



HAL
open science

Production de protéines recombinantes en système acellulaire : industrialisation et réglementation

Nawfel Miladi

► **To cite this version:**

Nawfel Miladi. Production de protéines recombinantes en système acellulaire : industrialisation et réglementation. Sciences pharmaceutiques. 2012. dumas-00681742

HAL Id: dumas-00681742

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-00681742v1>

Submitted on 22 Mar 2012

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

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

Université Joseph Fourier
Faculté de pharmacie de Grenoble

Année : 2012

N°

**Production de protéines recombinantes en
système acellulaire : Industrialisation et
réglementation**

**Thèse présentée pour l'obtention du titre de
docteur en pharmacie**
Diplôme d'état

Miladi Nawfel

04/09/1986

Thèse soutenue publiquement à la faculté de pharmacie de Grenoble

Le : 3 Février 2012

Devant le jury composé de :

Président du jury : Pr Jean-Luc Lenormand

Directeur de thèse : Pr Benoit Polack

Membres :

Pr Michel Sève

Pr Emmanuel Drouet

Liste actualisées des enseignants de l'UFR de pharmacie de Grenoble (Professeurs et maître de conférences) :

Maître de conférences :

ALDEBERT Delphine Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)

ALLENET Benoît Pharmacie Clinique (ThEMAS TIMC-IMAG / MCU-PH)

BATANDIER Cécile Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)

BRETON Jean Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)

BRIANCON-MARJOLLET Anne Physiologie Pharmacologie (HP2)

BUDAYOVA SPANO Monika Biophysique (I.B.S)

CAVAILLES Pierre Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)

CHOISNARD Luc Pharmacotechnie (D.P.M)

DELETRAZ-DELPORTE Martine Droit Pharmaceutique

DEMEILLIERS Christine Biochimie (L.B.F.A)

DURMORT-MEUNIER Claire Biotechnologies (I.B.S)

GEZE Annabelle Pharmacotechnie (D.P.M)

GERMI Raphaëlle Microbiologie (U.V.H.C.I / MCU-PH)

GILLY Catherine Chimie Thérapeutique (D.P.M)

GROSSET Catherine Chimie Analytique (D.P.M)

GUIEU Valérie Chimie Analytique (D.P.M)

HININGER-FAVIER Isabelle Biochimie (L.B.F.A)

JOYEUX-FAURE Marie Physiologie - Pharmacologie (HP2)

KHALEF Nawel Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)

KRIVOBOK Serge Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)

MOUHAMADOU Bello Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)

MORAND Jean-Marc Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA Christelle Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE Edwige Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES Basile Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR Marine Chimie Organique (D.P.M.)
PINEL Claudine Parasitologie - Mycologie Médicale (GIN / MCU-PH)
RACHIDI Walid Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL Anne Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET Corinne Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD Florence Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH Nicolas Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE Cécile Chimie Organique (D.P.M.)
VILLET Annick Chimie Analytique (VP Form Adjoint UJF, D.P.M.)

Professeurs à l'UFR de pharmacie

BAKRI Aziz Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL Ahcène Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER Wim Biophysique (U.V.H.C.I.)
CALOP Jean Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
CORNET Murielle Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL Vincent Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
DECOUT Jean-Luc Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET Christian Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET Emmanuel Microbiologie (U.V.H.C.I.) -

FAURE Patrice Biochimie (HP2/PU-PH)

GODIN-RIBUOT Diane Physiologie-Pharmacologie (HP2)

GRILLOT Renée Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)

LENORMAND Jean Luc Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)

MOSSUZ Pascale Hématologie (PU-PH) - *À partir du 1^{er} mai*

PEYRIN Eric Chimie Analytique (D.P.M.)

SEVE Michel Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)

RIBUOT Christophe Physiologie – Pharmacologie (HP2)

ROUSSEL Anne-Marie Biochimie Nutrition (L.B.F.A)

WOUESSIDJEWÉ Denis Pharmacotechnie (D.P.M.)

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

BUSSER Benoît Biochimie (IAB, AHU-Biochimie)

MONNERET Denis Biochimie (HP2, AHU-Biochimie)

ENSEIGNANTS ANGLAIS (n=3)

COLLE Pierre Emmanuel Maître de conférence

FITE Andrée Professeur Certifié

GOUBIER Laurence professeur Certifié

ATER

DEFENDI Frederica ATER Immunologie Médicale (GREPI-TIMC)

GRATIA Séverine ½ ATER Biochimie Biotechnologie (LBFA)

REGENT Myriam ½ ATER Biochimie Biotechnologie (IAB)

ROSSI Caroline ATER Anglais Master ISM (JR)

RUFFIN Emilie ATER Pharmacie Galénique (Therex/TIMC, La serve)

SAPIN Emilie ATER Physiologie Pharmacologie (HP2)

Moniteurs et doctorants contractuels

BOUCHET Audrey (01-10-2009 au 30-09-2012) Biotechnologie (GIN, ESRF)

DUCAROUGE Benjamin (01-10-2008 au 30-09-2011) Laboratoire HP2 (JR)

FAVIER Mathieu (01-10-2009 au 30-09-2012) Laboratoire HP2 (JR)

GRAS Emmanuelle (01-10-2010 au 30-09-2013) Laboratoire HP2 (JR)

HAUDECOEUR Romain (01-10-2008 au 30-09-2011) Chimie Thérapeutique
(DPM)

LESART Anne-Cécile (01-10-2009 au 30-09-2013) Informatique C2i

POULAIN Laureline (01-10-2009 au 30-09-2012) Laboratoire HP2 (JR)

Professeurs associés

BELLET : Béatrice Pharmacie Clinique

RIEU Isabelle Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)

TROUILLER Patrice Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)

Remerciements :

Je tiens à remercier M. Benoit Polack pour avoir accepté de prendre la responsabilité d'être mon directeur de thèse.

Je remercie M. Jean-Luc Lenormand pour l'aide qu'il m'a apporté tout au long de mes années de master.

Je remercie la société Synthelis pour m'avoir permis d'utiliser les données relatives au projet LipoBak, en Particulier M. Bruno Tillier.

Je remercie les membres du jury, M. Emmanuel Drouet et M. Michel Sève pour avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie mes parents et mes amis pour leur soutien tout au long de ma rédaction.

Avant-propos :

Le système acellulaire est une technique que j'ai découverte au cours de mes années de master. Cette technique m'a tout de suite intéressé du fait de son principe unique et novateur. En effet elle représentait l'idée que je me faisais des biotechnologies, à savoir l'utilisation du vivant afin de produire des thérapies innovantes. Mon stage de fin d'études chez Synthelis m'a permis d'approfondir ma connaissance théorique de ce système ainsi que son utilisation en pratique. Découvrir ces différents aspects m'a donné envie d'élargir ma vision sur cette technique, ce qui a motivé mon choix de réaliser ma thèse de pharmacien sur ce système.

Le système acellulaire est à mon sens une technique incroyablement complexe et qui nécessite encore beaucoup de recherche et de développement avant d'être une technique incontournable de production de protéines thérapeutiques. Mais je pense que d'ici quelques années elle deviendra une technique majeure de l'industrie pharmaceutique spécialisée dans les biotechnologies.

Sommaire

Liste des tableaux et figures :.....	8
Liste des abréviations :.....	9
Introduction :.....	11
1. Rappels historiques et bibliographiques :	12
1.1 Historique :.....	12
1.2 Système acellulaire :.....	15
1.2.1 Transcription :.....	17
1.2.2 Aminoacylation :	19
1.2.3 Traduction :.....	21
1.2.4 Repliement et modifications post-traductionnelles :.....	23
1.2.5 Système de régénération de l'énergie :	25
1.2.6 Applications émergentes du système acellulaire :.....	26
2. Aspects industriels :.....	29
2.1 Principe du système acellulaire.....	29
2.2 Systèmes acellulaires existants :	31
2.2.1 Extrait d'E .coli :.....	31
2.2.2 Germes de blé:	36
2.2.3 Extrait de réticulocyte de lapin :.....	40
2.2.4 Autres systèmes existants :.....	43
2.3 Applications industrielles :.....	45
2.4 Comparaison de l'efficacité et des coûts des systèmes acellulaires de production de protéines les plus utilisés :.....	48
3. Aspects Réglementaires :.....	51
3.1 Développement d'un médicament produit par système acellulaire :	51
3.2 Textes réglementaires spécifiques des produits biologiques ou issus des biotechnologies :.....	55
3.2.1 Aspects production :	55
3.2.2 Aspects développement de thérapies:.....	58
3.3 Exemple : projet LipoBak :	59
3.3.1 Principe du projet :.....	59
3.3.2 Textes réglementaires spécifiques à LipoBak :	61
3.2.3 Objectifs des études non-cliniques :	62
3.2.4 Réglementations et recommandations :.....	62

4. Discussion :	78
-----------------	----

Liste des tableaux et figures :

FIGURE 1: SCHEMA DE LA TECHNIQUE DE CONTINUOUS FLOW CELL FREE. LES FLECHES JAUNES INDIQUENT LE MOUVEMENT DES ELEMENTS DES SOLUTIONS TAMPONS, LES FLECHES ROUGES LE MOUVEMENT DES PROTEINES PRODUITES. D'APRES KATZEN ET AL 2005	14
FIGURE 2: SCHEMA DE LA TECHNIQUE DE CONTINUOUS EXCHANGE CELL FREE. LES FLECHES JAUNES INDIQUENT LE MOUVEMENT DES ELEMENTS DU TAMPON DE NUTRITION. D'APRES KATZEN ET AL 2005	14
FIGURE 3: ETAPES CLES DE LA TECHNIQUE DE PRODUCTION DE PROTEINES EN ACELLULAIRE	15
FIGURE 4: SYSTEMES LIANT OU COUPLANT LES MECANISMES DE TRANSCRIPTION ET DE TRADUCTION, D'APRES LE SITE INTERNET DE THERMO SCIENTIFIC™	16
FIGURE 5: MECANISME DE TRANSCRIPTION, D'APRES SITE INTERNET DE FRONTIERS IN GENETICS	17
FIGURE 6: MECANISME D'AMINOACYLATION, D'APRES DRUG NEWS PERSPECT 2006, 19(6): 347	19
FIGURE 7: MECANISME DE TRADUCTION DE L'ARNM EN PROTEINE, D'APRES LE SITE INTERNET DE FRONTIERS IN GENETICS	21
FIGURE 8: REGENERATION DE L'ATP EN UTILISANT LE PEP COMME SOURCE D'ENERGIE, D'APRES KIM HC ET AL (2008)	26
FIGURE 9: FORCES ET FAIBLESSES DU SYSTEME ACELLULAIRE	31
FIGURE 10: SYSTEME ACELLULAIRE COUPLE UTILISANT DES EXTRAITS CELLULAIRES D'E. COLI, D'APRES LE SITE INTERNET INVITROGEN	32
FIGURE 11: FORCES ET FAIBLESSES DU SYSTEME ACELLULAIRE BASE SUR L'EXTRAIT D'E. COLI	35
FIGURE 12: SYSTEME ACELLULAIRE BASE SUR L'EXTRAIT DE GERMES DE BLE, D'APRES LE SITE INTERNET INVITROGEN	36
FIGURE 13: FORCES ET FAIBLESSES DU SYSTEME ACELLULAIRE BASE SUR L'EXTRAIT DE GERMES DE BLE	39
FIGURE 14: SYSTEME ACELLULAIRE BASE SUR L'EXTRAIT DE RETICULOCYTES DE LAPIN, D'APRES LE SITE INTERNET INVITROGEN	40
FIGURE 15: FORCES ET FAIBLESSES DU SYSTEME ACELLULAIRE BASE SUR L'EXTRAIT DE RETICULOCYTES DE LAPIN	43
FIGURE 16: PRINCIPE DE PRODUCTION DE VACCINS PERSONNALISES CONTRE LE LYMPHOME A CELLULE B, D'APRES SWARTZ ET AL 2006	47
FIGURE 17: COURBE KAPLAN-MEIER DE SOURIS IMMUNISEES PAR INJECTION DE VACCIN ANTI-LYMPHOME A CELLULES B APRES CHALLENGE TUMORAL PAR INJECTION DE CELLULES 38C13, D'APRES KANTER ET AL 2006	48
FIGURE 18: COMPARAISON DES PERFORMANCES DE TROIS SYSTEMES ACELLULAIRE, D'APRES ENDO ET AL 2006	49

FIGURE 19: CHAINE DE VALEUR DU MEDICAMENT, FROM SACHA POUGET - IN « APPRENDRE A PROFITER DES OPPORTUNITES BOURSIERES DANS LE SECTEUR SANTE ».....	54
TABLE 1: COMPARAISON DES SYSTEMES ACELLULAIRES COMMERCIAUX EN BATCH BASE SUR LES EXTRAITS D'E. COLI ET DE GERMES DE BLE.	50
TABLE 2: COMPARAISON DES SYSTEMES ACELLULAIRES COMMERCIAUX EN CECF BASE SUR LES EXTRAITS D'E. COLI ET DE GERMES DE BLE.....	50

Liste Des Abréviations :

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ARN: Acide Ribonucléique

ARNm: ARN messenger

ARNt: ARN de transfert

CFCF: Continuous Flow Cell Free

CECF: Continuous Exchange Cell Free

C-Ter: extrémité carbonée d'une séquence protéique

N-Ter: Extrémité azotée d'une séquence protéique

RMN: Résonance Magnétique Nucléaire

IRES: Internal Ribosome Entry Site

Fab: Fragment d'anticorps contenant la chaîne légère et une partie de la chaîne
lourde

ScFv: fragment d'anticorps contenant les régions variables caractéristique de
l'immunoglobuline

ATP: Adénosine Triphosphate

PEP: Phospho-Enol-Pyruvate

pH: Potentiel Hydrogène

CP: Créatine Phosphate

PCR: Polymerase Chain reaction

R&D: Recherche et Développement

ERL: Extrait de Réticulocytes de Lapin

EGTA: Ethylene Glycol Tetraacetic Acid

GM-CSF: Facteur de croissance

cGMP: current Good Manufacturing Practice

FDA: Food and Drug Administration

EMA: European Medicines Agency

MHLW: Ministry of Health, Labour and Welfare

ICH: International Conference on Harmonization of Technical Requirements for
Registration of Pharmaceuticals for Human Use

CTD: Common Technical Document

GLP: Good Laboratory Practice

BPL: Bonnes pratiques de laboratoire

CLARA: Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône Alpes

LNBT: Laboratoire de Neurobiologie et Transgénése

ADME: Absorption Distribution Métabolisation Elimination

AMM: Autorisation de Mise sur le Marché

BOF: Batterie de tests d'Observation Fonctionnelle

DMT: Dose Maximum Tolérée

NOAEL: No Observed Adverse Effect Level

NOEL: No Observed Effect Level

PEG: Poly Ethylène Glycol

MABEL: Minimal Anticipated Biologic Effect Level

Introduction :

Le système de production de protéine par synthèse acellulaire est une technique développée pour la première fois en 1961. Il a été utilisé majoritairement comme outil de recherche sur les mécanismes de synthèse de protéines et dans le domaine de la protéomique. C'est une technique complexe utilisant la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle de la cellule afin de produire une protéine particulière à partir d'une information génétique spécifique. Ce système a été très peu utilisé en tant que méthode de production de protéines thérapeutiques à l'échelle industrielle à cause de son faible rendement et des forts coûts associés à son fonctionnement. Mais les recherches effectuées ces quinze dernières années ont permis de développer cette technique et de l'amener à un niveau de maturité comparable à celui des systèmes cellulaires actuellement utilisés en industrie.

L'objectif de cette thèse est de faire une revue du système acellulaire et des découvertes qui l'ont mené à son niveau actuel de maturité, d'évaluer les différentes applications industrielles de ce système et enfin d'analyser la réglementation actuelle en se basant sur le cas du développement d'un candidat-médicament produit par système acellulaire grâce à l'exemple d'un projet d'actif thérapeutique anticancéreux développé par le laboratoire TheReX et synthétisé grâce au système acellulaire basé sur l'extrait d'*Escherichia coli* développé par la société Synthelis.

1. Rappels historiques et bibliographiques :

1.1 Historique :

Les grandes dates du développement de la synthèse de protéines par système acellulaire :

1950 : première utilisation de lysats cellulaires (destruction de membranes cellulaires) pour synthèse protéique.

1961 : premier système acellulaire utilisant un message exogène (ARNm ou polyribonucléotides synthétiques ; Nirenberg et Matthaei 1961)

1967 : premier système couplé de transcription/traduction utilisant de l'ADN et non de l'ARNm (DeVries et Zubay, 1967)

1975 : première utilisation d'ARN polymérase exogène pour synthèse protéique (Roberts and al. 1975)

1988: premier Continuously Fed Cell-Free (CFCF, Spirin, Science 242:1162-1164)

1995: premier Continuous-Exchange Cell-Free (CECF, Alakhov and al., Brevet #5,478,730)

2000 : première commercialisation de kits de surexpression utilisant le système CECF (RTS, Roche diagnostics).

Le système d'expression acellulaire, aussi appelé « cell-free », a pour principe l'utilisation de la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle de la cellule pour produire une protéine spécifique à partir d'une information génétique particulière.

Les principes de transcription de l'ADN en ARNm et de traduction de ces ARNm en polypeptides ont été largement décrits dans la littérature. La différence principale entre ce système et les systèmes classiques in vivo réside dans la maîtrise de ces mécanismes fondamentaux. Depuis 1950, avec la preuve de la

fonctionnalité en termes de transcription et traduction d'un organisme unicellulaire malgré la rupture de sa membrane (1), les chercheurs n'ont cessé d'approfondir leurs connaissances des systèmes de régulation de ces mécanismes pour ainsi pouvoir les contrôler. C'est dans cet esprit qu'en 1961 Nirenberg et Matthaei ont développé le premier système traductionnel acellulaire utilisant des ARNm ou des polyribonucléotides synthétiques (2). En effet, il était plus logique de différencier ces deux mécanismes avant de réussir à produire un système viable permettant de les coupler. C'est en 1967 que DeVries et Zubay développent le premier système de transcription/Traduction couplé acellulaire (3). Leur découverte a permis de valider la théorie de ce système, et à partir de ce moment, plusieurs innovations ont vu le jour afin de renforcer le contrôle des différents facteurs influant sur cette technique et donc améliorer sa productivité. Parmi ces innovations, on peut citer l'utilisation d'une ARN polymérase exogène afin d'augmenter la formation d'ARNm de la protéine d'intérêt, l'introduction d'un système biochimique de régénération d'énergie, ou encore l'introduction d'ARNt spécifiques de codons rares pour permettre la synthèse de protéines particulières. La recherche sur la technique de synthèse acellulaire s'est aussi intéressée aux conditions de rencontre des différents constituants de la réaction et à la viabilité du système pour la production à long terme. En 1988, Spirin et al. ont développé un système de production acellulaire en continu ou Continuous Flow Cell Free (CFCF) (4). Cette technique, à la différence des réactions en batch, séquestre le milieu réactionnel dans une membrane d'ultrafiltration qui est continuellement alimenté par une pompe. Cette membrane permet de laisser passer la protéine d'intérêt dans le compartiment de tampon et ainsi la récupérer tout en continuant d'alimenter la réaction et ainsi pouvoir faire des réactions durant plusieurs dizaines

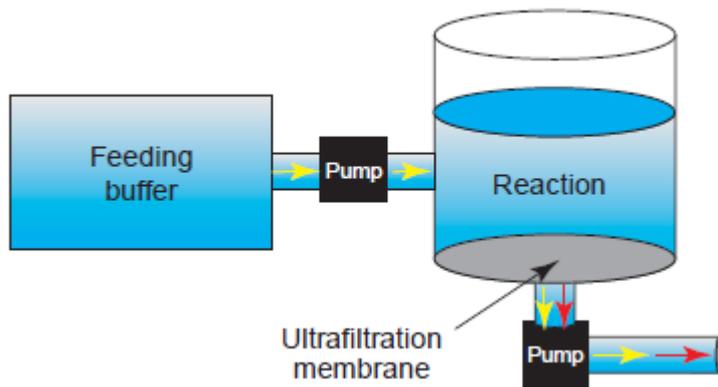


Figure 1: Schéma de la technique de Continuous Flow Cell Free. Les flèches jaunes indiquent le mouvement des éléments des solutions tampons, les flèches rouges le mouvement des protéines produites. D'après Katzen et al 2005

d'heures (cf. fig. 1). Le principe de compartimentation grâce à une membrane a ensuite été repensé, et en 1995

Alakhov and al. ont développé le Continuous Exchange Cell Free (CECF)

(5). Ce système est constitué d'un compartiment de réaction contenant le lysat cellulaire et l'information génétique, et d'un compartiment de nutrition contenant les cofacteurs, acides aminés, tampons et d'autres composants. La membrane de dialyse séparant les deux compartiments permet la sortie des molécules déchets, mais laisse rentrer les composants permettant à la réaction de s'effectuer grâce

au gradient de concentration résultant de l'activité de synthèse (cf. fig. 2).

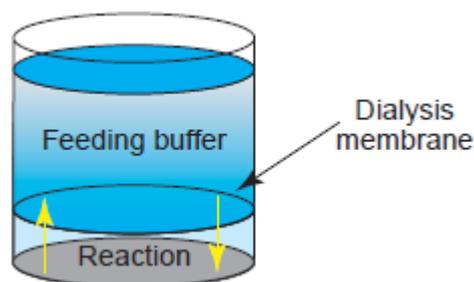


Figure 2: Schéma de la technique de Continuous Exchange Cell Free. Les flèches Jaunes indiquent le mouvement des éléments du tampon de nutrition. D'après Katzen et al 2005

Toutes ces innovations ont permis de développer le système acellulaire comme une technique viable de production de protéines recombinantes et c'est en 2000 que les laboratoires Roche ont développé

le premier kit de surexpression de

protéines utilisant un lysat bactérien et la technique du CECF (Kit RTS, Roche Diagnostics). Il s'en est suivi un engouement pour cette technique et actuellement il existe plusieurs compagnies fournissant des kits de production de protéines en

système acellulaire utilisant différents types de lysats cellulaires (bactéries, réticulocytes de lapin, germes de blé, ...).

1.2 Système acellulaire :

La technique de production de protéines recombinantes par système acellulaire est en constante évolution depuis 1950. En effet plus la technologie avance plus on entrevoit l'énorme potentiel de cette technique et les possibles applications qui en découlent. La multitude de facteurs sur lesquels il est possible de jouer montre que la recherche est encore loin d'avoir atteint les limites du système.

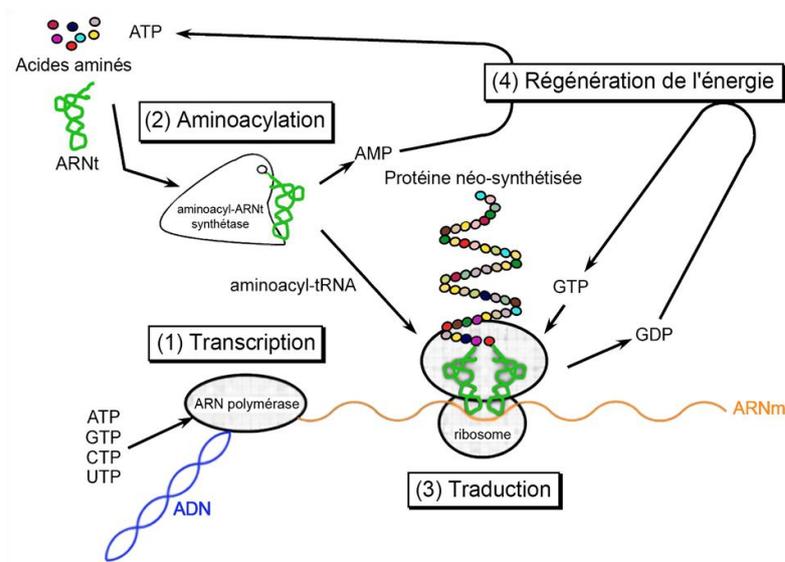


Figure 3: Etapes clés de la technique de production de protéines en acellulaire

Comme on peut le voir sur la figure 3, il existe plusieurs étapes clés dans le système acellulaire, qui sont autant d'axes de recherche pour les scientifiques afin d'améliorer cette technique.

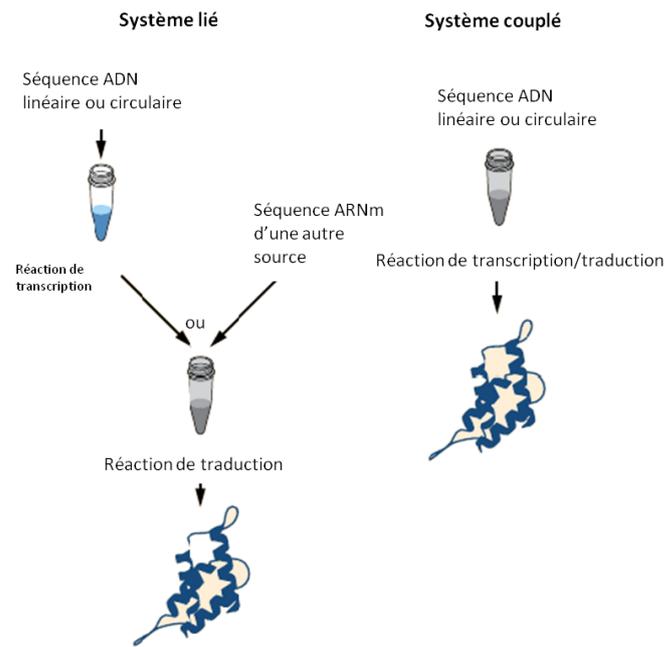


Figure 4: Systèmes liant ou couplant les mécanismes de transcription et de traduction, d'après le site internet de thermo Scientific™

Une des grandes thématiques de recherche était l'utilisation des machineries de transcription et de traduction. Les premiers systèmes acellulaires étaient utilisés uniquement dans le but de traduire l'ARNm en protéine. Avec l'évolution de la technologie, de plus en plus de chercheurs ont développé des techniques permettant d'utiliser l'ADN comme matériel génétique. Mais selon le type de cellule utilisée afin de produire le lysat, le couplage de ces phases pourra être possible (*E. coli*) ou impossible, et intéressant ou pas selon la quantité à produire et le type de protéines attendu. On appelle alors « couplés »(6) les systèmes permettant de produire la protéine en une seule étape à partir de l'ADN. La majorité des systèmes acellulaires procaryotes appartiennent à cette catégorie, les étapes de transcription et de traduction étant couplées chez les procaryotes. Les ARNm des organismes eucaryotes nécessitant une maturation post-transcriptionnelle, les techniques acellulaires eucaryotes passent de l'ADN à la protéine en 2 étapes, on parle de systèmes « liés »(7) (cf. fig. 4). Aucun « gold

standard » n'a à ce jour été défini, chaque système dispose de points forts et de faiblesses.

1.2.1 Transcription :

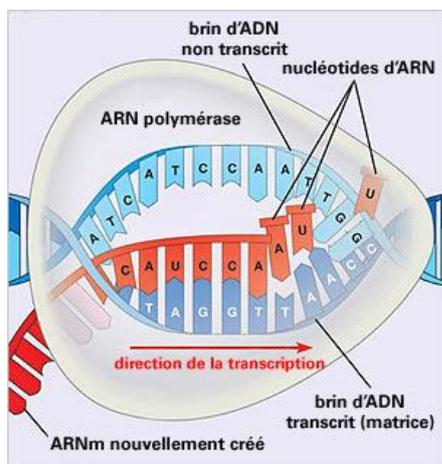


Figure 5: Mécanisme de transcription, d'après site internet de Frontiers in genetics

Ce mécanisme se déroule en trois étapes chez les procaryotes et les eucaryotes: initiation, élongation et terminaison. L'initiation de la transcription se produit lorsque l'ADN double-brin est déroulé afin de permettre la liaison à l'ARN polymérase. Une fois que la transcription est initiée, l'ARN polymérase est libérée de l'ADN.

La transcription est régulée à différents niveaux par des activateurs et des répresseurs, mais aussi par la structure de la chromatine chez les eucaryotes. Chez les procaryotes, aucune modification post-transcriptionnelle spécifique des ARNm n'est nécessaire. Cependant, chez les eucaryotes, l'ARNm doit encore subir plusieurs modifications : éliminer les introns (épissage), fixer une coiffe (M7 méthyl-guanosine) à l'extrémité 5' et ajouter des motifs adénine répétés afin de former une queue poly(A) en 3' pour ainsi éviter la dégradation précoce de l'ARNm. Il est ensuite exporté vers le cytoplasme où il sera traduit.

L'apport du matériel génétique codant pour la protéine d'intérêt peut se faire sous différentes formes selon la technique employée et le couplage ou non des mécanismes de transcription/traduction. Dans le cas d'une technique de traduction seule, l'information génétique est amenée sous la forme d'ARNm (8). Ces ARNm sont le plus souvent issus d'une réaction de transcription réalisée à partir de l'ADN

d'intérêt puis purifiés mais doivent être utilisables par la machinerie traductionnelle de façon directe. Dans le cas d'un système couplé ou lié, l'information génétique est présentée sous forme d'ADN, mais selon la technique employée et la nature eucaryote ou procaryote de la cellule base, différentes séquences complémentaires (promoteur, séquence initiatrice, terminateur,...) doivent être ajoutées à la séquence codant pour la protéine d'intérêt. Les séquences d'ADN complètes peuvent être obtenues de cultures cellulaires de plasmides bactériens afin de cloner et d'amplifier l'ADN qui sera ensuite purifié, ou encore produit par des techniques de Polymerase Chain Reaction (PCR) (9).

Les innovations sur la technique acellulaire ont toujours eu pour but d'augmenter le rendement, d'améliorer la fonctionnalité et la pureté des protéines produites. Au niveau de l'étape de transcription on a pu voir plusieurs avancées intéressantes. Afin d'être transcrit un ADN codant doit avoir en amont de sa séquence une séquence promoteur permettant la liaison de l'ARN polymérase et l'initiation de la transcription. Or, l'extrait cellulaire utilisé pour produire la protéine d'intérêt contient lui aussi de l'ADN codant pour les protéines naturelles de la cellule ce qui met en compétition l'ADN exogène et endogène. Les chercheurs ont donc essayé de dépléter le lysat en ADN et ARNm endogènes par exonucléases ce qui a permis de mettre en valeur le premier système acellulaire couplé (Zubay et al. 1967). La plus grande avancée au niveau de la transcription fut l'introduction en amont de la séquence codant un promoteur spécifique de l'ARN polymérase, d'un bactériophage et de compléter le lysat avec cette ARN polymérase de phage(10). L'utilisation de cette polymérase permet de transcrire uniquement les séquences codantes précédées du promoteur spécifique de la polymérase de phage. Mais cette polymérase possède d'autres avantages : l'ARN polymérase de

phage a un rendement de transcription bien supérieur à la polymérase endogène, l'addition de Rifampicine au lysat (dans le cas d'un système bactérien) permet d'inhiber la polymérase endogène et donc d'éviter d'avoir à éliminer l'ADN endogène et cette polymérase peut être utilisée sur des produits PCR ou des séquences d'ADN issues de plasmides(11). Plusieurs types d'ARN polymérase de phage ont été testés et 3 ont montré une efficacité accrue : la T7 RNA pol, la T3 RNA pol et la SP6 RNA pol. Ces polymérases sont les principales que l'on retrouve actuellement sur le marché.

1.2.2 Aminoacylation :

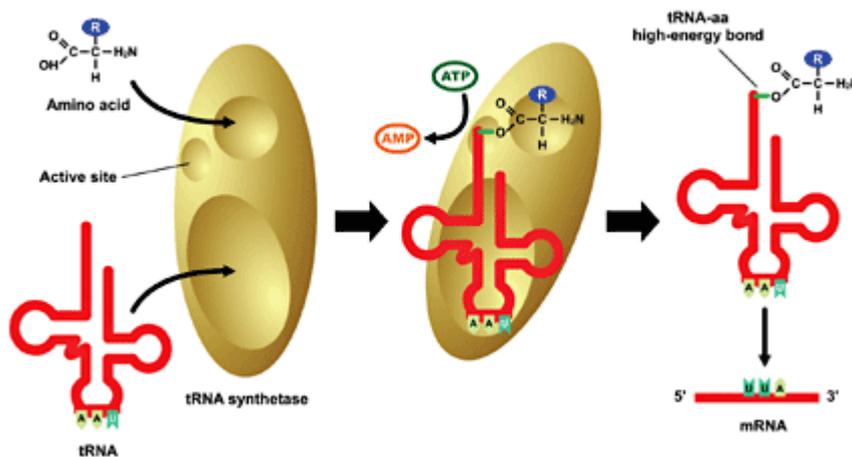


Figure 6: Mécanisme d'aminoacylation, d'après Drug News Perspect 2006, 19(6): 347

L'estérification de l'acide aminé spécifique à l'extrémité 3'-OH de l'ARNt est une étape clef du décodage du code

génétique. On appelle cette étape l'aminoacylation et, dans toutes les cellules vivantes, il existe une vingtaine d'enzymes, les aminoacyl-ARNt synthétases, dont la fonction est de catalyser cette étape.

Chacune de ces enzymes est spécifique d'un acide aminé donné et reconnaît le ou les ARNt correspondants. Ces enzymes sont capables de discriminer les ARNt

spécifiques de leur acide aminé, en reconnaissant des motifs de nucléotides particuliers, souvent dans l'anticodon lui-même, mais parfois dans d'autres régions de l'ARNt. Cette reconnaissance est cruciale, car il n'y a plus de contrôle qualité ultérieur au niveau du ribosome : toute erreur dans l'aminocyclation se traduira donc ensuite par une erreur dans le décodage du message génétique.

L'aminocyclation comprend deux étapes: l'activation de l'acide aminé par adénylation et la formation du lien ester entre l'acide aminé et l'hydroxyle 2' ou 3' du ribose du nucléotide 3' de l'ARN de transfert. Après ces deux étapes, l'ARN de transfert est prêt à amener son acide aminé spécifique vers le ribosome et l'ARN messager (12).

Un des points forts de la technique acellulaire réside dans le fait que les possibilités de modification du processus de synthèse de protéine sont incroyablement vastes. En ce qui concerne le domaine de l'aminocyclation, des ARNt et des acides aminés, beaucoup d'études ont été réalisées dans le but de permettre l'incorporation d'acides aminés non naturels (mutants, artificiels ou n'appartenant pas au type d'extrait cellulaire utilisé). Ces protéines modifiées peuvent être utilisées dans beaucoup d'applications différentes. Une des plus importantes avancées est le développement de techniques permettant de marquer les protéines produites grâce à des acides aminés synthétiques dans le but de donner aux protéines différents types de caractéristiques détectables par les moyens actuels (fluorescents(13), radioactifs(14), fonctionnalisés, puces à protéines(15)...fixés en C-ter, N-ter ou à une autre position de la séquence peptidique). Ces techniques ont permis de faciliter considérablement la production de protéines marquées, surtout au niveau des protéines difficiles à produire en systèmes classiques. Le panel d'applications possibles est très large : études

structurales par RMN, détection *in vivo* par fluorescence ou radio-marquage, puces à protéines pour les études de protéomique, fonctionnalisation de protéines permettant de faciliter leur traitement post-synthèse....

1.2.3 Traduction :

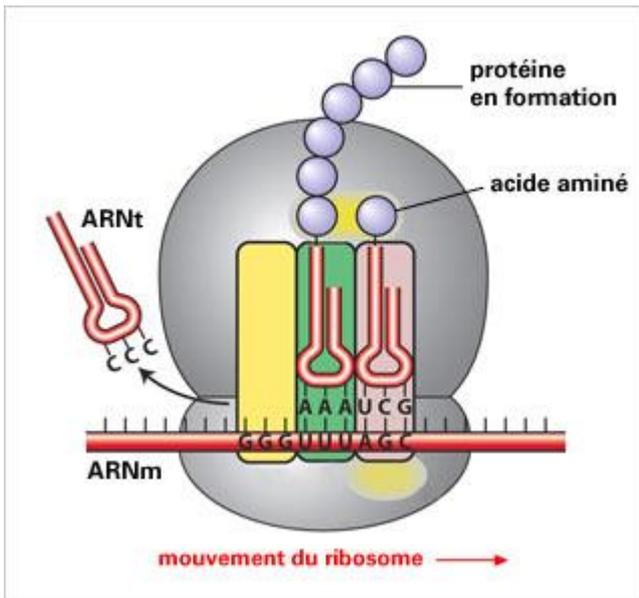


Figure 7: Mécanisme de traduction de l'ARNm en protéine, d'après le site internet de [frontiers in genetics](#)

Le mécanisme de traduction de l'ARNm en polypeptide est divisé en trois étapes :

- Une étape d'initiation où les deux sous-unités du ribosome vont s'assembler et se fixer au codon initiateur de la séquence de l'ARNm.

Les ARNt fixés à leur acide aminé vont être recrutés par le ribosome et la synthèse peptidique va commencer.

- Une étape d'élongation où le ribosome va parcourir le brin d'ARNm codon par codon (translocation) et va, par l'intermédiaire d'un ARNt, ajouter un acide aminé à la protéine en cours de fabrication selon le codon lu.
- Une étape de terminaison : une fois la séquence ribonucléotidique entièrement lue et le codon stop atteint, le ribosome va se détacher du brin d'ARNm et du polypeptide néo-synthétisé. L'ARNm pourra alors être traduit

de nouveau et le polypeptide sera alors dirigé vers d'autres localisations afin de subir d'autres modifications ou d'être utilisé tel quel par la cellule.

Par contraste avec la machinerie transcriptionnelle, le mécanisme de traduction implique un trop grand nombre de composants complexes pour pouvoir supplémenter le milieu réactionnel en molécules individuelles purifiées. Les extraits cellulaires entiers représentent le seul moyen concret de fournir l'appareil de traduction nécessaire pour «lire» le message d'un ARNm mature et générer un polypeptide *in vitro*. La même chose est vraie à propos des enzymes et des facteurs requis pour exécuter des modifications post-traductionnelles. Néanmoins, fournir la plupart des composants nécessaires sous la forme d'extraits cellulaires n'élimine pas la possibilité de compléter le mélange réactionnel avec des additifs choisis. En effet, pour améliorer les rendements en protéines, les extraits sont généralement complétés par des acides aminés et une source d'énergie pour alimenter l'expression des protéines.

D'autres moyens ont été développés pour augmenter le rendement de synthèse des systèmes acellulaires en s'intéressant au mécanisme traductionnel. Beaucoup de chercheurs se sont intéressés aux séquences des ARNm, une des innovations majeures dans les systèmes acellulaires eucaryotes est l'utilisation d'une séquence « universelle » d'initiation de la traduction(16). *In vivo* un ARNm eucaryote doit avoir une coiffe en 5' et une queue poly(A) en 3' pour réussir à initier un mécanisme de traduction. Au début des systèmes acellulaires eucaryotes de traduction seule, les chercheurs utilisaient des séquences d'ARNm comportant une coiffe ce qui permettait la fixation du ribosome à l'ARNm, mais la réaction permettant la fixation de la coiffe à l'ARNm était coûteuse et peu efficace. De plus toutes les structures analogues de la coiffe m⁷GpppG sont de forts

inhibiteurs du facteur d'initiation eIF-4E, ce qui diminuait grandement le rendement de traduction s'ils n'étaient pas correctement éliminés. Ce constat a conduit les chercheurs à utiliser une séquence IRES (Internal Ribosome Entry Site) comme séquence initiatrice(17). Les séquences IRES sont des petits fragments d'ARN constitués de 10 à 100 nucléotides, elles sont spécifiques de chaque organisme et sont normalement dérivées de virus. Par exemple, il a été prouvé que l'utilisation du fragment 5'-UTR du gène Ω du virus de la mosaïque du tabac dans un système acellulaire issu du germe de blé permettait l'initiation de la traduction de façon très efficace(18).

1.2.4 Repliement et modifications post-traductionnelles :

In vivo, une protéine néo-synthétisée doit subir plusieurs modifications et doit être repliée correctement dans l'espace avant d'être complètement fonctionnelle. Selon le type d'organisme, les modifications apportées sont différentes. Beaucoup de protéines issues d'organismes procaryotes ne nécessitent que très peu, voir aucune modification post-traductionnelle alors que la majorité des protéines eucaryotes doivent subir plusieurs modifications. Ces modifications sont regroupées en plusieurs types :

- Modifications impliquant l'addition d'un groupe fonctionnel : acétylation, alkylation, lipoylation, sulfatation, Glycosylation N et O,...
- Modifications impliquant l'addition de groupes peptidiques ou de protéines : ubiquitination, sumoylation...
- Modifications changeant la nature chimique des acides aminés : citrullination, déamidation...

- Modifications impliquant des changements structuraux : formation de ponts disulfures, clivage protéique...

Un des objectifs clés de la technique acellulaire est la synthèse de protéines biologiquement actives. L'intérêt que peuvent avoir les systèmes acellulaires par rapport aux systèmes de synthèse de protéines classiques, réside dans la possibilité de modifier l'environnement de réaction de la protéine de façon assez simple par l'ajout de réactifs et de catalyseurs de repliement. Plusieurs axes de recherches ont été explorés et l'un d'eux est l'addition de chaperonnes au milieu réactionnel afin d'améliorer le repliement des protéines néo-synthétisées. Les résultats de ces études ont montré que l'ajout exogène de chaperonnes purifiées au milieu réactionnel est protéine-dépendant. Par exemple, l'ajout de chaperonnes telles que DnaK, DnaJ, GroEL et GroES a permis de synthétiser des parties d'anticorps (fab, ScFv) fonctionnelles (19) (20). Mais ces chaperonnes n'ont apparemment eu aucun effet sur le repliement et la fonctionnalité de la luciférase produite en système acellulaire (21). Une autre modification importante pour le repliement et l'activité de beaucoup de protéines est la formation de ponts disulfures. Ces liaisons sont réalisées *in vivo* dans des compartiments cellulaires spécifiques formant un environnement très oxydant ; or, le milieu réactionnel des systèmes acellulaires est supplémenté en agents réducteurs afin de stabiliser la machinerie de synthèse protéique. Mais des études ont été réalisées afin de surmonter ces difficultés. Swartz et al. ont réussi à produire une protéine activatrice du plasminogène recombinante contenant neuf ponts disulfures en système procaryote acellulaire de façon fonctionnelle. Cette méthode augmente significativement le rendement grâce à la combinaison de l'alkylation du lysat par

l'iodoacétamide, l'utilisation d'un mélange de glutathion oxydé et réduit, et l'addition de Skp, chaperonne du périplasma d'*E. Coli*(22).

1.2.5 Système de régénération de l'énergie :

Tous les mécanismes mis en jeu au cours de la synthèse protéique utilisent de grandes quantités d'énergie sous la forme d'ATP. *In vivo*, la cellule dispose de différentes voies métaboliques (glycolyse, cycle de Krebs, fermentation alcoolique) lui permettant de transformer les substrats provenant de son environnement en ATP et d'autres systèmes permettant d'éliminer les produits de dégradation issus de ces voies métaboliques. Ces mécanismes impliquent souvent des organites liés à la membrane cellulaire.

Etant donné le principe de la technique acellulaire, les systèmes de synthèse d'ATP et d'élimination des déchets ne sont pas renouvelés ; l'efficacité du système est donc limitée dans le temps. Des études ont été menées afin d'allonger la durée de synthèse protéique efficace du système acellulaire et beaucoup de chercheurs se sont concentrés sur le système procaryote utilisant le lysat d'*E. Coli*. L'utilisation du PEP (Phospho-énol-pyruvate) comme source d'énergie (fig. 6) a permis d'étendre significativement la durée de synthèse protéique mais l'accumulation du phosphate inorganique issu de cette voie métabolique provoque la séquestration des ions magnésium et stoppe la synthèse même en présence d'une concentration suffisante en ATP (23).

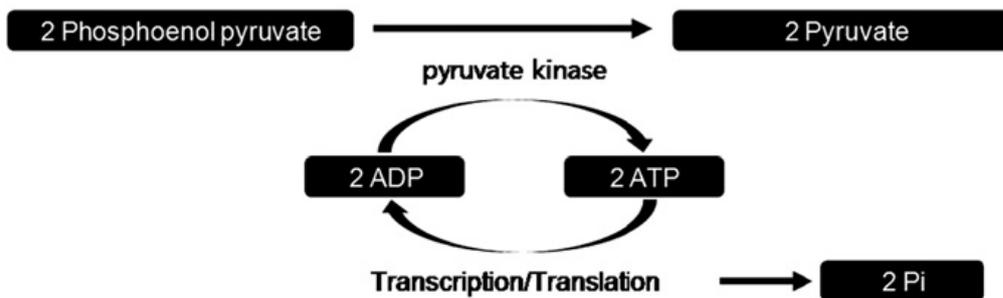


Figure 8: Régénération de l'ATP en utilisant le PEP comme source d'énergie, d'après Kim HC et al. (2008)

Ce problème a pu être en partie résolu par l'apport périodique d'ions magnésium dans le milieu réactionnel.

Un autre substrat énergétique a été utilisé, la créatine phosphate, sans qu'il ne montre de meilleurs résultats que le PEP(24).

Le glucose a déjà été utilisé comme source d'énergie mais n'avait pas montré une plus grande efficacité de production que d'autres intermédiaires glycolytiques. Cet état de fait a été remis en question par Swartz et Calhoun qui ont déterminé que la rapide diminution du pH dans le milieu réactionnel avec l'utilisation du glucose était à l'origine de la faible productivité du système(25). Ce problème peut être contourné en utilisant un tampon approprié et le rendement devient alors très intéressant tout en utilisant une source d'énergie (glucose ou glucose-6-phosphate) beaucoup moins onéreuse que les substrats énergétiques classiques (PEP, CP) (26).

1.2.6 Applications émergentes du système acellulaire :

Les dernières avancées en matière de miniaturisation, augmentation de rendement, de pureté, mise à l'échelle de production à haut débit ont permis de mettre en valeur de nouvelles applications du système acellulaire.

Les applications au niveau de la recherche dans le domaine de la protéomique ont connu un fort taux d'évolution ces dernières années. Les structures tridimensionnelles des protéines difficilement productibles ou analysables ont toujours été très peu représentées dans les bases de données. Le système acellulaire a permis ces dernières années de produire ces protéines notoirement difficiles à synthétiser par des moyens classiques (protéines toxiques, protéines membranaires, complexes protéiques...). Le système permet de produire les protéines de manière rapide, à haut débit, radio marquées, et utilisables directement pour des études structurales par RMN ou cristallographie à rayon X(27)(28)(29). Des milliers de structures de protéines ont déjà été déterminées grâce à l'utilisation du système acellulaire.

Le système acellulaire a permis aussi de développer des plateformes de synthèse de protéines ou « puce à protéine » afin de déterminer la fonctionnalité de nombreuses protéines de façon séquentielle. Les protéines produites par système acellulaire, à la différence des techniques *in vivo*, ne nécessitent pas d'être synthétisées, purifiées et immobilisées séparément. Cette technologie permet d'améliorer grandement la vitesse du procédé d'analyse des différents aspects de la fonctionnalité des protéines. L'étude menée par Goshima et al. nous montre l'utilisation d'un système acellulaire Eucaryote produit à partir d'un extrait de germe de blé comme « usine de production de protéine humaine », C'est-à-dire utiliser ce système afin de produire des protéines humaines de façon rapide et fonctionnelle et ainsi pouvoir réaliser des études de protéomique sur un grand nombre de protéines. L'objectif de l'étude était la synthèse de 13364 protéines humaines différentes(30). 97,2% ont été synthétisées avec succès et testées, une grande partie d'entre elles montrant une fonctionnalité normale. 99,86% de ces

dernières ont pu être fixés sur lame de verre afin de construire des micros puce à protéines.

Les principales faiblesses du système acellulaire (coût, rendement, mise à l'échelle, repliement des protéines) ont, par le passé, rendu rédhibitoire son utilisation au niveau industriel. Mais ces dernières années, plusieurs études ont montré que les faiblesses du système acellulaire ne sont plus des problèmes insurmontables. Des efforts ont donc été entrepris dans le développement et la commercialisation de thérapies utilisant la technologie acellulaire comme moyen de production (31). Le système acellulaire montre des possibilités impressionnantes dans le domaine des thérapies personnalisées. Par exemple en 2007, Kanter et al. ont réussi à synthétiser une cytokine fusionnée au fragment variable d'une chaîne simple (ScFv) d'un anticorps idiotype situé sur la membrane des lymphocytes d'un lymphome de type B spécifique, grâce à un système acellulaire procaryote produit à partir d'un extrait d'*E. Coli*. Cette protéine fusionnée était spécifique d'un lymphome particulier et a provoqué une réponse immunitaire contre les immunoglobulines de la membrane des cellules tumorales. Il a été frappant de voir que la production de ce vaccin purifié pour le traitement de ce lymphome spécifique a pris quelques jours alors que cela aurait pris des mois en utilisant un système de production de protéine mammifère classique.

Le développement de thérapies personnalisées n'est pas le seul aspect du domaine de la thérapeutique dans lequel le système acellulaire peut être utilisé. Actuellement trois quarts des cibles potentielles de thérapies sont des protéines membranaires(32). Or, le système acellulaire permet de grandement faciliter la production de protéines membranaires correctement repliées et fonctionnelles grâce à l'ajout de détergents ou de lipides purifiés ce qui évite la formation

d'agrégats(33). Une autre possibilité est l'addition de liposomes dans le milieu réactionnel permettant ainsi de mimer le milieu naturel de la protéine et de favoriser son repliement correct(34). Ces protéines peuvent être utilisées afin de cribler à haut débit de nouveaux candidats-médicaments contre des pathologies spécifiques de façon rapide et efficace.

Au cours des dernières années, le système acellulaire a permis de développer de nouveaux outils dans l'ingénierie des protéines. Depuis les années 90 de nombreuses techniques ont été développées dans le domaine de l'étude des protéines par évolution dirigée. Parmi ces techniques, on peut citer l'exposition de ribosomes (Ribosome display) (35), l'exposition d'ARNm (mRNA display)(36) ou encore la compartimentalisation *in vitro* (37). Globalement, ces technologies ont démontré de nombreux avantages sur les méthodes d'exposition basées sur les systèmes *in vivo* : une plus grande gamme de bibliothèques de protéines, une efficacité accrue du couplage phénotype-génotype (complexe ARN-protéine ou ADN-protéine), et des méthodes de criblage à haut débit.

2. Aspects industriels :

2.1 Principe du système acellulaire

Le système acellulaire, comme expliqué précédemment dans la première partie, a comme principe de base l'utilisation de la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle d'un organisme afin de produire à partir d'une information génétique exogène une protéine recombinante spécifique. Les organismes à partir desquels cette machinerie est extraite sont multiples et variés, et proviennent d'organismes procaryotes et eucaryotes.

De nombreuses techniques ont été développées à ce jour, chacune ayant des avantages et des inconvénients différents. L'utilisation d'un système acellulaire dans le but de produire une protéine spécifique demande donc au préalable une étude complète de la structure de la protéine, de son origine, des conditions de synthèse, des étapes de traitement post-synthèse, et de la finalité de la protéine produite afin de déterminer la technique la plus adéquate à la situation. On différencie les systèmes acellulaires selon 3 critères :

- L'origine de l'extrait cellulaire : s'il s'agit de cellules procaryotes ou eucaryotes, quelle souche et quelle espèce (*E. coli*, germes de blé, réticulocytes de lapin...)
- Le type de systèmes : Systèmes traductionnels seuls, systèmes couplés (transcription et traduction réalisées en continu dans le même milieu réactionnel), ou systèmes liés (transcription et traduction réalisées séparément).
- La technique de production : Batch, CFCF, CECF,...

De façon générale, le système acellulaire montre des avantages et des inconvénients par rapport aux systèmes classiques *in vivo*. Les principales forces et faiblesses du système acellulaire sont reprises dans la figure 7.

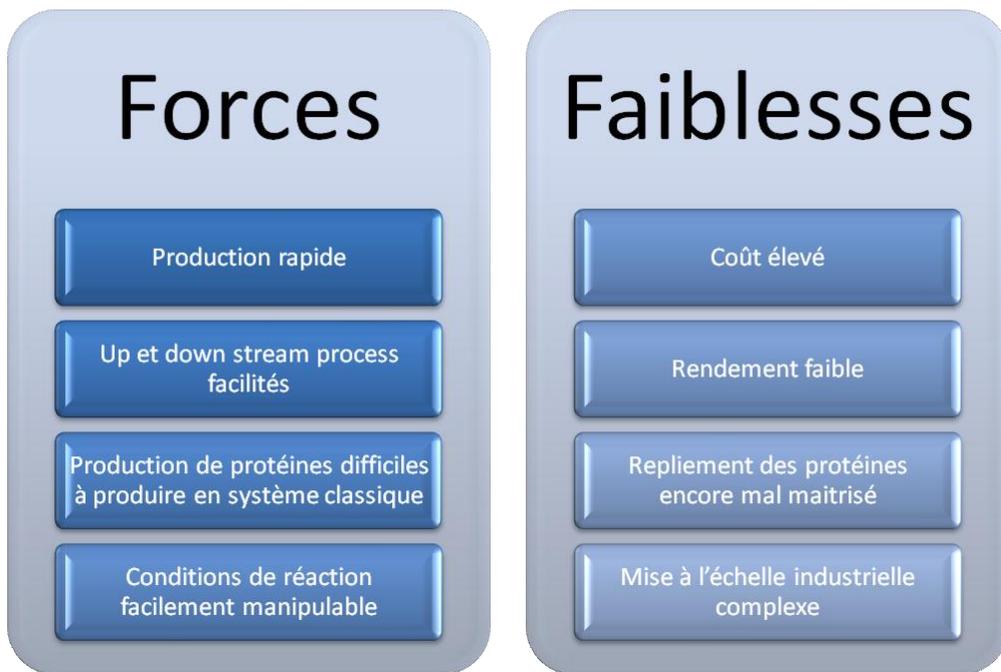


Figure 9: Forces et faiblesses du système acellulaire

2.2 Systèmes acellulaires existants :

Beaucoup de types cellulaires ont été utilisés comme base de système acellulaire durant ces 50 dernières années. Certaines de ces techniques ont été étudiées de façon approfondie et optimisées jusqu'à être commercialisées. Les espèces les plus utilisées sont :

- *E. coli*
- Germes de blé
- Réticulocytes de lapin

2.2.1 Extrait d'E .coli :

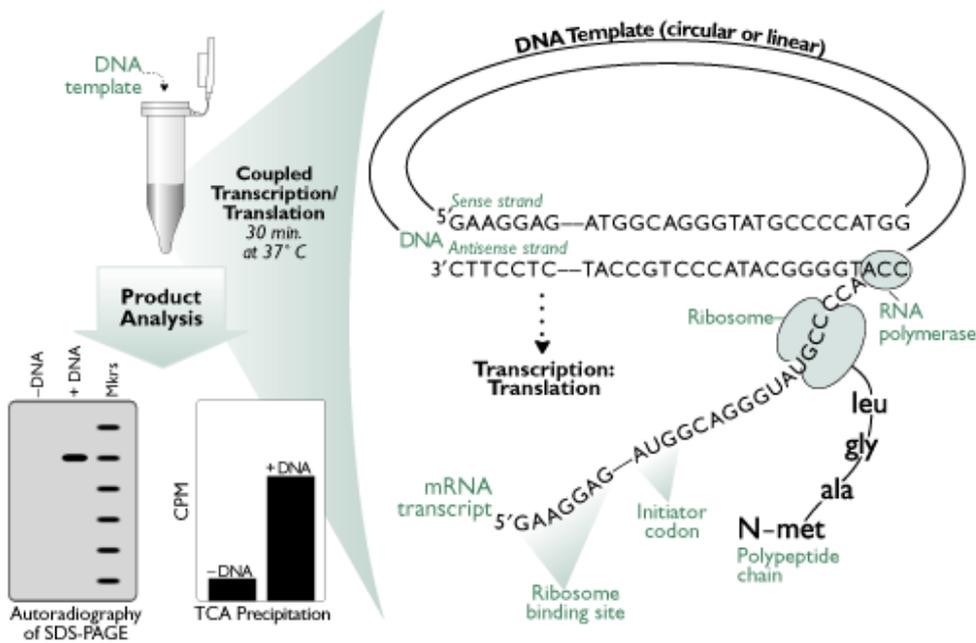


Figure 10: Système acellulaire couplé utilisant des extraits cellulaires d'*E. coli*, d'après le site internet Invitrogen

E. coli, bacille gram négatif retrouvé principalement dans le tractus intestinal des mammifères, a été décrit pour la première fois en 1885 par Theodor Escherich (38). Cette bactérie a été la plus étudiée et la plus utilisée à ce jour comme modèle d'étude des mécanismes cellulaires de transcription et de traduction car facilement accessible, généralement non pathogène et facilement cultivable sur milieu défini. Le premier système acellulaire développé par Nirenberg et al.(2) utilisait une souche d'*E. coli* comme extrait cellulaire. Ce système a donc été étudié pendant cinquante ans ce qui en fait le système acellulaire le plus optimisé parmi les différents types d'extraits cellulaires développés à ce jour.

Les dispositifs acellulaires dérivés d'*E. coli* ont d'abord été développés sous la forme de système de traduction seule, comme celui développé par Nirenberg et al.. Mais très vite, les chercheurs ont essayé de développer des techniques permettant l'utilisation d'ADN comme matériel génétique étant donné que les mécanismes de transcription et de traduction sont couplés chez *E. coli* et que le processus de formation d'ARNm purifié est complexe et consomme beaucoup de

temps et de réactifs. Le système *E. coli* a été le modèle utilisé pour développer la majorité des méthodes de productions actuelles, surtout le CFCF (4) et le CECF (5). Ces méthodes ont ensuite été adaptées à des systèmes utilisant différents extraits cellulaires comme les germes de blé ou les cellules d'insectes.

Le système acellulaire basé sur l'extrait d'*E. coli* a connu énormément d'innovations depuis sa découverte et beaucoup de mécanismes différents ont été étudiés afin d'améliorer le rendement de réaction et d'étendre le champ d'application du système. L'optimisation du mécanisme de transcription a été un axe de recherche très prisé par les chercheurs ce qui a permis la découverte de concepts majeurs. L'utilisation d'une polymérase exogène de bactériophage, entre autres, a permis d'augmenter le rendement de la protéine d'intérêt tout en éliminant la traduction de protéines endogènes de la cellule, et donc d'éviter des étapes de traitement du lysat afin d'éliminer l'information génétique endogène, et des étapes de purification post-synthèse(11). D'autres innovations ont permis d'augmenter drastiquement les capacités de production du système *E. coli*, différentes techniques d'extraction de la machinerie cellulaire ont été développées dans l'optique de ne récupérer que les composants endogènes indispensables au mécanisme de transcription et de traduction et de compléter le milieu en fractions d'éléments essentiels. Le plus utilisé actuellement est l'extrait S30 qui est un extrait cellulaire brut dont l'information génétique (ADN, ARNm) endogène a été éliminée ; l'extrait contient donc les ribosomes, les ARNt totaux, toutes les enzymes solubles et les facteurs de traduction des protéines(39). Le système S100 est un extrait ne contenant ni ribosomes, ni acides nucléiques, il est donc complété en ribosomes purifiés et ARNt totaux(40). L'extrait d'*E. coli* le plus complexe est basé sur l'utilisation de composants essentiels aux réactions de

transcription et traduction qui ont été purifiés et réintroduits dans le milieu réactionnel(41). Cette dernière technique a donné naissance à un produit commercialisé en kit actuellement : le PURESYSTEM® (Biocomber and Co). L'amélioration du rendement selon la technique d'extraction utilisée est dépendante de la protéine à synthétiser.

Une autre innovation intéressante du système acellulaire en *E. coli* a été le perfectionnement de l'apport exogène en acides aminés. Au cours de son développement, plusieurs études ont prouvé que l'utilisation et la dégradation des acides aminés n'était pas homogène(42). Certains acides aminés semblent être utilisés ou dégradés très précocement par rapport aux autres, ce qui inhibait fortement la synthèse protéique. Plusieurs solutions ont été testées afin de contrebalancer cette perte d'acides aminés : Kim et al. ont essayé de compléter le milieu réactionnel en acides aminés additionnels de façon périodique ce qui a permis d'augmenter considérablement la durée de synthèse et donc le rendement de réaction (43). Mychel-Redellet et al. ont étudié une alternative utilisant le principe de rétro-ingénierie métabolique : ils ont d'abord étudié les mécanismes métaboliques entrant en jeu dans la dégradation des acides aminés, identifié les gènes responsables et modifié le génome de la souche utilisée afin d'inhiber le processus de dégradation. Ils ont pu observer une nette augmentation du rendement de synthèse de la protéine d'intérêt(44).

Le système acellulaire basé sur l'extrait d'*E. coli*, bien qu'il soit le plus étudié et optimisé, n'est pas le gold standard des techniques acellulaires de production de protéines recombinantes. Il a donc des forces et des faiblesses par rapport aux autres systèmes, qui doivent être prises en compte lors du choix de la meilleure

technique à utiliser selon la protéine à produire et les objectifs du projet. Les principaux avantages et inconvénients de ce système sont repris dans la figure 9.

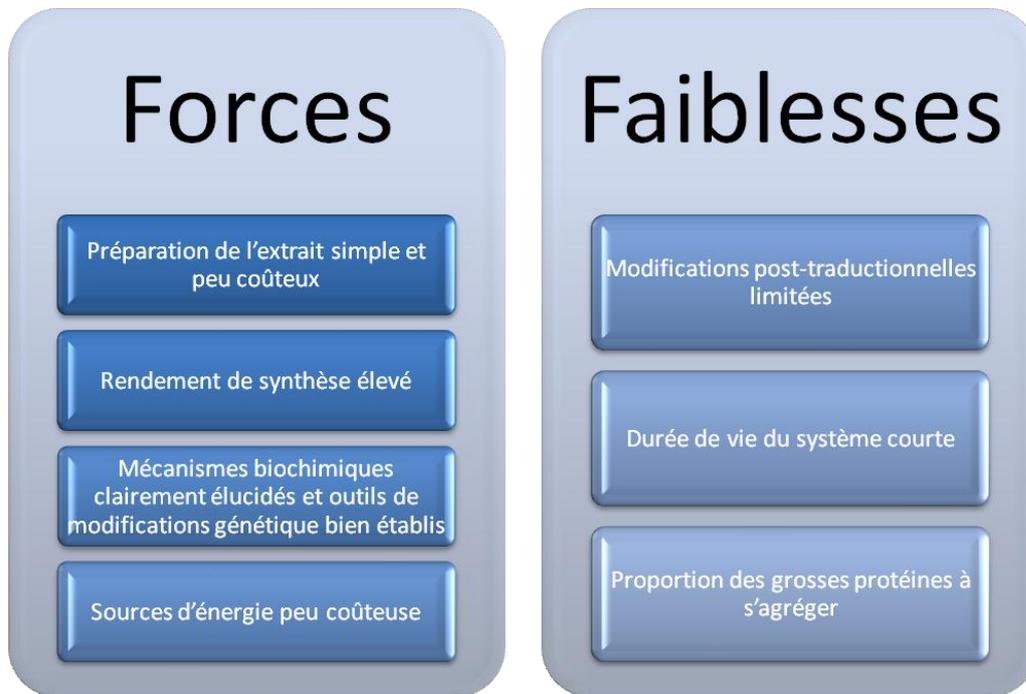


Figure 11: Forces et faiblesses du système acellulaire basé sur l'extrait d'*E. coli*

Actuellement plusieurs entreprises commercialisent des kits d'expression acellulaire de protéines utilisant des extraits d'*E. coli* : Qiagen, Promega, Invitrogen, Thermo Scientific, Roche diagnostics. Ces kits sont principalement destinés aux laboratoires de recherche publique et aux services R&D d'entreprises pharmaceutiques.

2.2.2 Germes de blé:

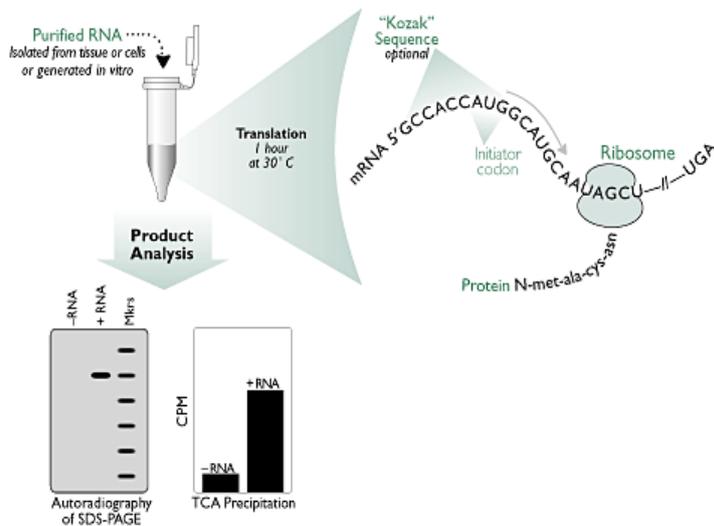


Figure 12: système acellulaire basé sur l'extrait de germes de blé, d'après le site internet invitrogen

La première étude décrivant l'utilisation de germes de blé comme base pour un système acellulaire a été publiée en 1973 par Roberts et al. (45). Ils décrivent l'extraction du lysat de germes de blé selon une technique adaptée à partir des données sur l'extraction existant à cette époque et montrent que les protéines produites migrent exactement à la même hauteur que les protéines natives sur gel SDS-PAGE. Ce système acellulaire, à base de germe de blé de première génération, était un système traductionnel seul. Il nécessitait une étape de clonage dans *E. coli* de la séquence ADN de la protéine d'intérêt dans un vecteur adéquat afin d'obtenir un pool de plasmides isolés. Ces plasmides étaient utilisés pour réaliser une réaction de transcription en présence d'une coiffe m⁷GpppG comme unité d'activation de la traduction. Les ARNm synthétisés devaient subir une étape de purification afin d'éliminer cette coiffe qui est un puissant inhibiteur du facteur d'initiation de traduction eIF-4E (46). Cette technique comportait des

limites dues aux étapes de clonage et de préparation des ARNm souvent complexes et longues à effectuer.

Le système acellulaire basé sur l'extrait de germe de blé a connu plusieurs avancées technologiques importantes depuis sa découverte. Après la définition de la technique de première génération, plusieurs études ont été menées afin de surmonter les limites de ce système. Une première innovation fut l'utilisation des techniques de PCR afin de synthétiser les séquences d'ADN nécessaires à l'étape de transcription, avec pour l'objectif d'éliminer l'étape de clonage. Mais la technique de PCR conventionnelle génère ce que l'on appelle des artéfacts « dimères d'amorces » de brins d'ADN incomplets. Certains de ces artéfacts contiennent la séquence complète du promoteur et sont donc reconnus par l'ARN polymérase puis transcrits en « faux » ARNm. Ces ARNm sont souvent traduits ce qui donne des peptides ou des protéines tronquées mais pas des protéines complètes. Pour résoudre ce problème, Sawasaki et al. ont développé une stratégie basée sur l'utilisation d'amorces partagées (47). Cette technique consiste à utiliser un ensemble de quatre amorces, aucunes des amorces ne contenant la séquence promoteur en entier. Cette séquence est partagée entre deux amorces et ne sera régénérée que dans le cas où les deux amorces seront associées de façon correcte, ce qui n'autorise que la transcription d'ARNm complets et actifs. Cette technique permet généralement de supprimer l'étape d'optimisation des conditions de PCR pour chaque séquence d'intérêt et donc de construire les séquences d'ADN qui seront utilisées lors des étapes de transcription directement à partir des clones d'*E. coli* contenant les séquences d'intérêt. De plus, le recours à des techniques de PCR permet l'utilisation d'étiquettes pouvant être utiles pour les étapes de purification post-synthèse.

Sawasaki et al. ont aussi essayé d'améliorer l'activation de l'initiation de la traduction et la stabilité des ARNm. Pour ce faire, la coiffe et la queue poly(A) ont été éliminées pour laisser la place en 3' et 5' à des séquences activatrices de la traduction provenant du virus de la mosaïque du tabac. Ces séquences permettent d'augmenter la durée de vie des ARNm et d'augmenter le rendement de traduction.

La composition fondamentale de l'extrait cellulaire de germes de blé a aussi été étudiée et il a été prouvé que le lysat contient des inhibiteurs de traduction tels que l'ARN N-glycosidase, la thionine, des ribonucléases et des protéases suspectées d'être impliquées dans un système suicide ciblant la machinerie traductionnelle. Ces enzymes seraient localisées au niveau de l'endosperme(48) (49). Une étape plus importante de lavage des embryons de blé a permis d'éliminer ces contaminants de l'endosperme et ainsi de produire des lysats plus stables et montrant une plus grande activité de synthèse protéique (49).

Le système acellulaire en germe de blé a comme tous les autres systèmes des avantages et des inconvénients qui doivent être pris en compte lors du choix de la meilleure technique à utiliser selon la protéine à produire et les objectifs du projet. Les principaux avantages et inconvénients de ce système sont repris dans la figure 13.

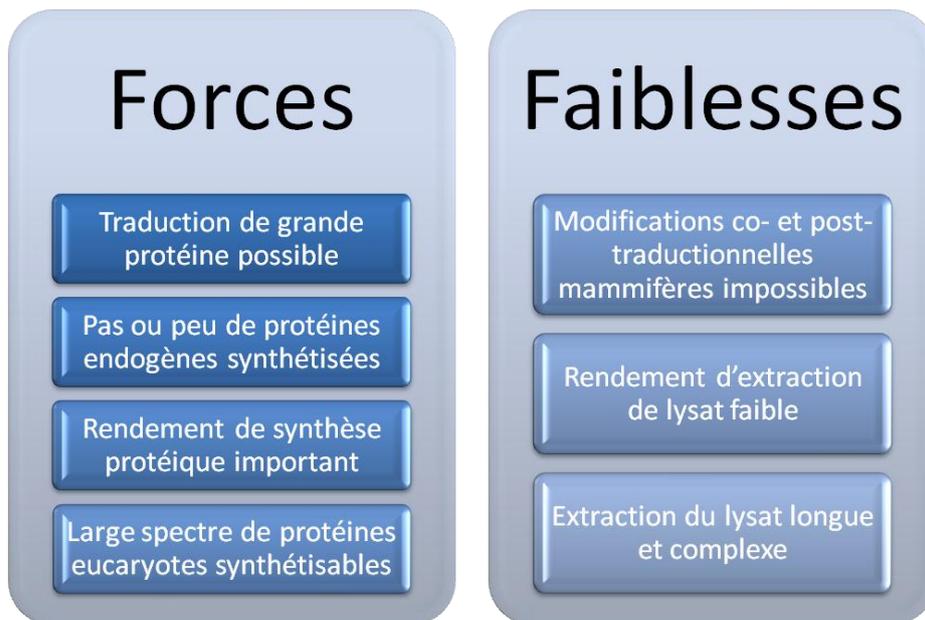


Figure 13: Forces et faiblesses du système acellulaire basé sur l'extrait de germes de blé

Actuellement plusieurs entreprises commercialisent des kits d'expression de protéine en système acellulaire basés sur l'extrait de germes de blé : Roche diagnostics et CellFree Sciences & Co. Ces kits sont destinés aux laboratoires de recherche publique et aux départements R&D des industries pharmaceutiques.

Le système acellulaire basé sur l'extrait de germes de blé a surtout été développé dans l'objectif de l'appliquer aux études de protéomique structurale et fonctionnelle et plus précisément au criblage à haut débit de protéines eucaryotes, solubles ou membranaires. Une des avancées récentes dans l'automatisation de la réaction de synthèse acellulaire de protéine à grande échelle a été réalisée par la société CellFree Sciences & Co avec la commercialisation de plusieurs automates de synthèse acellulaire basée sur l'extrait de germes de blé. Le GeneDecoder1000™ pour le criblage de protéines à petite échelle (50), les protemist 10™, 100™ et XE™ qui permettent la synthèse de protéines solubles et membranaires à grande échelle (51). Ces automates utilisent un système

acellulaire lié grâce à un vecteur (pEU) développé spécifiquement pour la technique à base d'ERL et une ARN polymérase T7.

2.2.3 Extrait de réticulocyte de lapin :

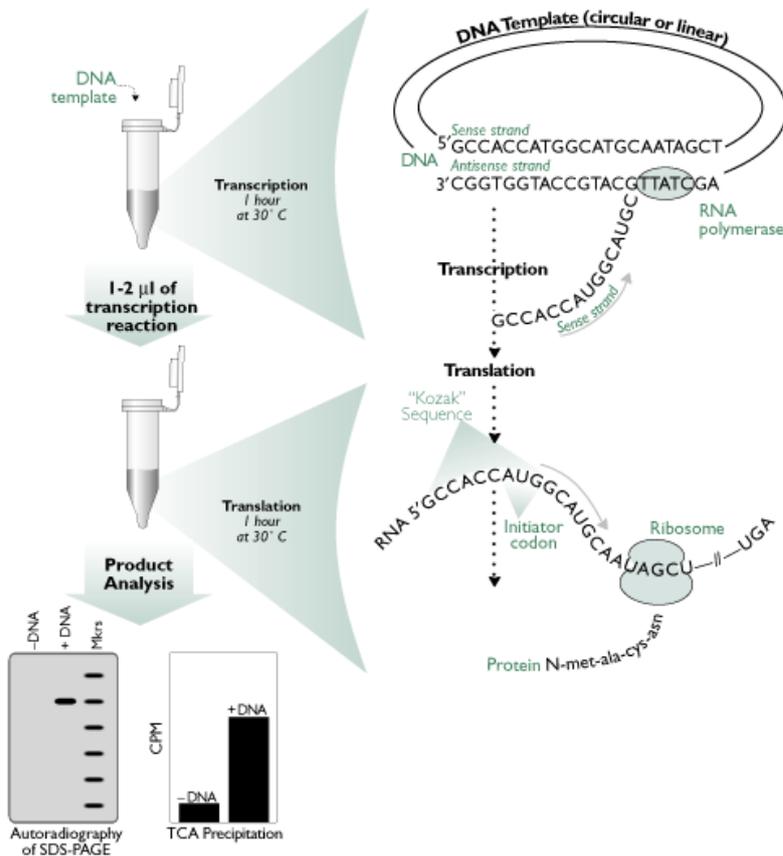


Figure 14: Système acellulaire basé sur l'extrait de réticulocytes de lapin, d'après le site internet Invitrogen

Le réticulocyte est la cellule précédant le stade érythrocyte, il contient encore des ribosomes, des mitochondries, des ARNm et des facteurs de traduction. A ce stade, la cellule étant déjà spécialisée, la majorité des ARNm présents codent pour la synthèse de globine afin de former de l'hémoglobine en s'associant avec une molécule d'hème. Le principe d'obtention des réticulocytes est l'élevage de lapin chez lesquels on a induit un état d'anémie grâce à un traitement par acétylphénylhydrazine. Le sang est ensuite récolté par ponction cardiaque, les réticulocytes sont séparés du sang total et le lysat est extrait. Le système

acellulaire basé sur l'Extrait de Réticulocytes de Lapin (ERL) est une technique de production de protéines basée sur un système eucaryote développé par Hunt et al. en 1974 (52). Il s'agit d'un système traductionnel seul développé à la base comme un outil pour l'étude des ARNm. Ce système a connu une forte avancée technologique pendant les années 70 et 80 car c'est un système utilisant des cellules de lapin, donc permettant de produire des protéines eucaryotes contenant des modifications post traductionnelles spécifiques des mammifères. La première génération de système acellulaire était basée sur l'ERL non fractionné et n'ayant subi aucun traitement spécifique. Ce système permettait la synthèse de protéines à partir d'ARNm exogène mais les ARNm endogènes de la cellule étaient aussi traduits ce qui posait un problème d'efficacité du fait de la compétition au niveau des mécanismes traductionnels entre les informations génétiques endogènes et exogènes ainsi qu'au niveau post traductionnel pour la purification des protéines d'intérêt.

Une des plus importantes innovations de ce système a été le développement d'une méthode d'élimination des ARNm par traitement du lysat par nucléases micrococcales (53). Une première technique avait été développée utilisant des ribonucléases pancréatiques mais elle nécessitait une étape de fractionnement du lysat afin d'éliminer ces ribonucléases avant l'introduction d'ARNm exogènes ce qui diminuait l'activité du lysat à un niveau inférieur à celle du lysat non-fractionné. Les nucléases micrococcales sont calcium dépendantes, elles peuvent donc être inactivées par l'ajout d'un chélateur d'ions calcium comme l'EGTA après traitement par nucléases. Cette technique permet d'atteindre le niveau d'activité du lysat non-fractionné avec une production de globine négligeable.

Malgré la nature eucaryote de l'extrait cellulaire utilisé comme base de cette technique, un système couplant les mécanismes de traduction et transcription a été développé en 1992 par Craig et al. (54). Le principe développé permet l'utilisation d'un plasmide contenant un promoteur de polymérase de bactériophage T7 et la séquence ADN codant pour la protéine d'intérêt dans un milieu réactionnel supplémenté par une ARN polymérase T7 permettant la transcription des ARNm, et différents ions et cofacteurs activant les mécanismes de traduction et de transcription, et pourront ensuite être traduits en protéines. Ce qui rend possible ce couplage est le fait que l'initiation de la traduction des ARNm est relativement indépendante de la coiffe, ou d'analogue de cette coiffe, retrouvée en 5' des ARNm généralement essentielle au mécanisme de traduction eucaryote (55).

Le système acellulaire basé sur l'ERL a comme tous les autres systèmes des avantages et des inconvénients qui doivent être pris en compte lors du choix de la meilleure technique à utiliser selon la protéine à produire et les objectifs du projet. Les principaux avantages et inconvénients de ce système sont repris dans la figure 15.

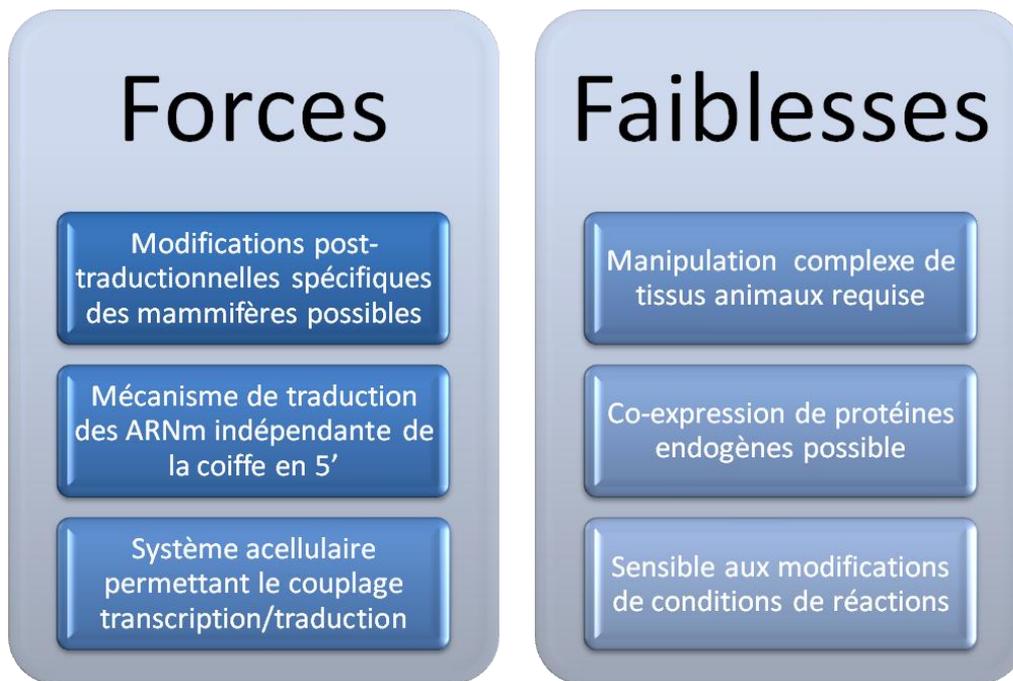


Figure 15: Forces et faiblesses du système acellulaire basé sur l'extrait de réticulocytes de lapin

Actuellement plusieurs entreprises commercialisent des kits d'expression de protéines en système acellulaire basé sur l'extrait de réticulocytes de lapin : Ambion et Promega. Ces kits sont destinés aux laboratoires de recherche publique et aux départements R&D des industries pharmaceutiques.

2.2.4 Autres systèmes existants :

Le principe de fonctionnement du système acellulaire de synthèse de protéines a été prouvé et développé en utilisant principalement des extraits d'*E. coli*, de germe de blé et de réticulocytes de lapin, mais cette technique peut être utilisée avec tous types de cellules. De nombreuses études décrivent des systèmes acellulaires développés à partir de différentes cellules procaryotes ou eucaryotes, d'insectes, de batraciens, de mammifères ou humaines. Voici une liste non exhaustive de quelques exemples d'autres types de cellules utilisées comme base de systèmes acellulaires :

- Systèmes bactériens :
 - *Pseudomonas fluorescens* (56)
 - *Staphylococcus aureus* (57)
 - *Coxiella Burnetii* (58)
 - *Thermococcus kodakaraensis* (59)
 - *Leishmania tarentolae* (60)
- Systèmes à base de cellules d'insectes:
 - Cellules de *Spodoptera frugiperda* 21 (61)
 - Cellules de *Trichoplusia ni* (62)
 - Cellules de *Drosophila Schneider* 2 (63)
- Système à base de cellules d'ovocytes et d'œufs de batraciens :
 - Cellules de *Xenopus laevis* (64)
- Système à base de cellules de mammifères :
 - Cellules de foie de souris (65)
- Systèmes à base de cellules humaines :
 - Cellules HeLa(6)
 - Hybridomes (66)

Toutes ces techniques ont été développées pour les besoins précis de leurs études mais certaines ont été étudiées plus en détails afin de mettre en place un système acellulaire permettant de produire plusieurs types de protéines différentes pour diverses applications dans le domaine de l'étude des mécanismes de transcription et de traduction, de la protéomique fonctionnelle et structurale. Ces dernières années, la recherche se tourne aussi vers l'utilisation du système acellulaire comme outils de développement de vaccins thérapeutiques. Tout cela montre que la technique de production de protéines par système acellulaire a

encore de beaux jours devant elle comme outil de recherche. Les derniers progrès dans l'optimisation de la technique, que ce soit au niveau de l'augmentation du rendement de production ou de la diminution des coûts promettent de belles perspectives d'avenir à cette technique comme outil de production de protéines thérapeutiques à grande échelle.

2.3 Applications industrielles :

La synthèse acellulaire est utilisée et commercialisée principalement sous la forme de kit d'expression de protéine difficilement synthétisables en systèmes classiques. Le système acellulaire n'a, à ce jour, encore jamais été utilisé comme moyen de production pour des produits thérapeutiques commercialisés. Malgré l'évolution de la technique sur le plan du rendement et du coût de production, qui restent les deux éléments de décision majeurs au niveau de l'industrialisation, l'industrie pharmaceutique reste encore frileuse dans l'utilisation de ces techniques à grande échelle pour la production de protéines thérapeutiques.

En effet, essentiellement grâce aux études menées par les équipes du Pr Swartz et du Pr Spirin, différents systèmes de production (CFCF, CECF, thin film (67)) ont été développés permettant une augmentation du rendement et du temps de réaction, une diminution des coûts de production et des étapes de traitement post-synthèse facilités. Un exemple d'utilisation possible du système acellulaire en CECF comme moyen de production a été publié en 2010 ; il s'agit d'une étude décrivant l'utilisation d'un système acellulaire basé sur l'extrait d'*E. coli* afin de produire un vaccin trivalent contre les trois sérotypes toxiques pour l'homme de la toxine botulique (68). Cette technique semble avoir un avenir prometteur car il permet d'outrepasser les problèmes que l'on peut rencontrer avec des systèmes

classiques mais sa mise à l'échelle industrielle n'a pas encore été étudiée. Ces techniques ont surtout permis le développement du système acellulaire et son utilisation industrielle au niveau des étapes de développement de thérapies, par exemple l'utilisation d'automates utilisant le système acellulaire basé sur l'extrait de germes de blé développés par Cellfree Sciences pour le criblage à haut débit de nouveau candidat vaccin contre le paludisme (69). Mais ces techniques restent très difficiles à mettre à l'échelle industrielle en tant qu'outil de production (70). C'est pourquoi plusieurs équipes de recherche se sont concentrées sur l'amélioration du système en batch afin de pouvoir atteindre des volumes et des rendements de réaction importants pour des coûts faibles.

Une équipe de chercheurs de la société Sutro Biopharma Inc. a publié en 2011 le développement d'un système acellulaire basé sur l'extrait d'E .coli permettant de produire le facteur de croissance des granulocytes et des macrophages (rhGM-CSF), une cytokine contenant deux ponts disulfures essentiels à son activité (31). Ce système permet la production de cette protéines avec un rendement de l'ordre de 700 µg/mL, avec un volume réactionnel allant jusqu'à 200 L. Un des intérêts du système acellulaire est la simplification des processus de traitement post-synthèse par rapport aux systèmes classiques, ce qui a permis le montage d'un processus de purification simple, ne nécessitant que peu de manipulations et permettant d'atteindre un niveau de récupération de 65%. De plus cette technique a été développée afin de répondre le plus possible aux exigences des cGMP qui sont obligatoires pour toute production d'actifs thérapeutiques.

Un axe de recherche très prisé actuellement au niveau du développement d'actifs thérapeutiques est la mise en place de thérapies personnalisées. Ce type de traitement permettra de développer des médicaments spécifiques à chaque

patient afin de pouvoir traiter efficacement les pathologies ciblées en minimisant au maximum les effets toxiques indésirables. La possibilité du système acellulaire de pouvoir produire des protéines à partir d'informations génétiques extraites par des techniques de PCR de façon rapide et facilement purifiable met cette technique au premier plan des outils permettant ce genre de thérapies personnalisées. Depuis plusieurs années, le Pr Ron Levy et son équipe développent une technique permettant la production de vaccins personnalisés contre le lymphome à cellules B par système acellulaire basé sur l'extrait d'*E. coli*

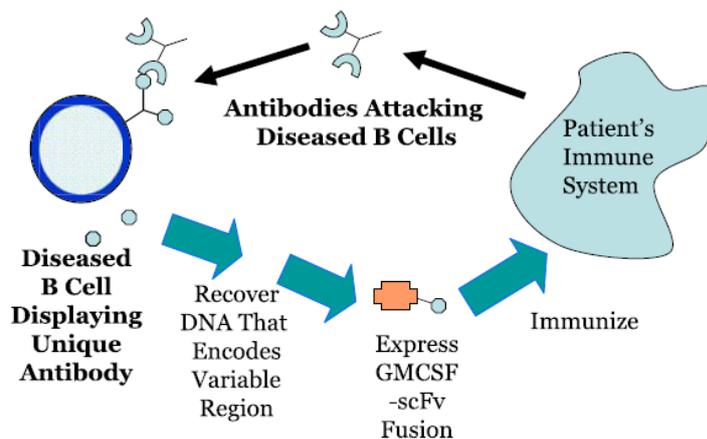


Figure 16: Principe de production de vaccins personnalisés contre le lymphome à cellule B, d'après Swartz et al 2006

(71) (72). Les lymphomes à cellules B sont issus chez un patient d'un seul clone de cellules B, les cellules tumorales présentent donc toutes à leur surface un anticorps spécifique. L'objectif de cette

technique, comme décrit dans la figure 16, est de récupérer l'ADN qui code pour les fragments variables de cet anticorps par PCR pour ensuite synthétiser par système acellulaire une protéine de fusion entre le GM-CSF et un ScFv spécifique de cet idiotype. Cette protéine sera ensuite injectée au patient afin de déclencher une réponse immunitaire spécifique des cellules tumorales du lymphome. Plusieurs études ont été menées afin de produire des vaccins anticancéreux en utilisant les systèmes classiques *in vivo*, certains sont en phase clinique, mais ces produits restent longs et chers à produire par ce type de technique. L'approche acellulaire permet de diminuer grandement le temps de production ainsi que les

coûts de traitement post-synthèse. Ce traitement est en phase de développement et des études non-cliniques sur des modèles murins ont été conduites, montrant une activité anti-tumorale très encourageante (fig. 17).

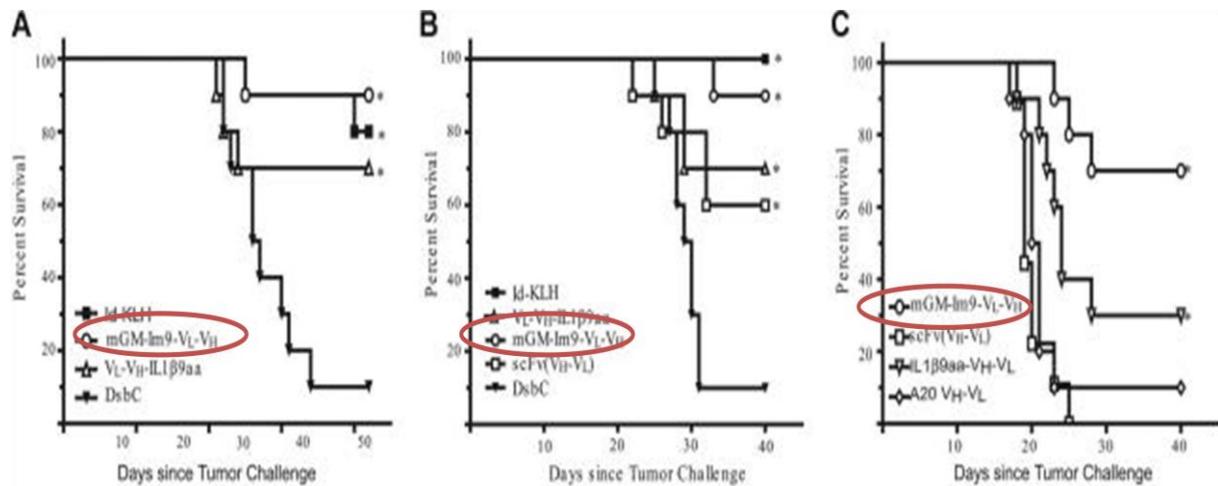


Figure 17: Courbe Kaplan-Meier de souris immunisées par injection de vaccin anti-lymphome à cellules B après challenge tumoral par injection de cellules 38C13, d'après Kanter et al. 2006

2.4 Comparaison de l'efficacité et des coûts des systèmes acellulaire de production de protéines les plus utilisés :

Les systèmes acellulaires à base d'extrait d'*E. coli* et de germes de blé sont les techniques les plus développées pour la production de protéines. Mais leurs utilisations se concentrent surtout dans le domaine de la recherche, sous la forme de kits d'expression de protéines à petite échelle, et très peu de systèmes ont été développés à l'échelle industrielle. De plus leur efficacité au niveau rendement et fonctionnalité est protéine-dépendant, ce qui rend très difficiles leur comparaison. Certaines études comparent ces différents systèmes en termes de performances (cf. figure 18).

Table 1

Comparing the performance of cell-free expression systems

	<i>E. coli</i> extract	Rabbit reticulocyte lysate	Wheat germ extract	References
Productivity (per ml) ^a	6 mg	μg order	9.7 mg	[13,32]
Folding	Post-translation	Co-translation	Co-translation	[9]
Quality ^b	Low	High	High	
Codon preference	Tight	Tight	Loose	[16–18]
Post-translational modification	No	Yes	Yes	http://www.promega.com/guides
Membrane protein	Yes	Yes	–	[22,33]
Disulfide-bond formation	Yes	–	Yes	[34,35]
Cost	Low	High	Low	

^a Measured as the amount of chloramphenicol acetyltransferase (*E. coli* extract) or green fluorescent protein (wheat germ extract) produced by the translation reaction when performed in CFCF mode.

^b Multidomain enzymes expressed from eukaryotic genes are active and purified proteins are good antigens for antibody screening, as well as for raising antibodies without any additional refolding process.

Figure 18: Comparaison des performances de trois systèmes acellulaire, d'après Endo et al. 2006

Mais ces données se réfèrent à des études réalisés sur des protéines différentes dont les systèmes ont été optimisés à partir de kit commerciaux afin d'améliorer au maximum leurs performances. De plus la question du coût des composants n'est pas prise en compte.

Les performances d'un système sur la production d'une protéine particulière sont dépendantes de la technique utilisée, de la protéine à produire ainsi que de l'utilisation qui en sera faite. Afin d'évaluer la capacité de ces deux systèmes à produire des protéines de façon générale, deux modes de production, en batch et en CECF, ont été comparés en terme de rendement et de prix de réaction. Les informations présentées dans ces tableaux se basent sur les données fournies par les entreprises commercialisant ce type de kits.

Table 1: Comparaison des systèmes acellulaires commerciaux en batch basé sur les extraits d'E. coli et de germes de blé.

	<i>E. coli</i>	Germes de blé
Rendement annoncés	0.5 mg/mL	0.1 mg/mL
Temps de réaction	1h	2h
Volume de réaction	1 mL	50 µL
Type de système	Système couplé	Système couplé
Méthode d'expression	Batch	Batch
Prix pour une réaction	19€	19,80€
Produits	S30 T7 high-yield protein expression system (Promega)	TNT SP6 High-yield protein expression system (Promega)

Table 2: Comparaison des systèmes acellulaires commerciaux en CECF basé sur les extraits d'E. coli et de germes de blé.

	<i>E. coli</i>	Germes de blé
Rendement annoncés	2.5 mg/mL	1 mg/mL
Temps de réaction	24h	24h
Volume de réaction	1 mL	1 mL
Type de système	Système couplé	Système couplé
Méthode d'expression	CECF	CECF
Prix pour une réaction	362€	362€
Produits	RTS 500 E. coli disulfide kit (Roche applied science)	RTS 500 Wheat Germ CECF Kit (Roche applied science)

3. Aspects Réglementaires :

3.1 Développement d'un médicament produit par système acellulaire :

Actuellement aucun médicament produit par système acellulaire n'a été commercialisé mais certains projets sont en cours d'étude. Le développement d'un candidat-médicament doit répondre à des critères définis par des textes de loi développés par les instances réglementaires de chaque pays dans lequel le médicament sera vendu.

Le marché du médicament, et par extension l'industrie de la santé dans sa globalité, est un des secteurs le plus réglementé actuellement. Cela implique une organisation complexe et l'internationalisation du marché n'a pas aidé à la rendre plus compréhensible. Les autorités de santé sont nombreuses et leurs rôles et juridictions peuvent être assez nébuleux pour la majorité des gens. Au niveau international, les acteurs prépondérants sont la Food and Drug Administration (FDA) qui est l'autorité de santé aux Etats-Unis, l'European Medicines Agency (EMA) celle de l'Europe, et le Ministry of Health, Labour and Welfare (MHLW) celle du Japon. Bien que chaque pays en Europe et dans le reste du monde ait son propre système de régulation de la santé, ces organismes promulguent les recommandations les plus drastiques en matière de développement de médicament ce qui incite les industriels ayant la volonté de mettre sur le marché international un nouveau médicament à se conformer aux textes de ces différentes agences.

En 1990 avec l'évolution de l'industrie de la santé et les problèmes d'acceptation de mise sur le marché de médicaments dans différents pays, la FDA, l'EMA, et le

MHLW ont initié une normalisation de leurs différentes réglementations en vigueur afin de faciliter la mise sur le marché de médicaments dans plusieurs pays, L'International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH) était née. La mission de l'ICH est de parvenir à une plus grande harmonisation des aspects techniques du développement des médicaments et de leur homologation afin de s'assurer que les médicaments soient sûrs, efficaces, de grande qualité, développés et enregistrés de la manière la plus efficace possible. Pour parvenir à cet objectif l'ICH a établi un système de publication gratuite de lignes de conduite (guidelines) qui reprennent les décisions prises par les différents comités d'harmonisation. Ces guidelines sont divisés en 4 domaines : La qualité (Q), la sécurité (S), l'efficacité (E), et un domaine multidisciplinaire (M). Ils retracent les données non-cliniques et cliniques réglementaires à générer et à synthétiser dans le dossier de demande de mise sur le marché, ou Common Technical Document (CTD). L'ICH gère aussi les lignes de conduite spécifiques relatives à la constitution de ce dossier.

En France et en Europe, l'évaluation du dossier d'AMM est effectuée par les autorités compétentes selon des procédures d'accès au marché définies très précisément dans la réglementation européenne du médicament mise initialement en place en 1965.

Pour les nouveaux médicaments destinés à être commercialisés dans plusieurs pays, l'accès au marché est communautaire dans l'Union européenne, depuis le 1er janvier 1998, soit par la voie de la procédure centralisée (définie dans le Règlement n°2309/93/CEE modifiée par le Règlement n°726/2004/CEE), soit par la voie de la procédure de reconnaissance mutuelle (prévue dans la Directive

2001/83/CE modifiée par la Directive 2004/27/CE) et depuis octobre 2005 par la voie de la procédure décentralisée (prévue dans la Directive 2004/27/CE).

La procédure centralisée, qui est obligatoire pour les médicaments issus des biotechnologies, et optionnelle pour les nouvelles substances actives, porte sur une autorisation valable d'emblée pour tous les pays membres de l'Union Européenne. Le laboratoire dépose son dossier auprès de l'Agence Européenne du Médicament (EMA) basée à Londres.

Dans la procédure de reconnaissance mutuelle, le laboratoire dépose son dossier auprès de l'autorité nationale compétente de l'un des Etats membres. Une fois l'autorisation initiale accordée dans cet Etat membre, elle peut être étendue aux autres Etats membres.

Lors de la procédure décentralisée, le laboratoire dépose son dossier simultanément auprès des autorités de tous les Etats membres. L'évaluation est menée par un état choisi comme Etat membre de référence. Si l'autorisation est accordée, elle l'est dans les autres Etats membres en même temps.

La **procédure nationale** est de moins en moins utilisée : elle ne s'applique qu'à des demandes de mise sur le marché de médicament limitées au territoire national, ce qui représente un nombre limité de médicaments. Elle continue par ailleurs à s'appliquer pour la maintenance des AMM historiquement délivrées au niveau national.

Afin de savoir à quels textes se reporter lors du développement d'un médicament, il est crucial de définir le cadre réglementaire du candidat. La première caractéristique à évaluer est la nature et le moyen de production du principe actif. Un médicament produit par système acellulaire, du fait de l'utilisation d'un

organisme vivant comme base de système de production et sa nature protéique, est classé dans les médicaments biologiques ou dérivés des biotechnologies, par opposition aux principes actifs synthétisés chimiquement. La deuxième caractéristique importante est la nature de l'indication du principe actif, selon que le candidat soit indiqué pour le traitement de cancers, une maladie pandémique ou une maladie non traitable, les textes de lois et les études à mener seront différents.

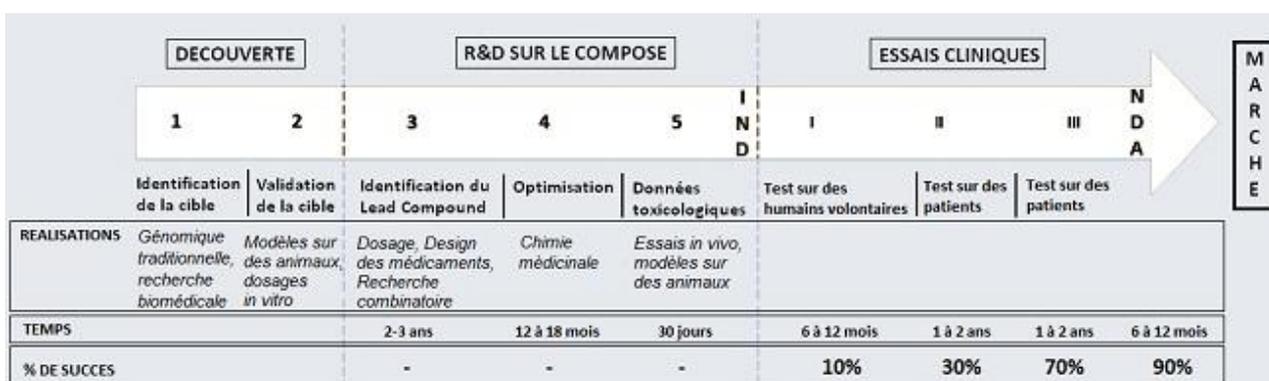


Figure 19: Chaîne de valeur du médicament, from Sacha Pouget - in « Apprendre à profiter des opportunités boursières dans le secteur santé »

Le développement d'un médicament est un processus long et très coûteux qui est divisé en plusieurs phases. Comme montré sur la figure 19, les trois étapes majeures de la chaîne de valeur sont la découverte du concept, la R&D sur le candidat médicament et les phases d'essais cliniques. L'aspect réglementaire a une importance croissante tout au long de ces trois phases et doit donc être pris en compte dès le début du projet de développement d'une nouvelle thérapeutique. Les premiers échanges avec les instances réglementaires ont habituellement lieu au niveau des phases 4 et 5 lors de la normalisation du processus de production de l'actif et de son évaluation non-clinique réglementaire.

3.2 Textes réglementaires spécifiques des produits biologiques ou issus des biotechnologies :

3.2.1 Aspects production :

La réglementation spécifique au processus de production par système acellulaire est quasiment inexistante, aucun médicament utilisant cette technique de production n'ayant encore été commercialisé à ce jour. Les responsables des affaires réglementaires travaillant sur un actif thérapeutique produit en système acellulaire doivent donc adapter leur projet à la réglementation disponible et interpréter des lois qui sont à la base écrites pour des systèmes *in vivo*.

Les principes de base de production sont dans leur majorité assez bien applicable au système acellulaire car il s'agit de textes définissant la mise en place d'une démarche qualité nécessaire à n'importe quel système de production. On se réfère donc aux règles définies par les textes des « Current Good Manufacturing practices » (cGMP) tel qu'énoncé dans EUDRALEX « The rules governing Medicinal Products in the EU vol 4 - EU guidelines to GMP Medicinal Products for Human and Veterinary Use » pour l'union Européenne ou dans « GMP 21CFR Parts 210 and 211 » de la Food and Drug Administration (FDA) pour les USA. L'ICH reprend et harmonise ces textes dans différents guidelines (ICH Q7, Q8, Q9, Q10 et Q11).

Les recommandations des cGMP sont souvent regroupées sous la forme de dix principes clés :

1. ÉCRIRE les modes opératoires et les instructions afin de fournir une "feuille de route" nécessaire à la conformité aux cGMP et à une production de qualité régulière.

2. SUIVRE scrupuleusement procédures et instructions pour prévenir toute contamination, inversion ou erreur.
3. RENSEIGNER rapidement et précisément le travail en cours dans un but de conformité aux procédures et de traçabilité.
4. PROUVER que les systèmes font ce pour quoi ils sont conçus en effectuant des démarches formelles de validation.
5. INTÉGRER la productivité, la qualité du produit et la sécurité du personnel dans la conception des bâtiments et des équipements.
6. EFFECTUER LA MAINTENANCE des bâtiments et équipements de manière régulière et efficace.
7. DÉVELOPPER ET DÉMONTRER clairement les compétences au poste de travail.
8. PROTÉGER les produits contre toute contamination en adoptant des habitudes régulières et systématiques de propreté et d'hygiène.
9. CONSTRUIRE LA QUALITÉ dans les produits par un contrôle des matières premières et des processus tels que la fabrication, l'emballage, l'étiquetage...
10. PLANIFIER et EFFECTUER régulièrement des AUDITS afin d'assurer la conformité aux cGMP et l'efficacité du système qualité.

D'autres « guidelines » ont été publiés, reprenant des recommandations spécifiques aux produits biologiques et dérivés des biotechnologies (ICH Q5A à E, Q6B).

Tous ces textes reprennent des recommandations intéressantes à mettre en place le plus tôt possible lors de la définition du processus de production car selon

l'étape de développement du candidat-médicament un certain degré de qualité est obligatoire.

Au niveau de la première phase de développement, la phase de découverte (cf. fig. 16), le produit ainsi que le système de production sont encore en pleine évolution ; il n'y a donc aucune obligation de qualité au niveau réglementaire. Pour la phase de R&D sur le composé, le processus de production commence à correspondre dans les grandes étapes à celui que l'on retrouvera au niveau industriel. Il n'existe pas de textes déterminant le niveau de qualité requis à cette phase du projet mais au niveau des lots utilisés lors des études non-cliniques réglementaires, les instances attendent un niveau de qualité se rapprochant le plus possible des lots qui seront utilisés lors des phases cliniques. La dernière phase de développement fait l'objet d'une partie spécifique dans les cGMP. La démarche qualité attendue au niveau des lots de phases cliniques reprend exactement tous les grands principes des cGMP mais les processus de fabrication et les procédures de test de la qualité du produit doivent être assez flexibles pour pouvoir évoluer au fur et à mesure du développement du processus de fabrication et de l'amélioration de la connaissance des effets du principe actif. Enfin, avant l'autorisation de mise sur le marché, le système de production du produit doit avoir été certifié conforme aux règles des cGMP.

Le niveau de qualité attendu pour des produits pharmaceutiques synthétisés selon les règles définies par les cGMP est évalué selon différents critères. Les plus importants sont:

- La reproductibilité : les lots doivent être produits de façon reproductible dans leur globalité, le principe actif comme les impuretés présentes. Cet

aspect doit être validé sur plusieurs productions et la définition des limites d'acceptation doit être validée scientifiquement.

- Contrôle qualité : les caractéristiques du produit pharmaceutique doivent être validées les résultats de tests développés et validés selon les règles des cGMP. L'intérêt de ces tests par rapport aux critères évalués devra être confirmé scientifiquement.
- L'activité : elle doit être évaluée pour chaque lot produit grâce à des tests définis selon les cGMP et validés scientifiquement.
- La pureté : un produit pharmaceutique doit être le plus pur possible mais selon la technique de production utilisée le niveau de pureté peut être différent. La limite d'acceptation du produit doit être définie scientifiquement, les tests utilisés doivent être validés et les impuretés doivent être caractérisées et reproductibles de lot à lot.

3.2.2 Aspects développement de thérapies:

La réglementation au niveau du développement du produit pharmaceutique ne commence vraiment à avoir une incidence qu'à partir de la mise en place des études non-cliniques réglementaires. En effet, toutes ces études doivent se dérouler selon les règles des Good Laboratory practice (GLP) ou Bonnes Pratiques de Laboratoire (BPL). De même que pour les cGMP, les GLP définissent une démarche qualité selon laquelle doivent se dérouler les études non-cliniques réglementaires et permettent ainsi d'attester de la validité des résultats obtenus au cours de ces études.

Bien que les grands principes d'études non-cliniques et cliniques soient en partie les mêmes, les principes actifs biotechnologiques sont soumis à des textes réglementaires différents des produits synthétiques. En effet, les textes différencient généralement les deux types de produits et des « guidelines » spécifiques ont été publiés (ICH S6, E16).

3.3 Exemple : projet LipoBak :

Afin d'illustrer les aspects réglementaires du développement d'un principe actif produit grâce à un système acellulaire, voici un exemple de projet de médicament produit grâce à système de production de protéines membranaires basé sur le lysat d'*E. coli*.

3.3.1 Principe du projet :

LipoBak a été initié par le Pr. Jean-Luc Lenormand de l'équipe TheReX du laboratoire TIMC. Un partenariat avec Synthelis, start-up installée à Grenoble et spécialisée dans la production de protéines membranaires en système acellulaire, a été mis en place pour assurer la dimension industrielle de ce projet. L'objectif est le développement pharmaceutique d'une protéine membranaire pro-apoptotique enchâssée dans la bicouche lipidique d'un liposome.

Bak est une protéine membranaire pro-apoptotique agissant par la voie intrinsèque mitochondriale de l'apoptose. Sa liaison à la membrane externe de la mitochondrie permet la sortie du cytochrome c de la mitochondrie et ainsi l'induction de la voie des caspases, cascade de réactions provoquant la mort de la cellule par apoptose.

Ce candidat-médicament est produit par le système d'expression acellulaire exploité par Synthelis. Ce système utilise l'extrait d'*E. coli* et le mélange réactionnel est supplémenté en liposomes permettant de favoriser le repliement correct de la protéine Bak. Le protéo-liposome résultant de ce processus, appelé LipoBak, a une visée anti-tumorale. L'objectif du projet est de vectoriser LipoBak vers les cellules tumorales afin de permettre la régression de la tumeur. Dans ce but, une protéine chimère constituée de Bak et d'un peptide d'adressage spécifique des cellules tumorales est produite à l'aide du système Synthelis

L'indication première de LipoBak est le traitement du glioblastome multiforme. Il s'agit d'un cancer touchant le système nerveux central, et plus particulièrement les cellules de soutien appelées gliocytes. Il est caractérisé par une zone nécrotique entourée par un amas de cellules néoplasiques ; la survie à 5 ans est inférieure à 10% et la survie médiane sans traitement après diagnostic est de 3 mois.

Le projet LipoBak est soutenu au niveau financier par le CLARA (Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône-Alpes) pour un programme étalé sur 3 ans. Les objectifs de ce projet concernent plus précisément la mise en place d'un système de ciblage du tissu tumoral permettant d'adresser spécifiquement LipoBak sur le site de la tumeur. L'étude de ce ciblage a donné naissance à une collaboration avec le pôle de recherche santé, dirigé par le Pr Joël Eyer, du Laboratoire de Neurobiologie et Transgénèse (LNBT) de l'université d'Angers.

Le projet LipoBak est actuellement en phase de développement pharmaceutique (early stage), ce qui correspond à la phase de maturation du processus de production et d'implémentation de données sur le produit avant de passer à la phase non-clinique du projet.

3.3.2 Textes réglementaires spécifiques à LipoBak :

Les « guidelines » de l'ICH rassemblés dans le module « Safety » retracent les spécifications de l'évaluation non-clinique de sécurité d'un médicament. Les recommandations émises quant aux études non-cliniques à mener sur le projet LipoBak sont donc basées en majorité sur ces « guidelines ».

LipoBak est un médicament indiqué dans le traitement du glioblastome multiforme, il est donc considéré comme un médicament à visée anti-tumorale. Les anticancéreux sont des médicaments très spécifiques autant au niveau de leur utilisation qu'au niveau de la réglementation dont ils dépendent. L'ICH a donc développé un « guideline » spécifique à l'évaluation de la sécurité de cette classe de médicament : l'ICH S9 « Non clinical evaluation for anticancer pharmaceuticals », qui est un des textes les plus importants sur lequel l'évaluation non clinique réglementaire de LipoBak devra être basée.

La nature de LipoBak, une protéine membranaire enchâssée dans une bicouche lipidique d'un liposome synthétisé par un système de production issu des biotechnologies, le classe directement dans les médicaments biologiques innovants. Il dépend donc aussi du « guideline » de l'ICH sur l'évaluation de la sécurité des produits issus des biotechnologies : l'ICH S6 « Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals ».

Les autres « guidelines » de l'ICH utilisés pendant l'étude des aspects non-cliniques réglementaires de LipoBak ne sont pas spécifiques des médicaments biologiques anticancéreux et sont applicables à la majorité des actifs pharmaceutiques.

3.2.3 Objectifs des études non-cliniques :

- Démonstration de l'activité anti-tumorale du médicament : preuve de concept non clinique
- Identification des conditions permettant d'obtenir une activité optimale du produit :
 - Dose initiale
 - Escalade des doses
 - Schéma d'administration
 - Voie d'administration chez l'homme
 - Etude du mécanisme d'action du produit
- Etude de tous les aspects toxicologiques du produit :
 - Toxicologie générale et sa réversibilité
 - Cancérogénicité
 - Génotoxicité
 - Toxicité de la reproduction
 - Immunotoxicité
- Identification d'éventuels biomarqueurs d'efficacité et de toxicité
- Recherche d'associations thérapeutiques pertinentes

3.2.4 Réglementations et recommandations :

Démonstration de l'activité et de l'efficacité du produit

Etude de pharmacodynamie :

Définition : Étude de l'action exercée par le médicament sur l'organisme, en particulier du mode d'action.

Réglementation :

On peut évaluer l'activité biologique à l'aide d'expériences *in vitro* visant à déterminer quels effets de la substance peuvent être liés à son activité clinique. Il peut être utile d'avoir recours à des lignées cellulaires et/ou à des cultures cellulaires primaires pour étudier les effets directs sur le phénotype cellulaire et la prolifération. Étant donné que de nombreux produits biopharmaceutiques sont spécifiques d'une espèce, il est important de choisir l'espèce animale pertinente pour les épreuves de toxicité. Des lignées cellulaires *in vitro* dérivées de cellules de mammifère peuvent être utilisées pour prédire certains aspects de l'activité *in vivo* et pour estimer quantitativement la sensibilité relative de diverses espèces (y compris les humains) au produit biopharmaceutique. On peut concevoir de telles études pour déterminer, par exemple, l'occupation d'un récepteur, son affinité, et/ou ses effets pharmacologiques, ainsi que pour faciliter le choix d'une espèce animale pertinente pour des études pharmacologiques et toxicologiques *in vivo* plus poussées. L'ensemble des résultats des études *in vitro* et *in vivo* permet d'extrapoler les résultats aux humains. On fait souvent appel à des études *in vivo* d'évaluation de l'activité pharmacologique, notamment de définition des mécanismes d'action, pour justifier l'usage proposé du produit dans les études cliniques.

Il est important de bien connaître le comportement des produits biopharmaceutiques dans les matrices biologiques (p. ex. le plasma, le sérum, le

liquide céphalo-rachidien) et l'influence possible de leur liaison aux protéines plasmatiques pour comprendre l'effet pharmacodynamique.

Lors de la mise en place de ces études, la voie d'administration, les doses utilisées et la posologie doivent se rapprocher le plus possible de celles qui seront utilisées pour les études cliniques.

Recommandations pour LipoBak :

Des données *in vitro* déjà existantes permettent de définir certaines caractéristiques du produit, au niveau preuve de concept et activité anti-tumorale.

De nouvelles données *in vitro* et *in vivo* doivent être générées du fait du changement de la composition en lipides des liposomes utilisés dans la production et de l'évolution du processus de fabrication de LipoBak. Le mécanisme d'action moléculaire du produit doit être déterminé avec précision (localisation dynamique subcellulaire, internalisation au niveau de la membrane cellulaire) et rationalisé scientifiquement.

Les études de pharmacodynamie doivent être réalisées selon les bonnes pratiques de laboratoire pour que les résultats puissent être soumis aux autorités de santé. Des études préliminaires non réglementaires peuvent être entreprises afin d'investiguer les caractéristiques du produit. Ces données permettront ainsi d'orienter les études valides d'un point de vue réglementaire à effectuer.

Il serait intéressant de contacter les agences réglementaires ou la cellule réglementaire du CLARA afin de soumettre le plan des études non-cliniques qui seront réalisées.

Toxicocinétique et pharmacocinétique

Définitions : La pharmacocinétique a pour but d'étudier le devenir du médicament dans l'organisme. La toxicocinétique étudie la même chose du point de vue de la toxicité provoquée par le médicament.

Réglementation :

Il est difficile d'émettre des lignes directrices uniformes pour les études de pharmacocinétique dans le cas de produits biopharmaceutiques. Des études de pharmacocinétique et de toxicocinétique à doses uniques et multiples ainsi que des études de distribution tissulaire chez une espèce pertinente sont utiles; toutefois, les études classiques visant à déterminer un bilan massique ne le sont pas. Les différences pharmacocinétiques entre les espèces animales peuvent avoir un effet significatif sur la prédictibilité des études animales ou sur l'évaluation des relations dose-réponse dans les études de toxicité. Les modifications du profil pharmacocinétique dues à des mécanismes de clairance à médiation immunitaire peuvent avoir un effet sur les profils cinétiques et sur l'interprétation des données de toxicité. Dans le cas de certaines substances, il peut également y avoir des retards intrinsèques importants dans l'expression des effets pharmacodynamiques relatifs au profil pharmacocinétique (p. ex. les cytokines) ou il peut se produire une expression prolongée des effets pharmacodynamiques en rapport avec les concentrations plasmatiques.

Les études pharmacocinétiques doivent, dans la mesure du possible, être effectuées avec des préparations comparables à celles proposées pour les études de toxicité à des fins cliniques et en empruntant une voie d'administration appropriée aux études cliniques prévues. Les profils d'absorption peuvent varier en fonction de la formulation, de la concentration, du site d'administration et du

volume administré. Il faut, dans la mesure du possible, évaluer l'exposition systémique durant les études de toxicité.

Lorsqu'on utilise des protéines radio marquées, il est important de démontrer que le matériel d'essai conserve son activité et que ses propriétés biologiques sont équivalentes à celles du matériel non marqué. Les concentrations de la radioactivité dans les tissus et les données d'autoradiographie faisant appel à des protéines radio marquées peuvent être difficiles à interpréter à cause d'un métabolisme *in vivo* rapide de ces dernières ou de l'instabilité du radio marquage. Il faut interpréter avec soin les études faisant appel à des traceurs radioactifs incorporés dans certains acides aminés à cause du recyclage des acides aminés en protéines ou en peptides non apparentés au médicament.

La connaissance de données sur la résorption, l'élimination et la clairance chez des modèles animaux pertinents est nécessaire avant d'effectuer les études cliniques de manière à pouvoir prédire les marges de sécurité basées sur l'exposition et la dose.

Les données complémentaires d'ADME (Absorption, Distribution, Métabolisme, Elimination) pourront être apportées au cours du développement clinique, mais seront requises pour le dossier de demande d'AMM.

Recommandations pour LipoBak :

Une étude préliminaire *in vivo* de la cinétique d'exposition du produit serait intéressante afin d'acquérir les données sources du profil pharmacocinétique du produit. Cela permettra de définir les tests et les limites numériques, les schémas d'administration et les doses à utiliser au cours des études de cinétique réglementaires. Ces données doivent être discutées et rationalisées en fonction

du développement pharmaceutique du produit. L'aspect toxicocinétique pourra être étudié pendant les études de toxicologie générale.

Pharmacologie d'innocuité

Définition : Les études pharmacologiques d'innocuité examinent les effets pharmacodynamiques indésirables potentiels d'une substance sur les fonctions physiologiques en relation avec une exposition se situant dans la marge thérapeutique et au-dessus de celle-ci.

Réglementation :

Il est important d'évaluer les effets pharmacologiques indésirables éventuels sur des modèles animaux appropriés et, au besoin, d'intégrer une surveillance particulière de ces effets dans les études de toxicité et/ou dans les études cliniques. Les études de la sécurité d'emploi des médicaments mesurent les indices fonctionnels d'une toxicité éventuelle. Ces paramètres peuvent être étudiés dans le cadre d'études séparées ou être incorporés dans le plan expérimental des études de toxicité. Le but des études de la sécurité d'emploi des médicaments consiste à révéler tout effet fonctionnel sur les principaux systèmes et appareils physiologiques (p. ex. l'appareil cardiovasculaire, l'appareil respiratoire, l'appareil rénal ou le système nerveux central).

Recommandations pour LipoBak :

Dans les cas où des préoccupations particulières ont été identifiées qui pourraient mettre les patients en danger, une étude spécifique destinée à l'évaluation de ces préoccupations doit être mise en place. Dans le cas contraire, ces études peuvent être intégrées dans la batterie de tests de toxicologie générale. Les tests

classiques pour l'évaluation de la pharmacologie d'innocuité qui pourront être utilisés pendant les études de toxicité du projet sont :

- Système nerveux central : batterie d'observation fonctionnelle (BOF), le test modifié d'Irwin (tests évaluant les réflexes psychomoteurs et le comportement des cobayes. Tests utilisés chez l'animal et l'humain).
- Système cardio-vasculaire : mesurer la pression artérielle et la fréquence cardiaque et effectuer un électrocardiogramme.
- Système respiratoire : la fréquence respiratoire, le volume respiratoire et la saturation en oxygène de l'hémoglobine.

Etudes toxicologiques

Toxicologie générale :

Définition : Etudes pivots permettant l'évaluation de la toxicité du médicament dans l'organisme. Ces études évaluent la toxicité au niveau aigu et chronique, la tératogénicité et la fonction reproductrice, l'action sur le génome et la cancérogénicité, la sensibilité à la lumière après injection et l'effet sur la sphère immunitaire.

Réglementation :

Les études toxicologiques réalisées afin de déterminer une dose sans effet nocif observé (NOAEL) ou la dose sans effet (NOEL) ne sont pas considérés comme essentiels pour soutenir l'utilisation clinique d'un médicament anticancéreux. Comme la toxicité du produit pharmaceutique peut être grandement influencée par son schéma d'administration, un rapprochement de son calendrier clinique doit

être évalué dans les études toxicologiques. Une évaluation de la possibilité de récupérer de la toxicité devrait être fournie afin de comprendre si des effets indésirables graves sont réversibles ou irréversibles. Si une étude de réversion de la toxicité est nécessaire, elle devrait être disponible pour soutenir le développement clinique. La démonstration du rétablissement complet n'est pas considérée comme essentielle. Pour les petites molécules, les tests de toxicologie générale comprennent généralement des rongeurs et non-rongeurs. Dans certaines circonstances, déterminées au cas par cas, des approches alternatives peuvent être appropriées (par exemple, pour les médicaments génotoxiques ciblant les cellules à division rapide, une étude de toxicité chronique dans une espèce de rongeur peut être considéré comme suffisante, à condition que le rongeur soit une espèce pertinente). Pour les produits biopharmaceutiques, selon ICH S6R1, une seule espèce est acceptable s'il n'existe pas d'autres espèces pertinentes, sinon il faut utiliser 2 espèces (rongeurs et non rongeurs).

Recommandations pour LipoBak :

Du fait de la formulation du produit, à savoir une protéine membranaire incluse dans la double couche phospholipidique d'un liposome PEGylé, plusieurs types d'étude toxicologique seront nécessaires. Il faudra tout d'abord évaluer la toxicité du liposome PEGylé sans protéines et si une toxicité importante est décelée, il faudra étudier la toxicité du liposome nu et du PEG séparément et donc faire varier la composition du liposome en cas de toxicité avérée des liposomes seuls. Les espèces animales utilisées pendant les étapes d'études de toxicologie devront être sélectionnées selon la pertinence de leur utilisation.

Etude de toxicité à dose unique :

Réglementation :

Les études de toxicité à dose unique peuvent fournir des données utiles concernant la relation entre la dose et la toxicité générale et/ou locale. Ces données peuvent servir de base pour aider à choisir les doses à administrer pour les études de toxicité à doses multiples. Les données sur les relations dose-réponse peuvent être obtenues à l'aide d'une étude de toxicité à dose unique, effectuée dans le cadre d'études pharmacologiques ou d'efficacité sur des modèles animaux. L'évaluation des paramètres de sécurité d'emploi pharmacologique doit figurer dans le protocole de ces études.

Recommandations pour LipoBak :

Des données préliminaires sur la toxicité des liposomes seuls et des liposomes PEGylés devront être réalisées avant la mise en place de l'étude non-clinique réglementaire. Les études de toxicité à dose unique permettront de déterminer la toxicité aiguë du produit. En fonction des résultats obtenus la nécessité de conduire une étude plus poussée devra être discutée.

Etude de toxicité à doses multiples :

Réglementation :

La voie d'administration et le régime de traitement (p. ex. une posologie quotidienne ou intermittente) doivent correspondre à l'utilisation clinique ou à l'exposition prévue. Dans la mesure du possible, ces études doivent comprendre la collecte de données toxicocinétiques.

Une période de récupération doit être prévue dans le protocole de ces études afin de mettre en évidence une éventuelle résolution ou aggravation des effets

pharmacologiques ou toxicologiques et/ou des effets toxiques d'apparition retardée. Dans le cas de produits biopharmaceutiques responsables d'effets pharmacologiques ou toxicologiques prolongés, il faut surveiller des animaux affectés à un groupe de récupération jusqu'à ce que l'inversion des effets soit démontrée. La durée des études à doses répétées doit être basée sur la durée prévue de l'exposition clinique et sur la nature de la maladie. La durée du traitement chez les animaux est généralement de 1 à 3 mois pour la plupart des produits biopharmaceutiques. Dans le cas de produits prévus pour une utilisation à court terme (p. ex. ≤ 7 jours) et pour le traitement de maladies aiguës graves, des études à doses répétées ne dépassant pas deux semaines ont été jugées adéquates pour appuyer les études cliniques et l'autorisation de commercialisation. Dans le cas des produits biopharmaceutiques prévus pour des indications chroniques, des études d'une durée de 6 mois sont généralement appropriées, bien que dans certains cas des autorisations de commercialisation aient été appuyées par des études dont la durée était plus ou moins longue. Dans le cas des produits biopharmaceutiques prévus pour un usage chronique, la durée des études de toxicité à long terme doit être scientifiquement justifiée.

Dans la plupart des cas les protéines thérapeutiques réagissent différemment selon les espèces chez lesquelles elles sont administrées. Ainsi, les protéines humaines seront reconnues comme des protéines étrangères par les animaux. Pour cette raison, la valeur prédictive des modèles animaux pour l'évaluation de l'immunogénicité est considéré comme faible. Néanmoins, les niveaux d'immunogénicité doivent être inclus dans les études de toxicité à dose multiple, afin d'aider à l'interprétation des études cliniques de toxicité.

Recommandations pour LipoBak :

Avant la mise en place d'une étude non clinique réglementaire de toxicité à doses multiples, plusieurs aspects du projet doivent être définis. La voie d'administration, le schéma d'administration, la durée du traitement, les doses utilisées sont des données essentielles à obtenir ou déterminer pour pouvoir réaliser le design de l'étude. La reproductibilité des lots qui seront utilisés est un facteur essentiel à valider avant n'importe quelle étude non clinique et encore plus dans le cas d'études de toxicité à doses multiples. Du fait de la cible tumorale du produit, une étude de réversibilité des possibles effets indésirables chroniques devra être réalisée.

L'immunogénicité du produit devra aussi être évaluée au cours des études non-cliniques afin de pouvoir comparer le niveau de réponse immunitaire contre le produit chez l'animal et chez l'humain.

Toxicologie de la reproduction :

Réglementation :

Les études de toxicité embryofœtale des produits pharmaceutiques anticancéreux doivent être disponibles lorsque la demande d'autorisation de mise sur le marché est présentée, mais ces études ne sont pas considérées comme essentielles pour soutenir les essais cliniques destinés au traitement des patients atteints de cancer avancé. Ces études ne sont pas considérées comme essentielles pour la demande d'autorisation de mise sur le marché pour les produits pharmaceutiques qui sont génotoxiques et ciblent les cellules à division rapide (par exemple, la moelle osseuse) dans les études de toxicité générale ou quand ces molécules appartiennent à une classe qui a été bien caractérisée comme provoquant une toxicité pour le développement.

Pour les produits biopharmaceutiques, une évaluation dans une espèce pharmacologiquement pertinente devrait normalement être suffisante. Cette évaluation pourrait être faite en évaluant la toxicité au cours de la période d'organogenèse. D'autres approches pourraient être considérées comme satisfaisantes si scientifiquement justifiées. Les approches alternatives pourraient inclure une évaluation de la littérature, l'évaluation du transfert placentaire, les effets directs ou indirects du produit biopharmaceutique, ou d'autres facteurs.

Une étude de la fertilité et du développement embryonnaire précoce n'est pas justifiée pour soutenir des essais cliniques ou pour la commercialisation de produits pharmaceutiques destinés au traitement des patients atteints de cancer avancé. Les informations disponibles provenant d'études de toxicologie générale sur l'effet du produit pharmaceutique sur les organes reproducteurs doivent être utilisées comme la base de l'évaluation des troubles de la fertilité.

Une étude de toxicologie pré et postnatale n'est généralement pas justifiée pour soutenir des essais cliniques ou pour la commercialisation de produits pharmaceutiques pour le traitement des patients atteints de cancer avancé.

Recommandations pour LipoBak :

Les études de toxicité de la reproduction ne sont pas nécessaires en phase non-clinique dans le cas de médicaments anticancéreux destinés à des patients en stade avancé. Une étude de toxicité embryofœtale sera demandée pour l'autorisation de mise sur le marché.

Etude de génotoxicité :

Réglementation :

La gamme et le type d'études de génotoxicité couramment effectués dans le cas des produits pharmaceutiques ne sont pas applicables aux produits biopharmaceutiques et, de ce fait, ne sont pas requis. De plus, l'administration de grandes quantités de peptides ou de protéines peut produire des résultats impossibles à interpréter. Il est peu probable que ces substances interagissent directement avec l'ADN ou avec d'autres matériaux chromosomiques.

Cependant dans le cas où le produit est jugé préoccupant (p. ex. à cause de la présence d'un ligand organique dans une protéine conjuguée), des études devraient être effectuées sur des systèmes pertinents, existants ou nouveaux. Le recours à des études de génotoxicité classiques pour évaluer le pouvoir génotoxique des contaminants n'est pas jugé approprié. Toutefois, leur utilisation à cette fin doit être justifiée.

Recommandations pour LipoBak :

Tant que les études *in vitro* ne montrent pas des preuves selon lesquelles le produit interagit avec l'ADN aucune étude de génotoxicité n'est nécessaire.

Etude de cancérogénicité :

Réglementation :

Les études de cancérogénicité ne sont généralement pas nécessaires pour la commercialisation de produits pharmaceutiques développés pour traiter les patients atteints de cancer en phase avancée. La pertinence d'une évaluation de cancérogénicité des produits pharmaceutiques anticancéreux est décrite dans l'ICH S1A.

Recommandations pour LipoBak :

Les études de cancérogénicité ne sont pas nécessaires dans le cadre de ce projet.

Etude de phototoxicité :

Réglementation :

Une première évaluation du potentiel phototoxique devrait être effectuée avant la phase I, basée sur les propriétés photochimiques de la drogue et de l'information sur les autres membres de la classe. Si l'évaluation de ces données indique un risque potentiel, les mesures de protection appropriées doivent être prises au cours des essais en clinique externe.

Recommandations pour LipoBak :

L'évaluation de la phototoxicité du produit pourra être réalisée durant les premières expériences *in vivo* non réglementaires. Une évaluation non clinique réglementaire pourra être menée afin de valider les premiers résultats dans le cas où il n'y a pas de toxicité avérée, ou bien une étude spécifique de la phototoxicité du produit devra être menée si les résultats précédents sont négatifs.

Immunotoxicité :

Réglementation :

Pour la plupart des médicaments anticancéreux, les paramètres analysés lors des études de toxicologie générale sont considérés comme suffisants pour évaluer le potentiel immunotoxique et permettre la commercialisation du produit. Pour les médicaments immunomodulateurs, des critères d'évaluation supplémentaires (tels

que l'immunophénotypage par cytométrie de flux) peuvent être inclus dans la conception de l'étude.

Recommandations pour LipoBak :

Le produit n'a pour l'instant jamais montré de potentiel immunomodulateur de par son activité investiguée ou selon la littérature. Une étude spécifique de son immunotoxicité n'est pas nécessaire pour l'instant.

Choix du mode d'administration et de la dose

Réglementation :

La voie et la fréquence d'administration doivent être très proches de celles prévues pour l'usage clinique. Il faut tenir compte de la pharmacocinétique et de la biodisponibilité du produit chez les espèces utilisées et du volume qui peut être administré à ces animaux, sans danger et sans souffrance. Par exemple, on peut augmenter la fréquence d'administration à des animaux de laboratoire comparativement à ce qui est proposé pour les études cliniques chez les humains pour compenser un taux d'élimination plus rapide ou une faible solubilité de l'ingrédient actif. Dans de tels cas, il faut définir le niveau d'exposition de l'animal en relation avec l'exposition clinique. Il faut également tenir compte des effets du volume, de la concentration, de la formulation et du site d'administration. On pourra avoir recours à une voie d'administration autre que celles utilisées en clinique si la voie doit être modifiée à cause d'une biodisponibilité réduite, de contraintes liées à la voie d'administration ou encore de la taille ou de la physiologie de l'espèce.

Les doses doivent être choisies de façon à fournir des renseignements sur le rapport dose/réponse et doivent inclure une dose toxique de même qu'une dose pour laquelle aucun effet adverse n'est observé (NOAEL). Dans le cas de certaines catégories de produits peu ou pas toxiques, il peut être impossible de définir une dose maximale. Dans de tels cas, il faut expliquer scientifiquement le choix de la dose et des multiples de la dose humaine prévue. Pour justifier le choix d'une dose élevée, il faut tenir compte des effets pharmacologiques ou physiologiques prévus, de la quantité adéquate de produit disponible et de l'usage clinique anticipé. Lorsqu'un produit a une affinité plus faible pour les cellules de l'espèce choisie que pour les cellules humaines ou qu'il est moins actif dans les cellules de l'espèce choisie, il peut être important d'utiliser des doses plus élevées. Les multiples de la dose humaine nécessaires pour déterminer une marge de sécurité adéquate peuvent varier selon chaque catégorie de substance biopharmaceutique et leurs diverses indications cliniques.

Recommandations pour LipoBak :

Le choix de la dose et du mode d'administration doit encore être discuté dans le cas de LipoBak. Les deux modes d'administration envisagés pour l'expérimentation clinique sont l'intra-tumorale et l'intraveineux. Ces modes d'administrations doivent être investigués pendant les études in vivo de pharmacodynamie afin de déterminer la biodistribution et la biodisponibilité du produit. De ces résultats découleront le choix rationnel et scientifique des doses et du schéma d'administration qui seront utilisés lors des études de

pharmacocinétique et de toxicité réglementaire. Ces choix devront se rapprocher le plus possible des doses qui seront utilisées durant les phases cliniques. D'après la réglementation sur les médicaments anticancéreux, la définition d'une dose NOAEL n'est pas nécessaire dans le cas d'un médicament biologique. Une autre stratégie serait d'utiliser la technique MABEL pour définir la première dose à injecter à l'homme.

4. Discussion :

La technique de production de protéine par système acellulaire a été développée pour la première fois en 1961 à partir d'un extrait bactérien du bacille *E. coli*. Cette technique a connu d'incroyables évolutions au cours des cinquante dernières années, à tel point que le système acellulaire fait maintenant partie d'un domaine plus large que l'on appelle la biologie acellulaire et qui pourrait se définir comme « la reproduction, l'étude et la manipulation de processus biologiques complexes sans cellules intactes » (42). Par cette définition, le Pr Swartz a mis avant le fait que cette technique a permis non seulement l'étude et la compréhension des mécanismes complexes internes de la cellule mais aussi la mise en place de techniques permettant un contrôle relatif de ceux-ci. En effet, grâce à l'affranchissement des membranes cellulaires il a été possible d'activer, intégrer et concentrer le métabolisme interne de la cellule sur un objectif unique sans avoir besoin de sauvegarder le patrimoine génétique de la cellule et sans qu'elle n'ait le besoin (ou la capacité) d'adapter son métabolisme interne à la pression environnementale externe. De plus, l'absence de barrières cellulaires permet d'éviter les limitations dues au transport transmembranaire et donc rend possible

l'addition directe de réactifs, l'extraction de produits, le contrôle de l'environnement de réaction et le prélèvement d'échantillons de façon aisée. Cela fait du système acellulaire une technique polyvalente, modifiable mais très complexe au vu du nombre de facteurs à prendre en compte et donc pas encore parfaitement maîtrisée.

Le développement de cette technique ayant commencé très tôt, et au vu des évolutions en termes de rendement et d'efficacité de production des vingt dernières années, on peut affirmer que la technologie à l'époque de Nirenberg ne permettait pas d'utiliser tout le potentiel de ce système. En effet, les rendements de réaction étaient très faibles, la fonctionnalité des protéines médiocre, le temps de synthèse trop limité et les étapes de purification trop complexes ce qui ne permettait pas d'envisager cette technique comme potentiellement industrialisable ; cette technique est donc restée pendant des années un outil de recherche uniquement. A partir des années 70, l'utilisation d'ARN polymérases exogènes (Roberts et al.) a permis d'améliorer grandement la pureté de la protéine et de simplifier la préparation des lysats mais le rendement restait faible et la réaction limitée dans le temps. De plus, c'est à cette époque que fut développée la technique d'expression d'ADN recombinant avec en 1983, la commercialisation de la première insuline recombinante produite par *E. coli* (73). Après cette découverte l'utilisation de systèmes *in vivo* pour la production de protéines a connu une évolution fulgurante et le système acellulaire, malgré des avancées intéressantes grâce au développement de mode de production amélioré (CFCF, CECF), est resté au stade d'outil.

Dans les années 90, la révolution de la biologie moléculaire qui a eu lieu grâce au développement de la technique PCR a permis un certain regain d'intérêt pour

l'utilisation des systèmes acellulaires notamment grâce à la possibilité de synthétiser des protéines difficiles à produire en systèmes *in vivo* (protéines toxiques, membranaires, incorporant des acides aminés non naturels...). Mais ces techniques ont pour la majorité été développées comme outils d'études dans le domaine de la protéomique, principalement grâce aux possibilités de criblage rapide et à haut débit de séquence d'ADN codante. De plus, comparativement aux techniques classiques, les systèmes acellulaires restaient plus coûteux et produisaient des protéines mal repliées avec un rendement plus faible.

Il faudra attendre les années 2000 pour voir l'émergence de système acellulaire utilisant des substrats énergétiques moins onéreux, l'utilisation d'additifs comme les chaperonnes ou les détergents permettant la synthèse de protéines fonctionnelles avec des rendements avoisinants ceux atteints par les systèmes classiques.

Actuellement, les limites initiales de rendement de production et de fonctionnalité de protéines sont assez bien maîtrisées. Les écueils actuels empêchant encore l'utilisation de ces systèmes pour la production de protéines thérapeutiques au niveau industriel concernent la possibilité de produire des protéines contenant des modifications post-traductionnelles complexes ou nécessitant un environnement spécifique pour se replier correctement, le développement de plateformes de production moins coûteuses que les systèmes classiques, capables de produire des protéines eucaryotes fonctionnelles de façon reproductible, sur une durée plus longue et pouvant être mise à l'échelle industrielle. Une fois que ces obstacles auront été surmontés et que les premiers systèmes de production de protéines thérapeutiques industriels seront développés, la réglementation relative à ce type de produits sera définie mais jusque là, tous les projets de développement de

médicaments utilisant le système acellulaire comme moyen de production devront être développés en se référant à la réglementation actuelle sur les produits dérivés des biotechnologies.

Le domaine de la biologie acellulaire est complexe, c'est pourquoi son développement prend beaucoup de temps, mais la maturité atteinte par cette technique à l'heure actuelle constituera une base solide pour son épanouissement industriel dans l'avenir.

« Le système acellulaire est une technologie puissante, flexible et en constante expansion. Notre capacité à manipuler les conditions de réaction et à générer de nouvelles applications ne sera probablement limitée que par notre créativité »
(Katzen F. 2005).

THESE SOUTENUE PAR : MILADI Nawfel

TITRE : Production de protéines recombinantes en système acellulaire : Industrialisation et réglementation

CONCLUSION :

La technique de synthèse de protéine par système acellulaire est d'une incroyable complexité. Malgré cinquante années de développement technologique et d'innovations cette technique atteint tout juste la maturité nécessaire à son développement au niveau industriel. En effet il a fallu des décennies de recherches avant d'arriver à une technologie qui soit exploitable autrement que comme outil de recherche, mais toutes ces années de recherches étaient nécessaires au vu du nombre de facteurs sur lesquels travailler et de toutes les possibilités à explorer au fur et à mesure du développement de la technique.

Maintenant que la production de protéines en système acellulaire à un niveau industriel a été démontrée, les applications dans le domaine de la synthèse de protéines thérapeutiques devraient prochainement connaître un essor important. Le domaine des thérapies personnalisées en particulier semble correspondre de façon très nette à la production de protéines en systèmes acellulaire grâce à la rapidité à laquelle des protéines thérapeutiques spécifiques au patient peuvent être synthétisées. Enfin d'autres applications industrielles sont encore à l'étude dans d'autres secteurs que le domaine pharmaceutique, cela montre bien que la recherche sur la biologie acellulaire a encore de beaux jours devant elle.

La question de la réglementation dans le domaine pharmaceutique a toujours été problématique, les technologies évoluant à une vitesse incroyables il est très difficile de réussir à définir un cadre légal spécifique. La production de protéine en système acellulaire ne fait pas exception et il faudra patienter encore plusieurs

années et attendre le développement de quelques projets de thérapies produites en système acellulaire avant que cette technique ne soit définie au niveau réglementaire. Jusque là, les promoteurs devront se référer à la réglementation spécifique aux produits dérivés des biotechnologies.

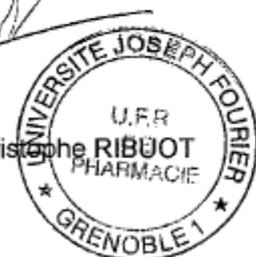
Pour conclure, le système acellulaire, après de nombreuses années de recherche, a atteint une maturité permettant son utilisation au niveau industriel. Mais cette étape n'est que le début de son entrée dans le monde de l'industrie et tout reste à faire avant que les premières structures de production d'actifs thérapeutiques en système acellulaire ne voient le jour.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 23/1/2012

LE DOYEN

LE PRESIDENT DE LA THESE


Professeur Christophe RIBUOT



CHU de GRENOBLE
Pôle Biologie
Pr Benoît POLACK
Chef de pôle

BIBLIOGRAPHIE :

1. BORSOOK H. Protein turnover and incorporation of labeled amino acids into tissue proteins in vivo and in vitro. *Physiol. Rev.* 1950 avr;30(2):206–19.
2. Nirenberg MW, Matthaei JH. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1961;47(10):1588.
3. DeVries JAK, Zubay G. DNA-directed peptide synthesis. II. The synthesis of the alpha-fragment of the enzyme beta-galactosidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1967;57(4):1010.
4. Spirin A, Baranov V, Ryabova L, Ovodov S, Alakhov Y. A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science.* 1988 nov 25;242:1162–4.
5. BIRYUKO SVPVP, SIMONENKO PN, SHIROKOV VA, SPIRIN AS. Method for synthesis of polypeptides in cell-free systems [Internet]. 2002 janv 2; Available from: <https://data.epo.org/publication-server/rest/v1.0/publication-dates/20061206/patents/EP1165826NWB1/document.pdf>
6. Mikami S, Kobayashi T, Masutani M, Yokoyama S, Imataka H. A human cell-derived in vitro coupled transcription/translation system optimized for production of recombinant proteins. *Protein Expr. Purif.* 2008 déc;62(2):190–8.
7. Endo Y, Sawasaki T. Cell-free expression systems for eukaryotic protein production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2006 août;17(4):373–80.
8. Hames BD, Higgins SJ. Translation of eukaryotic messenger RNA in cell-free extracts. Dans: *Transcription and translation.* IRL press; 1984. p. 231–70.
9. Ahn J-H, Chu H-S, Kim T-W, Oh I-S, Choi C-Y, Hahn G-H, et al. Cell-free synthesis of recombinant proteins from PCR-amplified genes at a comparable productivity to that of plasmid-based reactions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005 déc 23;338(3):1346–52.
10. Smith MC, Rees CE. 3 Exploitation of Bacteriophages and their Components [Internet]. Dans: *Genetic Methods for Diverse Prokaryotes.* Academic Press; 1999 [cité 2011 nov 29]. p. 97–132. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0580951708701144>
11. Spirin AS, Swartz JR. *Cell-free Protein Synthesis: Methods and Protocols.* John Wiley & Sons; 2008. 265 p.
12. Karp G. *Biologie cellulaire et moléculaire.* De Boeck Supérieur; 2004. 880 p.
13. Kang S-H, Jun S-Y, Kim D-M. Fluorescent labeling of cell-free synthesized proteins by incorporation of fluorophore-conjugated nonnatural amino acids. *Analytical Biochemistry.* 2007 janv 1;360(1):1–6.

14. Kigawa T, Yabuki T, Yoshida Y, Tsutsui M, Ito Y, Shibata T, et al. Cell-free production and stable-isotope labeling of milligram quantities of proteins. *FEBS letters*. 1999;442(1):15–9.
15. He M, Wang M-W. Arraying proteins by cell-free synthesis. *Biomolecular Engineering*. 2007 oct;24(4):375–80.
16. Swartz JR. Universal cell-free protein synthesis. *Nat. Biotechnol*. 2009 oct;27(8):731–2.
17. Fitzgerald KD, Semler BL. Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim. Biophys. Acta*. 2009 oct;1789(9-10):518–28.
18. Gallie DR. The 5'-leader of tobacco mosaic virus promotes translation through enhanced recruitment of eIF4F. *Nucleic Acids Res*. 2002 oct 1;30(15):3401–11.
19. Ryabova LA, Desplancq D, Spirin AS, Plückthun A. Functional antibody production using cell-free translation: effects of protein disulfide isomerase and chaperones. *Nat. Biotechnol*. 1997 janv;15(1):79–84.
20. Jiang X, Ookubo Y, Fujii I, Nakano H, Yamane T. Expression of Fab fragment of catalytic antibody 6D9 in an *Escherichia coli* in vitro coupled transcription/translation system. *FEBS Lett*. 2002 mars 13;514(2-3):290–4.
21. Spirin AS. *Cell-free translation systems*. Springer; 2002. 280 p.
22. Yin G, Swartz JR. Enhancing multiple disulfide bonded protein folding in a cell-free system. *Biotechnol. Bioeng*. 2004 avr 20;86(2):188–95.
23. Kim HC, Kim TW, Kim DM. Prolonged production of proteins in a cell-free protein synthesis system using polymeric carbohydrates as an energy source. *Process Biochemistry*. 2011;
24. Kim HC, Kim DM. Methods for energizing cell-free protein synthesis. *Journal of bioscience and bioengineering*. 2009;108(1):1–4.
25. Calhoun KA, Swartz JR. Energizing cell-free protein synthesis with glucose metabolism. *Biotechnol. Bioeng*. 2005 juin 5;90(5):606–13.
26. Calhoun KA, Swartz JR. Energy systems for ATP regeneration in cell-free protein synthesis reactions. *Methods Mol. Biol*. 2007;375:3–17.
27. Morita EH, Sawasaki T, Tanaka R, Endo Y, Kohno T. A wheat germ cell-free system is a novel way to screen protein folding and function. *Protein Sci*. 2003 juin;12(6):1216–21.
28. Ozawa K, Dixon NE, Otting G. Cell-free synthesis of ¹⁵N-labeled proteins for NMR studies. *IUBMB Life*. 2005 sept;57(9):615–22.
29. Takai K, Sawasaki T, Endo Y. Chapter 2. Development of key technologies for high-throughput cell-free protein production with the extract from wheat embryos. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2008;75:53–84.

30. Goshima N, Kawamura Y, Fukumoto A, Miura A, Honma R, Satoh R, et al. Human protein factory for converting the transcriptome into an in vitro-expressed proteome. *Nat. Methods*. 2008 déc;5(12):1011–7.
31. Zawada JF, Yin G, Steiner AR, Yang J, Naresh A, Roy SM, et al. Microscale to manufacturing scale-up of cell-free cytokine production--a new approach for shortening protein production development timelines. *Biotechnol. Bioeng*. 2011 juill;108(7):1570–8.
32. Khnouf R, Olivero D, Jin S, Coleman MA, Fan ZH. Cell-free expression of soluble and membrane proteins in an array device for drug screening. *Anal. Chem*. 2010 août 15;82(16):7021–6.
33. Klammt C, Schwarz D, Fendler K, Haase W, Dötsch V, Bernhard F. Evaluation of detergents for the soluble expression of alpha-helical and beta-barrel-type integral membrane proteins by a preparative scale individual cell-free expression system. *FEBS J*. 2005 déc;272(23):6024–38.
34. Liguori L, Marques B, Villegas-Méndez A, Rothe R, Lenormand J-L. Production of membrane proteins using cell-free expression systems. *Expert Rev Proteomics*. 2007 févr;4(1):79–90.
35. Zahnd C, Amstutz P, Plückthun A. Ribosome display: selecting and evolving proteins in vitro that specifically bind to a target. *Nat. Methods*. 2007 mars;4(3):269–79.
36. Roberts RW, Szostak JW. RNA-peptide fusions for the in vitro selection of peptides and proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 1997 nov 11;94(23):12297–302.
37. Tawfik DS, Griffiths AD. Man-made cell-like compartments for molecular evolution. *Nat. Biotechnol*. 1998 juill;16(7):652–6.
38. Berg HC. *E. coli* in motion. Springer; 2004. 136 p.
39. Zawada JF. Preparation and Testing of *E. coli* S30 In Vitro Transcription Translation Extracts. *Methods Mol. Biol*. 2012;805:31–41.
40. Spirin AS. High-throughput cell-free systems for synthesis of functionally active proteins. *Trends in Biotechnology*. 2004 oct;22(10):538–45.
41. Shimizu Y, Inoue A, Tomari Y, Suzuki T, Yokogawa T, Nishikawa K, et al. Cell-free translation reconstituted with purified components. *Nat. Biotechnol*. 2001 août;19(8):751–5.
42. Swartz J. Developing cell-free biology for industrial applications. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*. 2006 juill;33(7):476–85.
43. Kim DM, Swartz JR. Prolonging cell-free protein synthesis by selective reagent additions. *Biotechnol. Prog*. 2000 juin;16(3):385–90.
44. Michel-Reydellet N, Calhoun K, Swartz J. Amino acid stabilization for cell-free protein synthesis by modification of the *Escherichia coli* genome. *Metab. Eng*. 2004 juill;6(3):197–203.

45. Roberts BE, Paterson BM. Efficient translation of tobacco mosaic virus RNA and rabbit globin 9S RNA in a cell-free system from commercial wheat germ. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1973;70(8):2330–4.
46. Endo Y, Sawasaki T. Cell-free expression systems for eukaryotic protein production. *Current Opinion in Biotechnology.* 2006;17(4):373–80.
47. Sawasaki T, Ogasawara T, Morishita R, Endo Y. A cell-free protein synthesis system for high-throughput proteomics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002 nov 12;99(23):14652–7.
48. Ogasawara T, Sawasaki T, Morishita R, Ozawa A, Madin K, Endo Y. A new class of enzyme acting on damaged ribosomes: ribosomal RNA apurinic site specific lyase found in wheat germ. *EMBO J.* 1999 nov 15;18(22):6522–31.
49. Madin K, Sawasaki T, Ogasawara T, Endo Y. A highly efficient and robust cell-free protein synthesis system prepared from wheat embryos: plants apparently contain a suicide system directed at ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2000 janv 18;97(2):559–64.
50. Vinarov DA, Newman CLL, Markley JL. Wheat germ cell-free platform for eukaryotic protein production. *FEBS Journal.* 2006;273(18):4160–9.
51. Beebe ET, Makino S-ichi, Nozawa A, Matsubara Y, Frederick RO, Primm JG, et al. Robotic large-scale application of wheat cell-free translation to structural studies including membrane proteins. *New Biotechnology.* 2011 avr;28:239–49.
52. Hunt T, Jackson RJ. The rabbit reticulocyte lysate as a system for studying mRNA. *Hamatol. Bluttransfus.* 1974;14:300–7.
53. Pelham HRB, Jackson RJ. An Efficient mRNA-Dependent Translation System from Reticulocyte Lysates. *European Journal of Biochemistry.* 1976;1;67(1):247–56.
54. Craig D, Howell MT, Gibbs CL, Hunt T, Jackson RJ. Plasmid cDNA-directed protein synthesis in a coupled eukaryotic in vitro transcription-translation system. *Nucleic Acids Res.* 1992 oct 11;20(19):4987–95.
55. Svitkin YV, Ovchinnikov LP, Dreyfuss G, Sonenberg N. General RNA binding proteins render translation cap dependent. *EMBO J.* 1996 déc 16;15(24):7147–55.
56. Nakashima N, Tamura T. Cell-free protein synthesis using cell extract of *Pseudomonas fluorescens* and CspA promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004 juin 25;319(2):671–6.
57. Mao JC. Protein synthesis in a cell-free extract from *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* 1967 juill;94(1):80–6.
58. Donahue JP, Thompson HA. Protein synthesis in cell-free extracts of *Coxiella burnetti*. *J. Gen. Microbiol.* 1980 déc;121(2):293–302.
59. Endoh T, Kanai T, Imanaka T. Effective approaches for the production of heterologous proteins using the *Thermococcus kodakaraensis*-based translation

system. *Journal of biotechnology*. 2008;133(2):177–82.

60. Kovtun O, Mureev S, Jung W, Kubala MH, Johnston W, Alexandrov K. Leishmania cell-free protein expression system. *Methods*. 2011 sept;55(1):58–64.

61. Ezure T, Suzuki T, Shikata M, Ito M, Ando E. A cell-free protein synthesis system from insect cells. *Methods Mol. Biol.* 2010;607:31–42.

62. Ezure T, Suzuki T, Higashide S, Shintani E, Endo K, Kobayashi S-ichiro, et al. Cell-free protein synthesis system prepared from insect cells by freeze-thawing. *Biotechnol. Prog.* 2006 déc;22(6):1570–7.

63. Wakiyama M, Kaitsu Y, Matsumoto T, Yokoyama S. Coupled transcription and translation from polymerase chain reaction-amplified DNA in *Drosophila Schneider 2* cell-free system. *Anal. Biochem.* 2010 mai 1;400(1):142–4.

64. Patrick TD, Lewer CE, Pain VM. Preparation and characterization of cell-free protein synthesis systems from oocytes and eggs of *Xenopus laevis*. *Development*. 1989;106(1):1–9.

65. Morley SJ, Jackson RJ. Preparation and properties of an improved cell-free protein synthesis system from mammalian liver. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*. 1985 mai 24;825(1):45–56.

66. Mikami S, Kobayashi T, Yokoyama S, Imataka H. A hybridoma-based in vitro translation system that efficiently synthesizes glycoproteins. *Journal of Biotechnology*. 2006 déc 15;127(1):65–78.

67. Voloshin AM, Swartz JR. Efficient and scalable method for scaling up cell free protein synthesis in batch mode. *Biotechnol. Bioeng.* 2005 août 20;91(4):516–21.

68. Zichel R, Mimran A, Keren A, Barnea A, Steinberger-Levy I, Marcus D, et al. Efficacy of a Potential Trivalent Vaccine Based on Hc Fragments of Botulinum Toxins A, B, and E Produced in a Cell-Free Expression System. *Clin Vaccine Immunol.* 2010 mai;17(5):784–92.

69. Tsuboi T, Takeo S, Arumugam TU, Otsuki H, Torii M. The wheat germ cell-free protein synthesis system: A key tool for novel malaria vaccine candidate discovery. *Acta Tropica*. 2010 juin;114(3):171–6.

70. Katzen F, Chang G, Kudlicki W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol.* 2005 mars;23(3):150–6.

71. Kanter G, Yang J, Voloshin A, Levy S, Swartz JR, Levy R. Cell-free production of scFv fusion proteins: an efficient approach for personalized lymphoma vaccines. *Blood*. 2007 avr 15;109(8):3393–9.

72. Patel KG, Ng PP, Levy S, Levy R, Swartz JR. *Escherichia coli*-based production of a tumor idiotype antibody fragment - tetanus toxin fragment C fusion protein vaccine for B cell lymphoma. *Protein Expr. Purif.* 2011 janv;75(1):15–20.

73. Johnson IS. Human insulin from recombinant DNA technology. *Science*. 1983 févr 11;219(4585):632–7.

EUDRALEX « The rules governing Medicinal Products in the EU vol 4 - EU guidelines to GMP Medicinal Products for Human and Veterinary Use » 2008.

Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins, EMEA/CHMP/BMWP/14327/2006, **2007**.

Guidelines ICH:

Safety Guidelines:

S3B Pharmacokinetics: Guidance for Repeated Dose Tissue Distribution Studies, ICH **1994**.

S4 Duration of Chronic Toxicity Testing in Animals (Rodent and Non Rodent Toxicity Testing), ICH **1998**.

S6 (R1)Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals, ICH **1997**.

S6 (R1 Step2) Guideline addendum for Preclinical safety evaluations for biotechnological-derived products, ICH **2009**.

S7A Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals, ICH **2000**.

S9 Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals, ICH **2009**.

Quality Guidelines :

Q5A Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin, ICH **1999**.

Q5B Analysis of the Expression Construct in Cells Used for Production of r-DNA Derived Protein Products, ICH **1995**.

Q5C Stability Testing of Biotechnological/Biological Products, ICH **1995**.

Q5D Derivation and Characterisation of Cell Substrates Used for Production of Biotechnological/Biological Products, ICH **1997**.

Q5E Comparability of Biotechnological/Biological Products Subject to Change in Their Manufacturing Process, ICH **2004**.

Q6B Specifications : Test Procedure and Acceptance Criteria for Biotechnological/Biological Products, ICH **1999**.

Q7 Good Manufacturing Practice Guide for Active Pharmaceutical Ingredients, ICH **2000**.

Q8 Pharmaceutical Development, ICH **2009**.

Q9 Quality Risk Management, ICH **2005**.

Q10 Pharmaceutical Quality System, ICH **2008**.

Q11 Development and Manufacture of Drug Substances, ICH **2011**.

Efficacy Guideline :

E16 Biomarkers Related to Drug or Biotechnology Product Development : Context, Structure and Format of Qualification Submissions, ICH **2010**.

Production de protéines recombinantes en système acellulaire : Industrialisation et réglementation

Miladi Nawfel, 103 route de Saint Nizier 38180 SEYSSINS

Résumé:

La technique de production de protéines par synthèse acellulaire a été décrite pour la première fois en 1961 par Nirenberg et Matthaei. Au fur et à mesure de son développement il est apparu que le principe d'utilisation de la machinerie transcriptionnelle et traductionnelle de cellule afin de produire à partir d'une information génétique spécifique une protéine particulière était extrêmement complexe en pratique. En effet, cette technique nécessitait des avancées technologiques importantes et des années de recherche et de développement avant d'être potentiellement utilisable dans l'industrie pharmaceutique.

Les derniers résultats de recherches publiées en 2011 ont permis de montrer la maturité acquise par cette technique et sa viabilité au niveau industriel. Mais ces avancées ne sont que le premier pas du système acellulaire vers son utilisation en tant que moyen de production de produit de santé. De ce fait, des années de développement sont encore nécessaires avant son utilisation effective dans le milieu de l'industrie pharmaceutique.

Enfin, comme pour chaque innovation scientifique il faudra encore patienter quelques années après le début de l'utilisation de ce système avant de voir paraître la réglementation spécifique à la technique acellulaire de production de protéines thérapeutiques.

Mots-clés : Acellulaire, Protéines, Industrie Pharmaceutique, Réglementation