD19 apportent des résultats impressionnants dans la lutte contre les hémopathies malignes.

La vectorisation de gènes *via* des vecteurs viraux est une méthode intégrative avec ses avantages et limites bien connus maintenant. Le développement en clinique de méthodes non-intégratives de type plasmidiques miniaturisés ou synthétiques permettrait de transférer du matériel génétique tout en évitant la formation de tumeurs malignes dans les cellules cibles.

L'édition du génome par CRISPR/cas9 dans les pathologies génétiques est en plein essor scientifique, et les premières applications cliniques sont très attendues en prenant en considération les problèmes d'éthique. L'utilisation de la technologie TALEN permet d'ores et déjà d'obtenir un aperçu de son potentiel dans la formation des CAR-T allogéniques de Cellectis via la répression d'expression du TCR.

Outre leur capacité de différenciation utile pour l'ingénierie tissulaire *ex vivo*, l'utilisation de cellules souches adultes multipotentes telles que les CSM/ADSC (thérapie cellulaire somatique) porte leur réel potentiel régénératif par la sécrétion d'agents trophiques modulant l'inflammation et la régulation des morts cellulaires *in vivo* qui restent encore à comprendre scientifiquement. TiGenix commercialise Alofisel®, la première thérapie à base de CSM en Europe.

Les cellules souches pluripotentes (CSE et iPS) doivent encore montrer leur innocuité avant de, peut-être, devenir le traitement révolutionnaire des années à venir en médecine régénérative.

En ce qui concerne l'ingénierie tissulaire, les cultures cellulaires en 3D semblent être une approche intéressante avec des applications encore restreintes à la culture *ex vivo* de peau à partir de fi-

broblastes et kératinocytes sur des hydrogels d'origine animale, ou de cartilage à partir de chondrocytes ou CSM sur des céramiques ou non, comme l'AMM obtenue par CO.DON AG pour Spherox® en 2017. D'une efficacité encore perfectible, ces tissus générés *ex vivo* ont cependant une forte valeur en termes de modélisation de tissus humains. La recherche sur les organoïdes humains semble prometteuse et vendre ces tissus comme modèle à d'autres industriels ou académiques peut devenir une source de revenu supplémentaire pour un établissement pharmaceutique.

L'industrie des MTI se caractérise principalement par de petites sociétés de biotechnologie, soutenues en grande partie par des efforts académiques, dont la recherche fondamentale et translationnelle sont entretenues par des fonds publics. En France, le maillage des plateformes de production de MTI expérimentaux de l'EFS domine le marché, tandis que quelques unités au sein des CHU se développent depuis le décret du 15 novembre 2016. L'élaboration de telles unités de production est un défi en soi, devant répondre à un cahier des charges BPF fourni, demandant un investissement financier très important ainsi qu'un management d'équipe efficace.

Les MTI sont réglementés et autorisés à être commercialisés par l'Agence européenne des médicaments (EMA) dans l'UE et la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis, qui ont chacune des voies de commercialisation spécifiques en fonction de la catégorisation juridique du produit. Plusieurs agences réglementaires offrent maintenant une approbation conditionnelle après l'acquisition de données précoces de sécurité et d'efficacité. La désignation orpheline d'un MTI est également recherchée par le nombre important d'avantages économiques octroyés pour son développement, ainsi qu'en termes de conseils scientifiques.

La compréhension profonde de la biologie fondamentale et du mécanisme d'action d'un produit est absolument essentielle pour atténuer la complexité des MTI, et doit être utilisée autant dans la conception et l'optimisation de la fabrication, que dans la validation du développement clinique, et de la chaîne d'approvisionnement. La complexité et la labilité des MTI font de la fabrication et de la chaîne d'approvisionnement des préoccupations à haut risque. Les difficultés rencontrées à définir avec précision un MTI à base de cellules signifient que la caractérisation d'un MTI peut être définie en partie par son processus de fabrication. Par conséquent, la modification du processus de fabrication peut compromettre non seulement l'intégrité du produit mais surtout les accords réglementaires basés sur la définition d'un processus précis. Pour réduire ce risque, il est essentiel de concevoir un procédé de fabrication évolutif et de préférence automatisé le plus précocement possible dans le développement clinique voire pré-clinique qui ne nécessite que peu de modifications pour une commercialisation à grande échelle.

Certaines grandes entreprises ont sacrifié la fabrication de produits de première génération, choisissant de mettre en œuvre l'automatisation de leurs produits de deuxième génération. Plusieurs ac-

teurs majeurs de la fabrication offrent désormais des services dans ce secteur fournissant à la fois des solutions personnalisées et des instruments de mesure que ce soit pour la production, les étapes *a posteriori* (que sont le conditionnement, la cryoconservation et la reconstitution extemporanée), ou le contrôle qualité.

Les défis supplémentaires incluent l'approvisionnement insuffisant et la variabilité entre les matières premières. L'optimisation d'algorithmes d'apprentissage automatique (intelligence artificielle) regroupant tests fonctionnels et efficacité clinique, permettrait de sélectionner les meilleurs donneurs pour créer des banques de cellules allogéniques de variabilité contrôlée. Tandis que l'établissement de fiches de spécifications et d'acceptabilité détaillées semble primordial aux contrôles de chaque lot de matières premières (biologiques comme non biologiques). La stabilité des matières premières, la complexité de fabrication et la stabilité du produit fini conditionnent le modèle de production (centralisée / décentralisée) d'un MTI.

Les contrôles qualité des MTI doivent répondre à la Pharmacopée européenne et aux BPF en termes de sécurité microbiologique et de caractérisation biologique. Ils sont établis selon une approche basée sur le risque afin de donner une flexibilité réglementaire aux industriels. La validation de tests fonctionnels spécifiques de chaque MTI couplée à des modèles pathologiques pertinents sont les axes à développer pour établir des consensus selon les typologies de cellules, vecteurs, etc. en fonction de l'indication recherchée. Un réseau de plateformes expertes (BPF) est en forte expansion et propose l'externalisation des contrôles qualité des MTI au vu de la complexité de mise en oeuvre pour un établissement pharmaceutique.

Le transport et la logistique peuvent être des étapes à haut risque du circuit des MTI. Les thérapies autologues doivent être suivies tout au long de la chaîne d'approvisionnement circulaire, et les produits à base de cellules peuvent souffrir de courtes durées de vie. Des logiciels de suivi en temps réel, tels que la plateforme TrackCel permettent de mieux gérer ce circuit, néanmoins le manque de transporteurs compatibles freine dans la pratique son utilisation.

L'adaptation du circuit hospitalier français comme dernier maillon de la chaîne est un défi crucial. La problématique de l'absence des locaux dédiés aux MTI est récurrente dans les PUI des établissements de santé. Le stockage à long terme et la reconstitution des MTI est donc difficile à l'heure actuelle. Afin de pallier ces problèmes et favoriser l'accès des MTI aux patients, la PUI doit établir des conventions avec les unités de thérapie cellulaire et génique (UTC/UTG) adjacentes, pour leur stockage dans des cuves à azote, ainsi que pour leur reconstitution dans des ZAC dédiées notamment pour les OGM, et avec des équipements fournis par les promoteurs des MTI expérimentaux. De plus, les PUI doivent se doter des médicaments contre les effets indésirables importants engendrés par ces thérapies novatrices.

Enfin, la formation des différents acteurs nécessaire à l'établissement de ce circuit hospitalier des MTI doit être renforcée.

Le prix des produits devrait être basé sur la valeur au payeur plutôt que sur le coût de production. Les médicaments à prix élevé tels que les thérapies géniques «curatives» peuvent être inabordables pour les organismes de remboursement, même s'ils sont jugés rentables. Saisir la valeur réelle des thérapies offrant des gains cliniques à long terme est difficile et nécessite des résultats d'essais cliniques à long terme ou d'extrapoler les données acquises. Dans certains cas, une évaluation économique sur les coûts des soins de santé indirects, comme la prise en charge des effets indésirables, sera à entreprendre en complément. Le prix n'est pas le seul obstacle à l'accès au marché des MTI, la facilité d'utilisation et la perturbation du circuit peuvent affecter leur succès.

La France a aujourd'hui entre les mains tous les atouts pour permettre un réel succès de sa filière industrielle des thérapies innovantes. Tous les acteurs sont présents et s'efforcent de se mettre à jour sur ce nouveau circuit pharmaceutique. Cependant, des freins à ce développement ont été identifiés et des solutions proposées, dont plusieurs dépendent des décisions des pouvoirs publics. Le Japon et les Etats-Unis portent respectivement leur espoir sur les cellules pluripotentes et les cellules CAR-T. L'enjeu est de taille pour la France ; éviter que se reproduise dans le domaine de la médecine régénérative ce qui est arrivé dans le cas de médicaments contre le SIDA et des anticorps monoclonaux, où la France a été une terre de découverte, mais qui n'a pas développé la production industrielle par la suite.

BIBLIOGRAPHIE

1. Lynch Lambert J. 2017 Annual Data Report. alliancerm.org.
2. Patricia R. Q1 2018 - Quaterly Data Report. alliancerm.org.
3. RANQUE D, Rousseau L, STEPHAN R, et al. Quelques explications sur l'échelle des TRL. entreprises.gouv.fr.
4. CAT. *Scientific Guideline on Minimum Quality and Non-Clinical Data for Certification of Advanced Therapy Medicinal Products*. 2010:1-22.
5. CBER. **Guidance for Industry**. 2013:1-35.
6. Au P. *Preparing an IND Application: Preclinical Considerations for Cell and Gene Therapy Products*. 2013:1-36.
7. EMA. *EudraLex the Rules Governing Medicinal Products in the European Union Volume 4 Good Manufacturing Practice Guidelines on Good Manufacturing Practice Specific to Advanced Therapy Medicinal Products*. 2017:1-90.
8. Jekerle V, Schröder C, Pedone E. Legal basis of the Advanced Therapies Regulation. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. 2010;53(1):4-8. doi: 10.1007/s00103-009-0990-6.
9. Committee for Advanced Therapies (CAT), CAT Scientific Secretariat, Schneider CK, et al. Challenges with advanced therapy medicinal products and how to meet them. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(3):195-201. doi:10.1038/nrd3052.
10. Klug B, Celis P, Carr M, Reinhardt J. Regulatory structures for gene therapy medicinal products in the European Union. *Meth Enzymol*. 2012;507:337-354. doi:10.1016/B978-0-12-386509-0.00017-X.
11. Cohen-Haguener O. A comprehensive resource on EU regulatory information for investigators in gene therapy clinical research and advanced therapy medicinal products. *Human Gene Therapy*. 2013;24(1):12-18. doi:10.1089/hum.2012.2525.
12. Hanna E, Rémuzat C, Auquier P, Toumi M. Advanced therapy medicinal products: current and future perspectives. *Journal of Market Access & Health Policy*. 2016;4(1):31036–11. doi: 10.3402/jmahp.v4.31036.
13. Hara A, Sato D, Sahara Y. New Governmental Regulatory System for Stem Cell–Based Therapies in Japan. *Therapeutic Innovation & Regulatory Science*. 2014;48(6):681-688. doi: 10.1177/2168479014526877.
14. Wade G, EMA. *The Centralised Procedure Presentation*. 2010:1-11. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Presentation/2010/03/WC500074885.pdf.
15. Elsanhoury A, Sanzenbacher R, Reinke P, Abou-EI-Enein M. Accelerating Patients' Access to Advanced Therapies in the EU. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2017;7:15-19. doi:10.1016/j.omtm.2017.08.005.
16. EMA. *European Medicines Agency Guidance for Applicants Seeking Access to PRIME Scheme*. 2018:1-10.

17. Wubbolts R, Fernandez-Bona M, Neefjes J. MHC class II molecules: transport pathways for antigen presentation. *Trends Cell Biol.* 1997;7(3):115-118. doi:10.1016/S0962-8924(97)01000-3.
18. Zakrzewski JL, van den Brink MRM, Hubbell JA. Overcoming immunological barriers in regenerative medicine. *Nat Biotechnol.* 2014;32(8):786-794. doi:10.1038/nbt.2960.
19. Visvader JE, Clevers H. Tissue-specific designs of stem cell hierarchies. *Nat Cell Biol.* 2016;18(4):349-355. doi:10.1038/ncb3332.
20. Weissman IL. Stem cells: units of development, units of regeneration, and units in evolution. *Cell.* 2000;100(1):157-168.
21. Surani A, Tischler J. Stem cells: a sporadic super state. *Nature.* 2012;487(7405):43-45. doi:10.1038/487043a.
22. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature.* 1981;292(5819):154-156.
23. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science.* 1998;282(5391):1145-1147.
24. Amit M, Carpenter MK, Inokuma MS, et al. Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Developmental Biology.* 2000;227(2):271-278. doi:10.1006/dbio.2000.9912.
25. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.* 1998;95(3):379-391.
26. Muñoz Descalzo S, Rué P, Faunes F, et al. A competitive protein interaction network buffers Oct4-mediated differentiation to promote pluripotency in embryonic stem cells. *Mol Syst Biol.* 2013;9(1):694-694. doi:10.1038/msb.2013.49.
27. Alper J. Geron gets green light for human trial of ES cell-derived product. *Nature biotechnology.* March 2009:213-214.
28. Song WK, Park K-M, Kim H-J, et al. Treatment of macular degeneration using embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium: preliminary results in Asian patients. *Stem Cell Reports.* 2015;4(5):860-872. doi:10.1016/j.stemcr.2015.04.005.
29. Schwartz SD, Hubschman J-P, Heilwell G, et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet.* 2012;379(9817):713-720. doi:10.1016/S0140-6736(12)60028-2.
30. Schwartz SD, Regillo CD, Lam BL, et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet.* 2015;385(9967):509-516. doi:10.1016/S0140-6736(14)61376-3.
31. Mandai M, Fujii M, Hashiguchi T, et al. iPSC-Derived Retina Transplants Improve Vision in rd1 End-Stage Retinal-Degeneration Mice. *Stem Cell Reports.* 2017;8(4):1112-1113. doi:10.1016/j.stemcr.2017.03.024.
32. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* 2006;126(4):663-676. doi:10.1016/j.cell.2006.07.024.

33. Nichols J, Smith A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell*. 2009;4(6):487-492. doi:10.1016/j.stem.2009.05.015.
34. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes & Development*. 2003;17(1):126-140. doi:10.1101/gad.224503.
35. Yamanaka S, Blau HM. Nuclear reprogramming to a pluripotent state by three approaches. *Nature*. 2010;465(7299):704-712. doi:10.1038/nature09229.
36. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872. doi:10.1016/j.cell.2007.11.019.
37. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-1920. doi:10.1126/science.1151526.
38. Cavaleri F, Schöler HR. Nanog: a new recruit to the embryonic stem cell orchestra. *Cell*. 2003;113(5):551-552.
39. Darr H, Benvenisty N. Genetic analysis of the role of the reprogramming gene LIN-28 in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2009;27(2):352-362. doi:10.1634/stemcells.2008-0720.
40. Stadtfeld M, Hochedlinger K. Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications. *Genes & Development*. 2010;24(20):2239-2263. doi:10.1101/gad.1963910.
41. Olivier EN, Marenah L, McCahill A, Condie A, Cowan S, Mountford JC. High-Efficiency Serum-Free Feeder-Free Erythroid Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells Using Small Molecules. *Stem Cells Transl Med*. 2016;5(10):1394-1405. doi:10.5966/sctm.2015-0371.
42. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25.
43. TILL JE, McCULLOCH EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res*. 1961;14:213-222.
44. fmesnil. Activité nationale de greffe de CSH 2016. *ABM*. July 2017:1-43.
45. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature*. 2001;410(6829):701-705. doi:10.1038/35070587.
46. Porada CD, Atala AJ, Almeida-Porada G. The hematopoietic system in the context of regenerative medicine. *Methods*. 2016;99:44-61. doi:10.1016/j.ymeth.2015.08.015.
47. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. *Cell*. 2004;116(5):639-648.
48. Terstappen LW, Huang S, Safford M, Lansdorp PM, Loken MR. Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38- progenitor cells. *Blood*. 1991;77(6):1218-1227.
49. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function? *Cell*. 2001;105(7):829-841.
50. Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature*. 2004;428(6983):668-673. doi:10.1038/nature02460.

51. Nygren JM, Jovinge S, Breitbach M, et al. Bone marrow-derived hematopoietic cells generate cardiomyocytes at a low frequency through cell fusion, but not transdifferentiation. *Nat Med*. 2004;10(5):494-501. doi:10.1038/nm1040.
52. Behbahan IS, Keating A, Gale RP. Bone Marrow Therapies for Chronic Heart Disease. *Stem Cells*. 2015;33(11):3212-3227. doi:10.1002/stem.2080.
53. Blaese RM, Culver KW, Miller AD, et al. T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years. *Science*. 1995;270(5235):475-480.
54. Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Cavazzana-Calvo M. 20 years of gene therapy for SCID. *Nat Immunol*. 2010;11(6):457-460. doi:10.1038/ni0610-457.
55. Bianco P, Cao X, Frenette PS, et al. The meaning, the sense and the significance: translating the science of mesenchymal stem cells into medicine. *Nat Med*. 2013;19(1):35-42. doi:10.1038/nm.3028.
56. Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Human Gene Therapy*. 2010;21(9):1045-1056. doi:10.1089/hum.2010.115.
57. Pontikoglou C, Deschaseaux F, Sensebe L, Papadaki HA. Bone marrow mesenchymal stem cells: biological properties and their role in hematopoiesis and hematopoietic stem cell transplantation. *Stem Cell Rev*. 2011;7(3):569-589. doi:10.1007/s12015-011-9228-8.
58. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*. 1968;6(2):230-247.
59. Bruder SP, Fink DJ, Caplan AI. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy. *J Cell Biochem*. 1994;56(3):283-294. doi:10.1002/jcb.240560303.
60. Huang GT-J, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res*. 2009;88(9):792-806. doi:10.1177/0022034509340867.
61. Roura S, Pujal JM, Gálvez-Montón C, Bayes-Genis A. Impact of umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells on cardiovascular research. *Biomed Res Int*. 2015;2015(78):975302-975306. doi:10.1155/2015/975302.
62. In 't Anker PS, Scherjon SA, Kleijburg-van der Keur C, et al. Isolation of mesenchymal stem cells of fetal or maternal origin from human placenta. *Stem Cells*. 2004;22(7):1338-1345. doi:10.1634/stemcells.2004-0058.
63. Casteilla L, Planat-Bénard V, Laharrague P, Cousin B. Adipose-derived stromal cells: Their identity and uses in clinical trials, an update. *World J Stem Cells*. 2011;3(4):25-33. doi:10.4252/wjsc.v3.i4.25.
64. Ménard C, Tarte K. Immunoregulatory properties of clinical grade mesenchymal stromal cells: evidence, uncertainties, and clinical application. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):64. doi:10.1186/scrt214.
65. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006;8(4):315-317. doi:10.1080/14653240600855905.
66. Brennan MÁ, Renaud A, Guilloton F, et al. Inferior In Vivo Osteogenesis and Superior Angio-

- genesis of Human Adipose Tissue: A Comparison with Bone Marrow-Derived Stromal Stem Cells Cultured in Xeno-Free Conditions. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(12):2160-2172. doi:10.1002/sctm.17-0133.
67. Oh M, Nör JE. The Perivascular Niche and Self-Renewal of Stem Cells. *Front Physiol.* 2015;6:367. doi:10.3389/fphys.2015.00367.
 68. Stanovici J, Le Nail L-R, Brennan MA, et al. Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery. *Curr Res Transl Med.* 2016;64(2):83-90. doi:10.1016/j.retram.2016.04.006.
 69. Skovrlj B, Guzman JZ, Maaieh Al M, Cho SK, Iatridis JC, Qureshi SA. Cellular bone matrices: viable stem cell-containing bone graft substitutes. *Spine J.* 2014;14(11):2763-2772. doi:10.1016/j.spinee.2014.05.024.
 70. Brennan MÁ, Renaud A, Amiaud J, et al. Pre-clinical studies of bone regeneration with human bone marrow stromal cells and biphasic calcium phosphate. *Stem Cell Res Ther.* 2014;5(5):114-115. doi:10.1186/scr504.
 71. Espagnolle N, Balguerie A, Arnaud E, Sensebe L, Varin A. CD54-Mediated Interaction with Pro-inflammatory Macrophages Increases the Immunosuppressive Function of Human Mesenchymal Stromal Cells. *Stem Cell Reports.* 2017;8(4):961-976. doi:10.1016/j.stemcr.2017.02.008.
 72. Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, et al. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet.* 2004;363(9419):1439-1441. doi:10.1016/S0140-6736(04)16104-7.
 73. Phinney DG, Prockop DJ. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair--current views. *Stem Cells.* 2007;25(11):2896-2902. doi:10.1634/stemcells.2007-0637.
 74. Amorin B, Alegretti AP, Valim V, et al. Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Hum Cell.* 2014;27(4):137-150. doi:10.1007/s13577-014-0095-x.
 75. Takashima Y, Era T, Nakao K, et al. Neuroepithelial cells supply an initial transient wave of MSC differentiation. *Cell.* 2007;129(7):1377-1388. doi:10.1016/j.cell.2007.04.028.
 76. Konishi A, Sakushima K, Isobe S, Sato D. First Approval of Regenerative Medical Products under the PMD Act in Japan. *Cell Stem Cell.* 2016;18(4):434-435. doi:10.1016/j.stem.2016.03.011.
 77. Laroye C, Gibot S, Reppel L, Bensoussan D. Concise Review: Mesenchymal Stromal/Stem Cells: A New Treatment for Sepsis and Septic Shock? *Stem Cells.* 2017;35(12):2331-2339. doi:10.1002/stem.2695.
 78. Sun L, Wang D, Liang J, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* 2010;62(8):2467-2475. doi:10.1002/art.27548.
 79. Caplan AI. MSCs: The Sentinel and Safe-Guards of Injury. *J Cell Physiol.* 2016;231(7):1413-1416. doi:10.1002/jcp.25255.
 80. Cai J, Wu Z, Xu X, et al. Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cell With Autologous Bone Marrow Cell Transplantation in Established Type 1 Diabetes: A Pilot Randomized Controlled Open-Label Clinical Study to Assess Safety and Impact on Insulin Secretion. *Diabetes Care.* 2016;39(1):149-157. doi:10.2337/dc15-0171.

81. Petrou P, Gothelf Y, Argov Z, et al. Safety and Clinical Effects of Mesenchymal Stem Cells Secreting Neurotrophic Factor Transplantation in Patients With Amyotrophic Lateral Sclerosis: Results of Phase 1/2 and 2a Clinical Trials. *JAMA Neurol.* 2016;73(3):337-344. doi: 10.1001/jamaneurol.2015.4321.
82. Harris VK, Stark J, Vyshkina T, et al. Phase I Trial of Intrathecal Mesenchymal Stem Cell-derived Neural Progenitors in Progressive Multiple Sclerosis. *EBioMedicine.* 2018;29:23-30. doi:10.1016/j.ebiom.2018.02.002.
83. Hasan A, Deeb G, Rahal R, et al. Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Traumatic Brain Injury. *Front Neurol.* 2017;8(Pt B):28. doi:10.3389/fneur.2017.00028.
84. Naji A, Suganuma N, Espagnolle N, et al. Rationale for Determining the Functional Potency of Mesenchymal Stem Cells in Preventing Regulated Cell Death for Therapeutic Use. *Stem Cells Transl Med.* 2017;6(3):713-719. doi:10.5966/sctm.2016-0289.
85. Paliwal S, Chaudhuri R, Agrawal A, Mohanty S. Regenerative abilities of mesenchymal stem cells through mitochondrial transfer. *J Biomed Sci.* 2018;25(1):31. doi:10.1186/s12929-018-0429-1.
86. Galipeau J, Sensebe L. Mesenchymal Stromal Cells: Clinical Challenges and Therapeutic Opportunities. *Cell Stem Cell.* 2018;22(6):824-833. doi:10.1016/j.stem.2018.05.004.
87. Squillaro T, Peluso G, Galderisi U. Clinical Trials With Mesenchymal Stem Cells: An Update. *Cell Transplant.* 2016;25(5):829-848. doi:10.3727/096368915X689622.
88. Valton J, Guyot V, Marechal A, et al. A Multidrug-resistant Engineered CAR T Cell for Allogeneic Combination Immunotherapy. *Mol Ther.* 2015;23(9):1507-1518. doi:10.1038/mt.2015.104.
89. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med.* 1987;316(15):889-897. doi:10.1056/NEJM198704093161501.
90. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(4):269-281. doi:10.1038/nri3191.
91. Baldan V, Griffiths R, Hawkins RE, Gilham DE. Efficient and reproducible generation of tumour-infiltrating lymphocytes for renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2015;112(9):1510-1518. doi:10.1038/bjc.2015.96.
92. Balatoni T, Mohos A, Papp E, et al. Tumor-infiltrating immune cells as potential biomarkers predicting response to treatment and survival in patients with metastatic melanoma receiving ipilimumab therapy. *Cancer Immunol Immunother.* 2018;67(1):141-151. doi:10.1007/s00262-017-2072-1.
93. Qian C, Wang Y, Reppel L, et al. Viral-specific T-cell transfer from HSCT donor for the treatment of viral infections or diseases after HSCT. *Bone Marrow Transplant.* 2018;53(2):114-122. doi:10.1038/bmt.2017.232.
94. Papadopoulos EB, Ladanyi M, Emanuel D, et al. Infusions of donor leukocytes to treat Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders after allogeneic bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1994;330(17):1185-1191. doi:10.1056/NEJM199404283301703.
95. Vickers MA, Wilkie GM, Robinson N, et al. Establishment and operation of a Good Manufac-

- turing Practice-compliant allogeneic Epstein-Barr virus (EBV)-specific cytotoxic cell bank for the treatment of EBV-associated lymphoproliferative disease. *Br J Haematol.* 2014;167(3):402-410. doi:10.1111/bjh.13051.
96. Grant ML, Bollard CM. Cell therapies for hematological malignancies: don't forget non-gene-modified t cells! *Blood Rev.* 2018;32(3):203-224. doi:10.1016/j.blre.2017.11.004.
 97. Tiberghien P, Reynolds CW, Keller J, et al. Ganciclovir treatment of herpes simplex thymidine kinase-transduced primary T lymphocytes: an approach for specific in vivo donor T-cell depletion after bone marrow transplantation? *Blood.* 1994;84(4):1333-1341.
 98. Amro Elshoury, Wallace PK, Borowitz MJ, et al. BPX-501 T cells interfere with minimal residual disease evaluation of B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Bone Marrow Transplant.* 2018;53(5):651-653. doi:10.1038/s41409-017-0036-x.
 99. André-Schmutz I, Le Deist F, Hacein-Bey-Abina S, et al. Immune reconstitution without graft-versus-host disease after haemopoietic stem-cell transplantation: a phase 1/2 study. *Lancet.* 2002;360(9327):130-137. doi:10.1016/S0140-6736(02)09413-8.
 100. Feuchtinger T, Lücke J, Hamprecht K, et al. Detection of adenovirus-specific T cells in children with adenovirus infection after allogeneic stem cell transplantation. *Br J Haematol.* 2005;128(4):503-509. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05331.x.
 101. Aïssi-Rothe L. RECONSTITUTION IMMUNITAIRE ET IMMUNOTHERAPIE ADOPTIVE ANTI-VIRALES APRES ALLOGREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOIETIQUES . July 2010:1-284.
 102. Zhang L, Zhao Y. The regulation of Foxp3 expression in regulatory CD4(+)CD25(+)T cells: multiple pathways on the road. *J Cell Physiol.* 2007;211(3):590-597. doi:10.1002/jcp.21001.
 103. Adair PR, Kim YC, Zhang A-H, Yoon J, Scott DW. Human Tregs Made Antigen Specific by Gene Modification: The Power to Treat Autoimmunity and Antidrug Antibodies with Precision. *Front Immunol.* 2017;8:1117. doi:10.3389/fimmu.2017.01117.
 104. Beres AJ, Drobyski WR. The role of regulatory T cells in the biology of graft versus host disease. *Front Immunol.* 2013;4:163. doi:10.3389/fimmu.2013.00163.
 105. Hull CM, Peakman M, Tree TIM. Regulatory T cell dysfunction in type 1 diabetes: what's broken and how can we fix it? *Diabetologia.* 2017;60(10):1839-1850. doi:10.1007/s00125-017-4377-1.
 106. Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nat Rev Immunol.* 2006;6(10):715-727. doi:10.1038/nri1936.
 107. Sullenger BA, Gilboa E. Emerging clinical applications of RNA. *Nature.* 2002;418(6894):252-258. doi:10.1038/418252a.
 108. Sabado RL, Balan S, Bhardwaj N. Dendritic cell-based immunotherapy. *Cell Res.* 2017;27(1):74-95. doi:10.1038/cr.2016.157.
 109. Stenger EO, Turnquist HR, Mapara MY, Thomson AW. Dendritic cells and regulation of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia activity. *Blood.* 2012;119(22):5088-5103. doi:10.1182/blood-2011-11-364091.
 110. Cai S, Hou J, Fujino M, et al. iPSC-Derived Regulatory Dendritic Cells Inhibit Allograft Rejection by Generating Alloantigen-Specific Regulatory T Cells. *Stem Cell Reports.* 2017;8(5):1174-1189. doi:10.1016/j.stemcr.2017.03.020.

111. C BJ. HeLa (for Henrietta Lacks). *Science*. 1974;184(4143):1268-1268. doi:10.1126/science.184.4143.1268.
112. Duval K, Grover H, Han L-H, et al. Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*. 2017;32(4):266-277. doi:10.1152/physiol.00036.2016.
113. Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*. 1977;197(4302):461-463.
114. Yoon No D, Lee K-H, Lee J, Lee S-H. 3D liver models on a microplatform: well-defined culture, engineering of liver tissue and liver-on-a-chip. *Lab Chip*. 2015;15(19):3822-3837. doi:10.1039/c5lc00611b.
115. Edmondson R, Broglie JJ, Adcock AF, Yang L. Three-dimensional cell culture systems and their applications in drug discovery and cell-based biosensors. *Assay Drug Dev Technol*. 2014;12(4):207-218. doi:10.1089/adt.2014.573.
116. Weigelt B, Bissell MJ. Unraveling the microenvironmental influences on the normal mammary gland and breast cancer. *Semin Cancer Biol*. 2008;18(5):311-321. doi:10.1016/j.semcancer.2008.03.013.
117. Clevers H. Modeling Development and Disease with Organoids. *Cell*. 2016;165(7):1586-1597. doi:10.1016/j.cell.2016.05.082.
118. Sato T, Clevers H. Growing self-organizing mini-guts from a single intestinal stem cell: mechanism and applications. *Science*. 2013;340(6137):1190-1194. doi:10.1126/science.1234852.
119. Zhang Z, Michniak-Kohn BB. Tissue engineered human skin equivalents. *Pharmaceutics*. 2012;4(1):26-41. doi:10.3390/pharmaceutics4010026.
120. Brittberg M, Recker D, Ilgenfritz J, Saris DBF, SUMMIT Extension Study Group. Matrix-Applied Characterized Autologous Cultured Chondrocytes Versus Microfracture: Five-Year Follow-up of a Prospective Randomized Trial. *Am J Sports Med*. 2018;46(6):1343-1351. doi:10.1177/0363546518756976.
121. Gilpin A, Yang Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9831534-13. doi:10.1155/2017/9831534.
122. Foty R. A simple hanging drop cell culture protocol for generation of 3D spheroids. *J Vis Exp*. 2011;(51):e2720-e2720. doi:10.3791/2720.
123. Yamada KM, Cukierman E. Modeling tissue morphogenesis and cancer in 3D. *Cell*. 2007;130(4):601-610. doi:10.1016/j.cell.2007.08.006.
124. Cunha B, Aguiar T, Carvalho SB, et al. Bioprocess integration for human mesenchymal stem cells: From up to downstream processing scale-up to cell proteome characterization. *J Biotechnol*. 2017;248:87-98. doi:10.1016/j.jbiotec.2017.01.014.
125. Ramamoorth M, Narvekar A. Non viral vectors in gene therapy- an overview. *J Clin Diagn Res*. 2015;9(1):GE01-GE06. doi:10.7860/JCDR/2015/10443.5394.
126. Jackson DA, Symons RH, Berg P. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of Simian Virus 40: circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1972;69(10):2904-2909.

127. Csobonyeiova M, Polak S, Zamborsky R, Danisovic L. iPS cell technologies and their prospect for bone regeneration and disease modeling: A mini review. *J Adv Res.* 2017;8(4):321-327. doi:10.1016/j.jare.2017.02.004.
128. Schambach A, Zychlinski D, Ehrnstroem B, Baum C. Biosafety features of lentiviral vectors. *Human Gene Therapy.* 2013;24(2):132-142. doi:10.1089/hum.2012.229.
129. Bouard D, Alazard-Dany D, Cosset F-L. Viral vectors: from virology to transgene expression. *Br J Pharmacol.* 2009;157(2):153-165. doi:10.1038/bjp.2008.349.
130. Carvalho M, Sepodes B, Martins AP. Regulatory and Scientific Advancements in Gene Therapy: State-of-the-Art of Clinical Applications and of the Supporting European Regulatory Framework. *Front Med (Lausanne).* 2017;4:182. doi:10.3389/fmed.2017.00182.
131. George LA, Sullivan SK, Giermasz A, et al. Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant. *N Engl J Med.* 2017;377(23):2215-2227. doi:10.1056/NEJMoa1708538.
132. Rangarajan S, Walsh L, Lester W, et al. AAV5-Factor VIII Gene Transfer in Severe Hemophilia A. *N Engl J Med.* 2017;377(26):2519-2530. doi:10.1056/NEJMoa1708483.
133. Soubrier F, Cameron B, Manse B, et al. pCOR: a new design of plasmid vectors for nonviral gene therapy. *Gene Ther.* 1999;6(8):1482-1488. doi:10.1038/sj.gt.3300968.
134. Aronovich EL, Mclvor RS, Hackett PB. The Sleeping Beauty transposon system: a non-viral vector for gene therapy. *Hum Mol Genet.* 2011;20(R1):R14-R20. doi:10.1093/hmg/ddr140.
135. Holstein M, Mesa-Nuñez C, Miskey C, et al. Efficient Non-viral Gene Delivery into Human Hematopoietic Stem Cells by Minicircle Sleeping Beauty Transposon Vectors. *Mol Ther.* 2018;26(4):1137-1153. doi:10.1016/j.ymthe.2018.01.012.
136. Kobelt D, Schleef M, Schmeer M, Aumann J, Schlag PM, Walther W. Performance of high quality minicircle DNA for in vitro and in vivo gene transfer. *Mol Biotechnol.* 2013;53(1):80-89. doi:10.1007/s12033-012-9535-6.
137. Hardee CL, Arévalo-Soliz LM, Hornstein BD, Zechiedrich L. Advances in Non-Viral DNA Vectors for Gene Therapy. *Genes (Basel).* 2017;8(2):65. doi:10.3390/genes8020065.
138. Kreiss P, Bettan M, Crouzet J, Scherman D. Erythropoietin secretion and physiological effect in mouse after intramuscular plasmid DNA electrotransfer. *J Gene Med.* 1999;1(4):245-250. doi:10.1002/(SICI)1521-2254(199907/08)1:4<245::AID-JGM49>3.0.CO;2-G.
139. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995;92(16):7297-7301.
140. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, et al. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2009;458(7239):766-770. doi:10.1038/nature07863.
141. D'Aloia MM, Zizzari IG, Sacchetti B, Pierelli L, Alimandi M. CAR-T cells: the long and winding road to solid tumors. *Cell Death Dis.* 2018;9(3):282. doi:10.1038/s41419-018-0278-6.
142. Ginn SL, Amaya AK, Alexander IE, Edelstein M, Abedi MR. Gene therapy clinical trials worldwide to 2017: An update. *J Gene Med.* 2018;20(5):e3015. doi:10.1002/jgm.3015.
143. Hartmann J, Schüßler-Lenz M, Bondanza A, Buchholz CJ. Clinical development of CAR T cells-challenges and opportunities in translating innovative treatment concepts. *EMBO Mol*

- Med.* 2017;9(9):1183-1197. doi:10.15252/emmm.201607485.
144. Kershaw MH, Westwood JA, Parker LL, et al. A phase I study on adoptive immunotherapy using gene-modified T cells for ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(20 Pt 1): 6106-6115. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-1183.
 145. Lamers CHJ, Sleijfer S, Vulto AG, et al. Treatment of metastatic renal cell carcinoma with autologous T-lymphocytes genetically retargeted against carbonic anhydrase IX: first clinical experience. *J Clin Oncol.* 2006;24(13):e20-e22. doi:10.1200/JCO.2006.05.9964.
 146. Park JR, Digiusto DL, Slovak M, et al. Adoptive transfer of chimeric antigen receptor re-directed cytolytic T lymphocyte clones in patients with neuroblastoma. *Mol Ther.* 2007;15(4): 825-833. doi:10.1038/sj.mt.6300104.
 147. Till BG, Jensen MC, Wang J, et al. CD20-specific adoptive immunotherapy for lymphoma using a chimeric antigen receptor with both CD28 and 4-1BB domains: pilot clinical trial results. *Blood.* 2012;119(17):3940-3950. doi:10.1182/blood-2011-10-387969.
 148. Brentjens RJ, Latouche J-B, Santos E, et al. Eradication of systemic B-cell tumors by genetically targeted human T lymphocytes co-stimulated by CD80 and interleukin-15. *Nat Med.* 2003;9(3):279-286. doi:10.1038/nm827.
 149. Grupp SA, Kalos M, Barrett D, et al. Chimeric antigen receptor-modified T cells for acute lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2013;368(16):1509-1518. doi:10.1056/NEJMoa1215134.
 150. Maude SL, Frey N, Shaw PA, et al. Chimeric antigen receptor T cells for sustained remissions in leukemia. *N Engl J Med.* 2014;371(16):1507-1517. doi:10.1056/NEJMoa1407222.
 151. Locke FL, Neelapu SS, Bartlett NL, et al. Phase 1 Results of ZUMA-1: A Multicenter Study of KTE-C19 Anti-CD19 CAR T Cell Therapy in Refractory Aggressive Lymphoma. *Mol Ther.* 2017;25(1):285-295. doi:10.1016/j.ymthe.2016.10.020.
 152. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018;378(5):439-448. doi:10.1056/NEJMoa1709866.
 153. Park JH, Rivière I, Gonen M, et al. Long-Term Follow-up of CD19 CAR Therapy in Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 2018;378(5):449-459. doi:10.1056/NEJMoa1709919.
 154. Neelapu SS, Tummala S, Kebriaei P, et al. Chimeric antigen receptor T-cell therapy - assessment and management of toxicities. *Nat Rev Clin Oncol.* 2017;128:LBA-6. doi:10.1038/nrclinonc.2017.148.
 155. Sidaway P. Haematological cancer: Anti-BCMA CAR T cells show promise in MM. *Nat Rev Clin Oncol.* 2016;13(9):530-530. doi:10.1038/nrclinonc.2016.125.
 156. Grada Z, Hegde M, Byrd T, et al. TanCAR: A Novel Bispecific Chimeric Antigen Receptor for Cancer Immunotherapy. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2013;2:e105. doi:10.1038/mtna.2013.32.
 157. Yoon J, Schmidt A, Zhang A-H, Königs C, Kim YC, Scott DW. FVIII-specific human chimeric antigen receptor T-regulatory cells suppress T- and B-cell responses to FVIII. *Blood.* 2017;129(2):238-245. doi:10.1182/blood-2016-07-727834.
 158. Dion S, Demattéi M-V, Renault S. [Zinc finger proteins: tools for site-specific correction or modification of the genome]. *Med Sci (Paris).* 2007;23(10):834-839. doi:10.1051/medsci/20072310834.

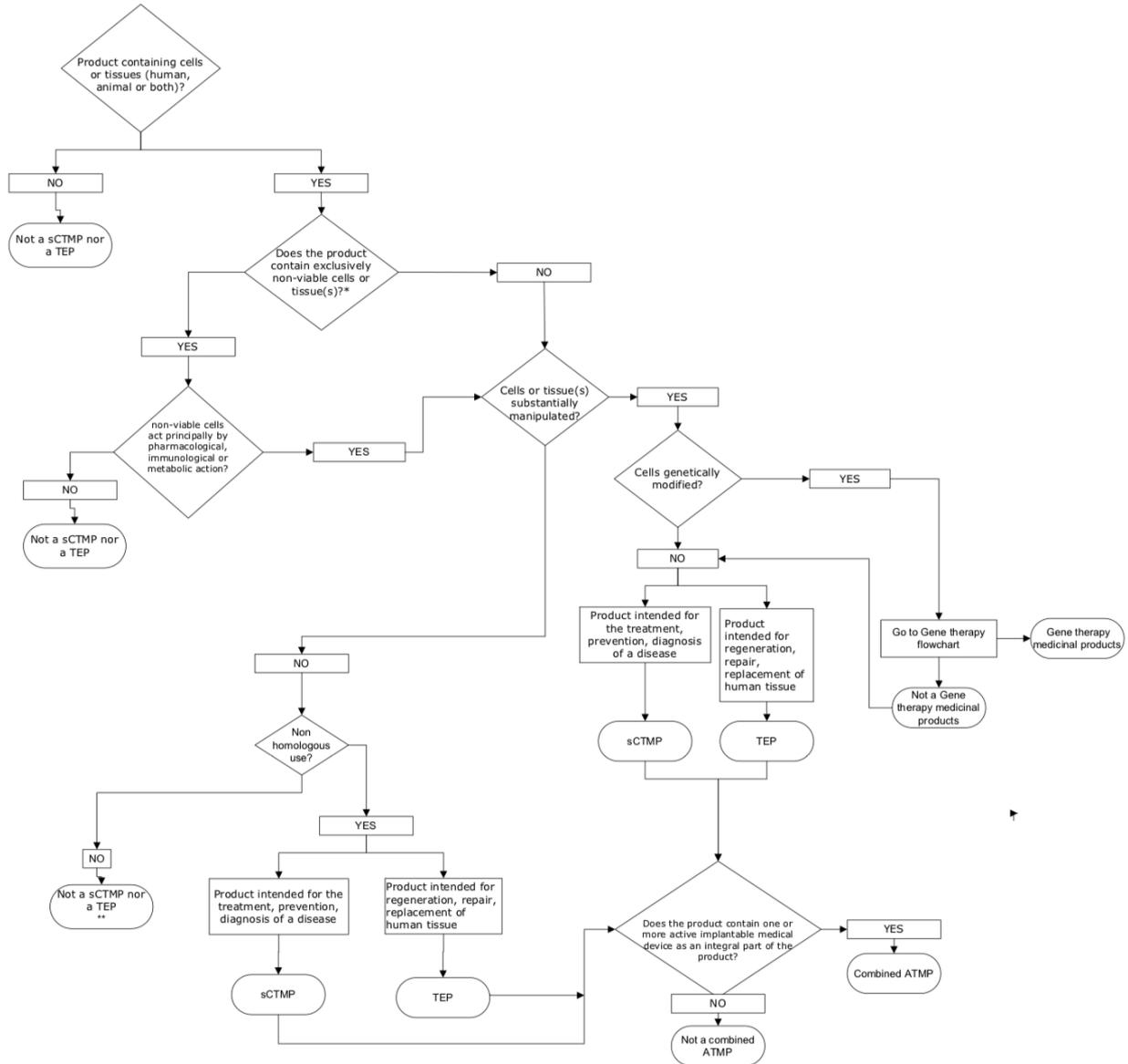
159. Dupret B, Angrand P-O. [Targeted genome modifications using TALEN]. *Med Sci (Paris)*. 2014;30(2):186-193. doi:10.1051/medsci/20143002017.
160. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*. 2012;337(6096):816-821. doi:10.1126/science.1225829.
161. Ledford H. CRISPR, the disruptor. *Nature*. June 4, 2015:20-24.
162. Charpentier E, Doudna JA. Biotechnology: Rewriting a genome. *Nature*. March 7, 2013:50-51.
163. Gilgenkrantz H. La révolution des CRISPR est en marche. *Med Sci (Paris)*. 2014;30(12):1066-1069. doi:10.1051/medsci/20143012004.
164. Joung JK, Sander JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2013;14(1):49-55. doi:10.1038/nrm3486.
165. Tebas P, Stein D, Tang WW, et al. Gene editing of CCR5 in autologous CD4 T cells of persons infected with HIV. *N Engl J Med*. 2014;370(10):901-910. doi:10.1056/NEJMoa1300662.
166. Sharma A, Easow Mathew M, Sriganesh V, Neely JA, Kalipatnapu S. Gene therapy for haemophilia. Sharma A, ed. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;3(11):CD010822. doi:10.1002/14651858.CD010822.pub2.
167. Glaser A, McColl B, Vadolas J. The therapeutic potential of genome editing for β -thalassaemia. *F1000Res*. 2015;4:1431. doi:10.12688/f1000research.7087.1.
168. Rutherford C, Barry J, Campbell JD, Turner M. The Importance of Understanding & Designing Cellular Therapy Supply Chains. *Cell Gene Ther Insights*. 2017;3(10):873-889. doi:10.18609/cgti.2017.087.
169. Teasdale A, Elder D, Harvey J, Spanhaak S. Impurities in New Drug Substances and New Drug Products. In: *ICH Quality Guidelines*. Vol 17. ICH Q3A/B: Key Guidelines in the General Impurity Management Process. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2017:167-198. doi:10.1002/9781118971147.ch6.
170. Food and Drug Administration, HHS. International Conference on Harmonisation; guidance on Q8(R1) Pharmaceutical Development; addition of annex; availability. Notice. *Fed Regist*. 2009;74(109):27325-27326.
171. Elder D, Teasdale A. ICH Q9 Quality Risk Management. In: *ICH Quality Guidelines*. Vol 28. 2nd ed. An Implementation Guide. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2017:579-610. doi:10.1002/9781118971147.ch21.
172. Bravery CA, Robinson S, Burger SR. Making the grade: untangling the myths of raw materials used for the manufacture of cell- and gene-based medicinal products. *Cell Gene Ther Insights*. April 2018:1-20. doi:10.18609/cg.
173. Fink DW. FDA regulation of stem cell-based products. *Science*. 2009;324(5935):1662-1663. doi:10.1126/science.1173712.
174. Pritchett T, Little L. "Hard Cell" Potency Testing for Cellular Therapy Products.; 2018:10:36-48.
175. Pimpaneau V, Gianelli F, Trouvin J-H, Poiseau AD. The challenges of potency assay development for cell-based medicinal products in Europe. *Regulatory Rapporteur*. 2015;12:1-6.

176. Emami-Shahri N, Foster J, Kashani R, et al. Clinically compliant spatial and temporal imaging of chimeric antigen receptor T-cells. *Nature Communications*. 2018;9(1):1081. doi: 10.1038/s41467-018-03524-1.
177. Whiteside TL. Immune monitoring of clinical trials with biotherapies. *Adv Clin Chem*. 2008;45:75-97.
178. Chinnadurai R, Rajan D, Qayed M, et al. Potency Analysis of Mesenchymal Stromal Cells Using a Combinatorial Assay Matrix Approach. *CellReports*. 2018;22(9):2504-2517. doi: 10.1016/j.celrep.2018.02.013.
179. Salk JJ, Schmitt MW, Loeb LA. Enhancing the accuracy of next-generation sequencing for detecting rare and subclonal mutations. *Nature Publishing Group*. 2018;19(5):269-285. doi: 10.1038/nrg.2017.117.
180. Pauli C, Hopkins BD, Prandi D, et al. Personalized In Vitro and In Vivo Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer Discov*. 2017;7(5):462-477. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-1154.
181. Liu T-L, Upadhyayula S, Milkie DE, et al. Observing the cell in its native state: Imaging sub-cellular dynamics in multicellular organisms. *Science*. 2018;360(6386). doi:10.1126/science.aag1392.
182. Dijkstra-Tiekstra MJ, Setroikromo AC, de Wildt-Eggen J. Freezing “stem cells” in a bag and tube under various freezing conditions? *Vox Sanguinis*. 2011;102(3):273-273. doi:10.1111/j.1423-0410.2011.01569.x.
183. Thibaudeau C, Flandrois G, Piteux E, et al. [Optimization of a haematopoietic stem cell freezing process using a qualification protocol applicable to a programmable freezer]. *Transfus Clin Biol*. 2011;18(5-6):542-552. doi:10.1016/j.tracli.2011.02.027.
184. Aird W, Labopin M, Gorin NC, Antin JH. Long-term cryopreservation of human stem cells. *Bone Marrow Transplant*. 1992;9(6):487-490.
185. Grein TA, Freimark D, Weber C, Hudel K, Wallrapp C, Czermak P. Alternatives to dimethylsulfoxide for serum-free cryopreservation of human mesenchymal stem cells. *Int J Artif Organs*. 2010;33(6):370-380.
186. Gómez-Barrena E, Rosset P, Gebhard F, et al. Feasibility and safety of treating non-unions in tibia, femur and humerus with autologous, expanded, bone marrow-derived mesenchymal stromal cells associated with biphasic calcium phosphate biomaterials in a multicentric, non-comparative trial. *Biomaterials*. March 2018. doi:10.1016/j.biomaterials.2018.03.033.
187. Pandolfi D. Data Integrity: Understanding and Becoming Compliant with GMP and FDA Requirements. Krueger B, ed. *Particle Measuring Systems*. April 2018:1-7.
188. Mijovic A, Pamphilon D. Storage of hemopoietic stem cells. *Asian Journal of Transfusion Science*. 2007;1(2):71. doi:10.4103/0973-6247.33848.
189. STROH C, CASSENS U, SAMRAJ AK, SIBROWSKI W, SCHULZE-OSTHOFF K, LOS M. The role of caspases in cryoinjury: caspase inhibition strongly improves the recovery of cryopreserved hematopoietic and other cells. *The FASEB Journal*. 2002;16(12):1651-1653. doi:10.1096/fj.02-0034fje.
190. Heng BC, Clement MV, Cao T. Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK Enhances the Freeze-Thaw Survival Rate of Human Embryonic Stem Cells. *Bioscience Reports*. 2007;27(4-5):257-264. doi:10.1007/s10540-007-9051-2.

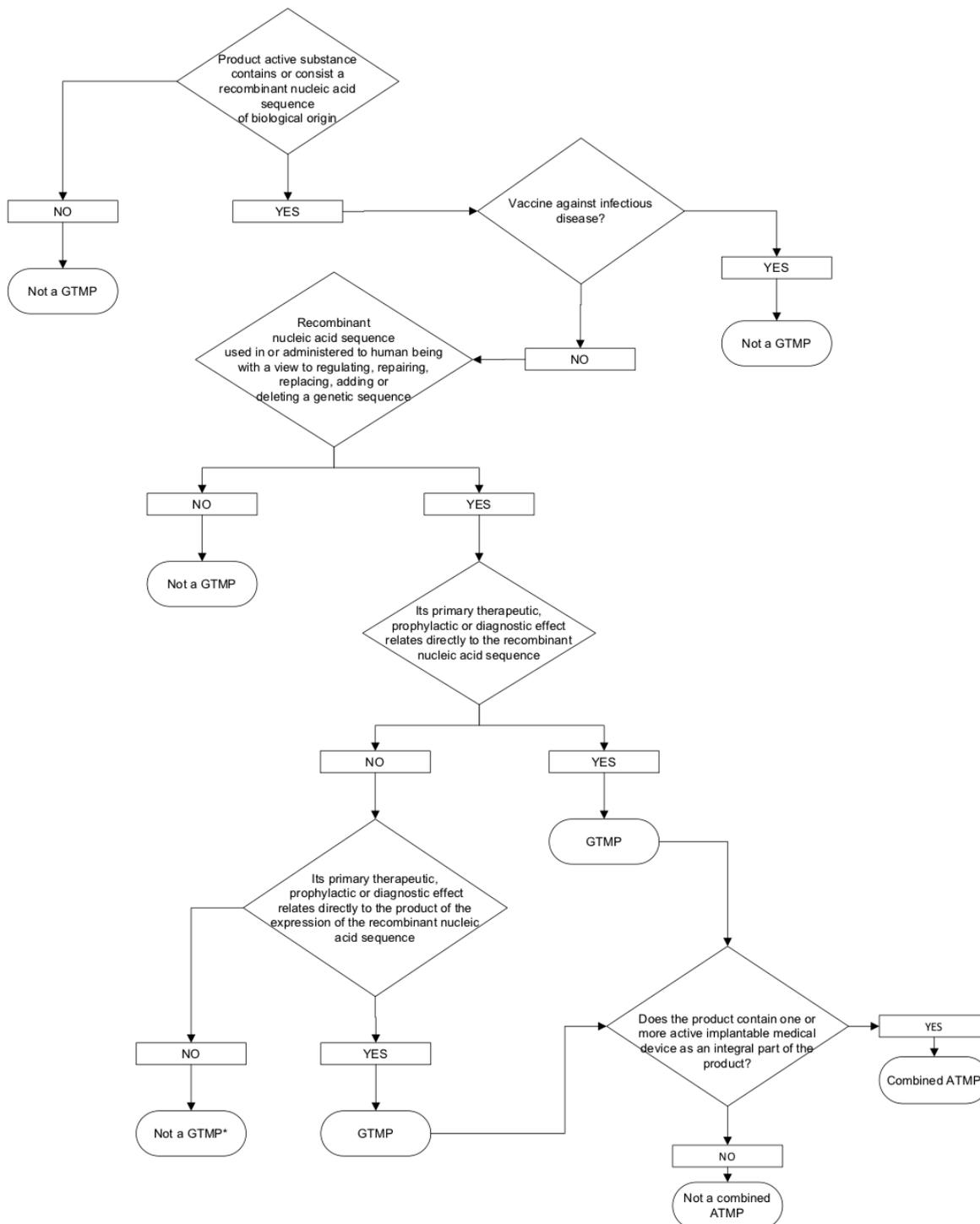
191. Braun N. *Manuel Du HCB Pour L'utilisation Confinée D'organismes Génétiquement Modifiés*. 2014:1-212.
192. European Medicines Agency. *Guideline on Safety and Efficacy Follow Up RMP for ATMP*. 2018:1-18.
193. Kroschinsky F, Stölzel F, Bonin von S, et al. New drugs, new toxicities: severe side effects of modern targeted and immunotherapy of cancer and their management. *Critical Care*. 2017;21(1):188. doi:10.1186/s13054-017-1678-1.
194. Driscoll D, Farnia S, Kefalas P, Maziarz RT. Concise Review: The High Cost of High Tech Medicine: Planning Ahead for Market Access. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(8):1723-1729. doi:10.1002/sctm.16-0487.
195. Abou-El-Enein M, Elsanhoury A, Reinke P. Overcoming Challenges Facing Advanced Therapies in the EU Market. *Cell Stem Cell*. 2016;19(3):293-297. doi:10.1016/j.stem.2016.08.012.
196. Rémuzat C, Toumi M, Jørgensen J, Kefalas P. Market access pathways for cell therapies in France. *Journal of Market Access & Health Policy*. 2015;3(1):29094–18. doi:10.3402/jmahp.v3.29094.
197. Jørgensen J, Kefalas P. Reimbursement of licensed cell and gene therapies across the major European healthcare markets. *Journal of Market Access & Health Policy*. 2015;3(1):29321. doi:10.3402/jmahp.v3.29321.

Annexe 1 : Schéma décisionnel de la classification des MTI par l'EMA

A - Produit contenant des cellules ou tissus



B - Produit dont la substance active contient ou est composée d'une séquence recombinante d'acide nucléiques d'origine biologique.



Explanatory notes: *) The product can contain genetically modified cells for which specific requirements should be followed (see 'Guideline on human cell-based medicinal products' (EMA/CHMP/410869/2006).

Annexe 2 : Tableau récapitulatif des MTI commercialisés en Europe et aux Etats-Unis.

A. En Europe :

Dénomination	Compagnie	Thérapie	Indication	Date d'acceptation	Etat en 2018	Prix (estimation)	Pays
ChondroCelect®	Tigenix	Thérapie cellulaire autologue à base de chondrocytes	Défauts cartilagineux	nov. 09	Retiré en juil. 2016	\$US 24 000	EU, US
Glybera®	UniQure	Thérapie génique in vivo à base d'AAV	Déficience en lipoprotéine lipase	nov. 12	Arrêté en oct. 2017	\$US1 400 000	EU
Maci®	Genzyme	Ingénierie tissulaire à base de chondrocytes et matrice	Défauts cartilagineux du genou	juil. 13	Suspendu en sept. 2014	\$US 22 000	EU
Provenge® (Sipuleucel-T)	Dendreon Corp.	Thérapie cellulaire autologue à base de cellules mononuclées	Cancer prostatique métastatique	oct. 13	Retiré en mai 2015	\$US 93 000	EU, US
Holoclair®	Chiesi Framaceutici	Thérapie cellulaire autologue à base de cellules souches limbiques sur une membrane de fibrine	Déficience de cellules souches limbique des yeux	mars 15	Approuvé EMA	Inconnu	EU
Imlygic® (talimogene laherparepvec)	Amgen	Thérapie génique <i>in vivo</i>	Mélanome	oct. 15	Approuvé EMA	\$US 65 000	EU, US
Strimvelis®	GlaxoSmith Kline	Thérapie génique autologue <i>ex vivo</i> à base de CSH	SCID-ADA	juin 16	Approuvé EMA	\$US 665 000	EU
Zalmoxis®	MolMed	Thérapie cellulaire allogénique à base de cellules T modifiées génétiquement	GvHD	sept. 16	Approuvé EMA	\$US 193 000	EU
Spherox®	CO.DON AG	Ingénierie tissulaire à base de sphéroïde de chondrocytes inclus dans une matrice	Défauts cartilagineux du genou	mai 17	Approuvé EMA	\$US 12 000	EU
Alofisel® (Darvadstrocel)	Tigenix	Thérapie cellulaire autologue à base d'ADSC	Fistules anales dans la maladie de Crohn	mars 18	Approuvé EMA	Inconnu	EU

B. Aux Etats-Unis :

Dénomination	Compagnie	Thérapie	Indication	Date d'acceptation	Etat en 2018	Prix (estimation*)
Apligraf®	Organogenesis Incorporated	Ingénierie tissulaire allogénique à base de kératinocytes et de fibroblastes sur une membrane de collagène	Ulcère du pied diabétique et veineux des membres inférieurs.	2000	Approuvé FDA	\$US 2 500
Orcel®	Forticell	Ingénierie tissulaire allogénique à base de kératinocytes et de fibroblastes sur une membrane de collagène	Epidermolysis Bullosa	2005	Approuvé FDA	\$US 28
Carticel®	Genzyme	Ingénierie cellulaire autologue à base de chondrocytes	Défauts cartilagineux	2007	Approuvé FDA	\$US 35 000
Prochymal® (Remestemcel-L)	Osiris Therapeutics, Inc	Thérapie cellulaire allogénique à base de CSM	GvHD	2008	Approuvé Canada USA	\$US 200 000
Osteocel Plus®	NuVasive	Ingénierie tissulaire à base de CSM	Substitut osseux	2010	Approuvé FDA	\$US 600
Laviv® (Azficel-T)	Fibrocell Technologies	Thérapie cellulaire autologue à base de fibroblastes	Esthétique (rides nasolabiales)	2011	Approuvé FDA	\$US 4 500
Ginuit®	Organogenesis Incorporated	Ingénierie tissulaire allogénique à base de fibroblastes et kératinocytes sur une membrane de collagène bovine	Régénération de la gencive	2012	Approuvé FDA	Inconnu
Permaderm®	Regenicin Inc.	Ingénierie tissulaire autologue à base de kératinocytes et de fibroblastes sur une membrane de collagène bovine	Plaie et brûlure	2012	Approuvé FDA	Inconnu
Dermagraft / TC®	Advanced Tissue Science	Ingénierie tissulaire allogénique à base de fibroblastes sur une membrane biodégradable synthétique	Plaie et brûlure	2013	Approuvé FDA	\$US 1 700
Epicel®	Genzyme	Ingénierie tissulaire autologue à base d'épiderme	Plaie et brûlure	2014	Approuvé FDA	\$US 10 000
Kymriah® (tisagenlecleucel)	Novartis Pharmaceuticals Corporation	Thérapie génique autologue ex vivo à base de cellules T	Leucémies et lymphomes B	2017	Approuvé FDA	\$US 475 000
Luxturna® (voretigene neparvovec-rzyl)	Spark Therapeutics, Inc	Thérapie génique in vivo à base d'AAV	Dégénérescence héréditaire de la rétine	2017	Approuvé FDA	\$US 850 000
Yescarta® (Axicabtagene ciloleucel)	Kite Pharma, Incorporated	Thérapie génique autologue ex vivo à base de cellules T	Leucémies et lymphomes B	2017	Approuvé FDA	\$US 373 000

* Ordre d'idée prix / cm2 pour les substituts

Annexe 3 : Tableau récapitulatif des MTI en clinique et à venir en 2018 ².

Compagnie	Dénomination	Thérapie	Indication	Etape du développement	Date d'évaluation
Kiadis	ATIR101	Allodepleted T-Cell Immunotherapy	AML or ALL	Conditional EU approval	2H 2018; launch 2019
bluebird bio	Lentiglobin	Gene therapy	Transfusion dependent beta-thalassemia	MAA filing	End-year 2018
Kite (Gilead co)	Yescarta	CD19-directed CAR T cell therapy	Refractory Large B-Cell Lymphoma	Pending MAA	1H 2018
Enzyvant Tx	RVT-802	Tissue-based therapy	Complete DiGeorge Syndrome	BLA submission	2018
Juno	JCAR017	CAR-T cell therapy	NHL	BLA submission	2H 2018
bluebird bio	Lentiglobin	Gene therapy	Transfusion dependent beta-thalassemia	Ph III – Northstar-2 HGB-207	Mid-year 2018
bluebird bio	Lentiglobin	Gene therapy	Transfusion dependent beta-thalassemia & beta-0/beta-0 genotypes	Ph III – Northstar-3 (HGB-212)	End-year 2018
bluebird bio	Lenti-D	Gene therapy	Cerebral Adrenoleukodystrophy	Ph III – Starbeam 102	End-year 2018
GenSight Biologics	GS010	AAV-vector Gene Therapy	Leber Hereditary Optic Neuropathy	Ph III (REVERSE & RESCUE)	Topline results of REVERSE in Q2 2018 (announced 04/03/18); RESCUE in Q3 2018
Histogenics	NeoCart	Tissue-engineering product	Cartilage repair	Ph III (topline data, potential BLA filing)	Q3 2018
Athersys	MultiStem	Cell therapy	Ischemic Stroke	Ph III (under SPA)	Initiating 1H 2018
Bone Therapeutics	PREOB	Cell therapy (autologous)	Osteonecrosis of the hip	Ph III	2H 2018
Brainstorm	NurOwn	Mesenchymal Stem Cell Therapy	ALS	Ph III	Interim safety data June 2018; top-line data 2019
Mesoblast	MSC-100-IV	Mesenchymal Stem Cell Therapy	Acute Graft Versus Host Disease	Ph III	Day 28 primary endpoint met 02/22/18; Day 100 survival rate Q2 2018
Mesoblast	MPC-150-IM	Mesenchymal Precursor Cell Therapy	Mod to Severe Chronic Heart Failure	Ph III	Complete enrollment 2H 2018
Abeona	EB-101	Gene therapy	Epidermolysis Bullosa	Ph III	Trial commences 2018
AveXis	AVXS-101	Gene Therapy	Spinal Muscular Atrophy Type 1	Pivotal	First 3 patients dosed, screening for remaining patients began 01/30/18

Compagnie	Dénomination	Thérapie	Indication	Etape du développement	Date d'évaluation
uniQure	AMT-061	AAV Gene Therapy	Hemophilia B	Pivotal	Treatment expected to initiate early Q3; topline data data expected by end of 2018
Athersys-Healios KK	MultiStem	Cell therapy	Ischemic Stroke (Japan)	Ph II/III	1H 2018, 2019
Lysogene	LYS-SAF302	Gene therapy	MPS IIIA	Ph II/III	Enrollment 2H 2018
Voyager Therapeutics	VY-AADC	Gene therapy	Parkinson's disease	Ph II/III	Q2 2018 dose the first patient in pivotal program
Bone Therapeutics	ALLOB	Cell therapy (allogeneic)	Spinal Fusion	Ph IIA	Completed enrollment 02/18; expects timing, efficacy, & safety data mid 2019
Bone Therapeutics	ALLOB	Cell therapy (allogeneic)	Delayed-Union Fractures	Ph IIB	2H 2018
Mesoblast	MPC-150-IM	Mesenchymal Precursor Cell Therapy	End-State Heart Failure in Patients with LVADs	Ph IIB	6-month primary endpoint Q1 2018; full data Q3 2018
ReNeuron	CTX product candidate	Cell therapy	Stroke disability	Ph IIB	Trial commences 1H 2018; data 2H 2018
ReNeuron	hRPC product candidate	Cell therapy	Retinitis pigmentosa	Ph IIB	Trial commences 1H 2018; data 1H 2020
Athersys	MultiStem	Cell therapy	Myocardial Infarction	Ph II	2H 2018
Pluristem Therapeutics	PLX-PAD	Cell therapy	Intermittent Claudication	Ph II	1H 2018
ReNeuron	hRPC product candidate	Cell therapy	Cone-rod dystrophy	Ph II	Trial commences 2H 2018; data 2H 2020
Audentes Therapeutics	AT132	Gene therapy	XLMTM	Ph I/II	Next update on interim data expected in Q2
Audentes Therapeutics	AT342	Gene therapy	Crigler-Najjar Syndrome	Ph I/II	Preliminary clinical data from VALENS in Q2 2018
DiscGenics	IDCT	Disc-derived allogeneic cell therapy	Degenerative Disc Disease	Ph I/II	Initial Safety 2H 2018
Fibrocell Science	FCX-007	Gene Therapy	Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa (RDEB)	Ph I/II	Dosing expected to begin in Q2
GenSight Biologics	GS030	Optogenetics and AAV-vector Gene Therapy	Retinitis Pigmentosa	Ph I/II	Initiation 2018
Sentien Biotechnologies	SBI-101	MSC Device	Acute Kidney Injury	Ph I/II	Q3 2018
Spark Therapeutics	SPK-8011	AAV-vector gene therapy	Hemophilia A	Ph I/II	2H 2018

Compagnie	Dénomination	Thérapie	Indication	Etape du développement	Date d'évaluation
ViaCyte	PEC-Direct	Cell Replacement Therapy	Type 1 Diabetes	Ph I/II	Q3 2018 – preliminary safety and efficacy data
Sangamo	SB-525	Gene Therapy	Hemophilia A	Ph I/II	2018
Sangamo	SB-913	Genome Editing	MPS II	Ph I/II	2018
Sangamo	SB-318	Genome Editing	MPS I	Ph I/II	2018
Sangamo	SB-FIX	Genome Editing	Hemophilia B	Ph I/II	UK clinical sites to be set up 2018; currently screening patients in US
Adaptimmune	MAGE-A10	TCR T-cell therapy	Triple tumor (Urothelial, Melanoma, Head & Neck)	Ph I/II	Currently dosing patients
Adaptimmune	MAGE-A10	TCR T-cell therapy	NSCLC	Ph I/II	Currently dosing patients
Adaptimmune	MAGE-A4	TCR T-cell therapy	Urothelial, Melanoma, Head & Neck, Ovarian, NSCLC, Esophageal, Gastric cancers	Ph I/II	Initial efficacy data from MAGE- A10 pilot studies anticipated 2H. Initial safety data from the MAGE-A4 “basket study” anticipated in 1H. MAGE-A4 efficacy data anticipated in H2.
Adaptimmune	AFP	TCR T-cell therapy	Hepatocellular cancer	Ph I/II	Initial AFP safety data anticipated in H2
Athersys	MultiStem	Cell therapy	ARDS	Ph I/IIa Exploratory	1H 2018
Company	Product	Therapeutic Modality	Indication	Clinical Stage	Expected Reporting Date
AveXis	AVXS-101	Gene Therapy	Spinal Muscular Atrophy Type 2	Ph I	Plans to submit the request for a pre-BLA meeting Q2; enrollment beginning in H1
bluebird bio	bb2121	Anti-BCMA CAR-T	Multiple myeloma	Ph I (CRB-401 study)	Plan to file for marketing authorization in 2019; Clinical data to be presented June 2018
bluebird bio	bb21217	Anti-BCMA CAR-T	Multiple myeloma	Ph I (CRB-402 study)	End-year 2018
bluebird bio	LentiGlobin	Gene therapy	Sickle cell disease	Ph I (HGB-206 study)	End-year 2018
Cynata Therapeutics	CYP-001	MSC Product	GvHD	Ph I	Began dosing cohort 2 on 01/24/18
FATE Therapeutics	NK100	Activated NK Cell Therapy	R/R AML	Ph I	2018

Compagnie	Dénomination	Thérapie	Indication	Etape du développement	Date d'évaluation
FATE Therapeutics	NK100	Activated NK Cell Therapy	Recurrent ovarian cancer	Ph I	Initial data presented March 29, 2018
FATE Therapeutics	NK100	Activated NK Cell Therapy	Advanced solid tumors in combination with monoclonal antibody therapy	Ph I	Began dosing 02/20/18
Pluristem	PLX-R18	Cell therapy	Incomplete engraftment of hematopoietic cell transplantation	Ph I	1H 2018
ReNeuron	Exosome product candidate	Cell therapy	Cancer (solid tumors)	Ph I	Trial commences 1H 2019; data 2020
Voyager Therapeutics	VY-AADC	Gene therapy	Parkinson's disease	Ph Ib	Data presented March 9; Phase 2-3 on track to dose first patient mid-2018
American Gene Technologies	AGT103-T	Autologous T Cell Therapy (Lentiviral-Based Modification)	HIV Infection	Pre-Ph I	Safety Data Q4 2018
BlueRock Therapeutics	Parkinson's program	iPSC cell therapy	Parkinson's disease	IND submission	2018
FATE Therapeutics	FT500	iPSC-derived NK Cell	Combination with Checkpoint Inhibitor Therapy for Advanced Solid Tumors	IND submission	Q1 2018
FATE Therapeutics	FT516	iPSC-derived Engineered hnCD16 NK Cell	Combination with Monoclonal Antibody Therapy for Advanced Solid Tumors	IND submission	Mid 2018
FATE Therapeutics	CAR-iNK	iPSC-derived CAR NK Cell	CAR-targeted Monotherapy (Target not Disclosed)	IND submission	Late 2018/early 2019
FATE Therapeutics	CAR-iT	iPSC-derived CAR T Cell	CAR-targeted, TCR-null Monotherapy (Target not Disclosed)	IND submission	Late 2018/early 2019
TiGenix	Cx601	Cell therapy	Crohn's disease	IND submission	1H 2018
TxCeIl	HLA-A2 CAR-Treg	Gene-modified cell therapy	Prevention of chronic rejection after solid organ transplantation	IND submission	Q4 2018
uniQure	AMT-130	AAV Gene Therapy	Huntington's disease	IND submission	2H 2018
TxCeIl	HLA-A2 CAR-Treg	Gene-modified cell therapy	Prevention of chronic rejection after solid organ transplantation	IND submission	Q4 2018
Lysogene	LYS-GM101	Gene therapy	GM1 gangliosidosis	Pre-IND	Enrollment 2019

L.FIEVET^{1,2}, M.GOMEZ², H. BROCHOT-DECHET², S. FLEURY-CAPPELLESSO^{1,2}

¹ - STROMALab, U1031, EFS-PM, Université Paul Sabatier, Toulouse III
² - Etablissement Français du Sang - Pyrénées-Méditerranée (EFS-PM), Service de Thérapie Cellulaire, Toulouse, France

CONTEXTE

La production d'un médicament de thérapie innovante (MTI) nécessite l'établissement d'un système de contrôle qualité (CQ) performant répondant aux principes des bonnes pratiques de fabrication (BPF). Chaque matière première et consommable (MPC) entrant dans la fabrication d'un MTI doit répondre à des spécifications et être soumis à un contrôle puis à une libération de lot par le responsable CQ conduisant ainsi à la certification du médicament par le pharmacien responsable.

OBJECTIFS

- ▶ Améliorer le circuit des MPC destinés à la production de MTI
- ▶ Elaborer un outil d'aide au contrôle qualité à réception des MPC
- ▶ Former le personnel à son utilisation.

MATERIEL ET METHODES

Suite à une analyse de risques sur les MPC, une base de données a été établie pour les différents types de MPC impliqués dans le processus de fabrication incluant les différents CQ associés selon les BPF et la Pharmacopée européenne.

L'outil informatique génère, à partir d'un code produit interne, le pré-remplissage d'une fiche de spécifications et acceptabilité (FSA) permettant de gérer les contrôles à effectuer sur le lot de MPC reçu.

Les FSA pré-remplies sont complétées par les techniciens en fonction des résultats obtenus lors des contrôles, puis validées par le responsable du CQ pour être ensuite classées. De façon parallèle, les MPC réceptionnés sont placés physiquement et informatiquement en statut quarantaine puis basculés en statut libéré après validation par le responsable CQ.



RÉSULTATS



FICHES DE SPÉCIFICATIONS ET ACCEPTABILITÉ

- ▶ **Revue documentaire** (présence du certificat d'analyse ou conformité du fabricant)
- ▶ **Échantillonnage** interne et externe (volume d'échantillonnage déterminé en fonction de la taille du lot réceptionné)
- ▶ **Contrôle Visuel** de l'échantillonnage interne (cohérence de l'étiquetage, inviolabilité du conditionnement, absence de défaut du produit)
- ▶ **Tests d'identification, de fonctionnalité, ou complémentaires** (ex. stérilité)

CAUSES DE NON CONFORMITÉ



CONCLUSION

Nous avons créé un outil simple d'utilisation d'aide au contrôle qualité à réception des MPC, limitant les erreurs de saisies par le pré-remplissage automatique des FSA, et permettant de détecter plus précocement les non-conformités.

Ce nouveau circuit a permis d'améliorer considérablement le contrôle à réception des MPC tel que défini dans les BPF.



Annexe 4 : Poster affiché aux congrès HOPIPHARM / SFTS 2017 - Etablissement d'un outil d'aide au contrôle des matières premières et consommables en vue de l'obtention de MTI selon les BPF.

State of the art on advanced therapy medicinal products development: stakes and perspectives

Abstract:

Since the emergence of Advanced Therapy Medicinal Products (ATMPs), improvement of hospital chain has become essential. Self-healing using our own cells or gene editing, such as are the promises of these therapies for disorders with unmet medical needs. The recent approval of CAR-T cells in immuno-oncology in the US market is a benchmark, while other ATMPs are removed from the market due to lack of patients, robustness of production, or rentability. In this perspective, important disparities between pre-clinical and translational studies are highlighted. Analyzes of clinical failures and recent successes provide clues to the challenges faced by different actors. This state of the art aims to provide satisfactory solutions to these problems in order to facilitate the development, regulatory approval and commercialization of these ATMPs.

Key words: Advanced Therapy Medicinal Products, Development, GMP production, Quality control, Pharmaceutical supply chain, Regulation

Etat de l'art sur le développement des médicaments de thérapie innovante : enjeux et perspectives

Résumé :

Face à l'émergence actuelle des Médicaments de Thérapies Innovantes (MTI), l'adaptation du circuit hospitalier est devenue indispensable. Se soigner en utilisant ses propres cellules ou en modifiant ses gènes, telles sont les promesses de ces thérapies, capables de lutter contre des pathologies aux besoins médicaux non satisfaits. L'arrivée des cellules CAR-T en immuno-oncologie sur le marché américain en est la preuve, tandis que d'autres MTI sont retirés du marché par manque d'effectif, de robustesse de production, ou de rentabilité. Dans cette optique, les importantes disparités entre études pré-cliniques et translationnelles humaines sont mises en évidence. Les analyses des échecs cliniques et des succès récents fournissent des indices quant aux défis qui incombent aux différents acteurs. Cet état de l'art a pour objectif d'apporter des éléments de réponse à ces problématiques afin de faciliter le développement, l'approbation réglementaire et la commercialisation de ces MTI.

Titre et résumé en Anglais : voir au recto de la dernière page de la thèse

Discipline administrative : DES Innovation Pharmaceutique et Recherche

Mots-clés : Médicaments de Thérapie Innovante, Développement, Production BPF, Contrôle qualité, Circuit pharmaceutique, Réglementation

Université Paul Sabatier – Toulouse III Faculté des Sciences Pharmaceutiques 35,
chemin des Maraîchers ; 31400 TOULOUSE Cedex 9

Auteur : Monsieur Loïc, Marc, André Fiévet

Directeur de thèse : Madame Hélène Brochot-Dechet

Lieu et Date de la Soutenance : Vendredi 29 juin 2018 à 15h, Amphithéâtre Claudius Regaud IUCT